



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 264 642**

② Número de solicitud: 200501481

⑤ Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

**C07H 21/04** (2006.01)

**G01N 33/569** (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **17.06.2005**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **01.01.2007**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**01.01.2007**

⑦ Solicitante/s: **Instituto de Salud Carlos III  
c/ Sinesio Delgado, 6  
28029 Madrid, ES**

⑦ Inventor/es: **Anda Fernández, Pedro;  
Escudero Nieto, Raquel;  
Jado García, Isabel;  
Rodríguez Moreno, Isabel y  
Jiménez Alonso, María Isabel**

⑦ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑤ Título: **Método y kit de detección de especies bacterianas mediante análisis de ADN.**

⑤ Resumen:

Método y kit de detección de especies bacterianas mediante análisis de ADN. La presente invención se refiere a la detección e identificación de diferentes especies bacterianas por PCR múltiple. Más concretamente, el método proporciona los cebadores, las sondas, las regiones génicas o regiones intergénicas necesarias para llevar a cabo la detección simultánea de especies bacterias y grupos bacterianos pertenecientes a los géneros *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Borrelia*, *Bartonella*, *Coxiella*, *Rickettsia* y *Francisella* por PCR múltiple.

ES 2 264 642 A1

## DESCRIPCIÓN

Método y kit de detección de especies bacterianas mediante análisis de ADN.

5 La presente invención se refiere a la detección e identificación de diferentes especies bacterianas, todas ellas causantes de zoonosis, basada en el análisis de ADN. Más concretamente, la invención proporciona un método y un kit para la detección simultánea de bacterias y grupos bacterianos pertenecientes a los géneros *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Borrelia*, *Bartonella*, *Coxiella*, *Rickettsia* y *Francisella* mediante la amplificación de ADN.

### 10 Estado de la técnica

Actualmente hay descritas unas 200 enfermedades zoonóticas (bartonelosis, leptospirosis, borreliosis de Lyme...) que el hombre puede padecer. En los países en vías de desarrollo, son 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.

Determinadas zoonosis tienden a difundirse en países desarrollados como consecuencia del aumento de la población en zonas urbanas y periurbanas, así como del aumento del tráfico de animales a nivel internacional, que conlleva el riesgo de introducir enfermedades exóticas en nuestro entorno.

20 Estas circunstancias unidas al hecho frecuente del hallazgo de artrópodos infectados por más de uno de los patógenos incluidos en esta invención, da lugar a que la transmisión de más de una de las especies bacterianas, objeto de identificación por la presente invención a un mismo paciente por la misma picadura, sea un suceso habitual.

25 Así pues, cada vez son más comunes las hospitalizaciones debidas a cuadros clínicos producidos por el contacto del hombre con animales o con diferentes clases de 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, por lo que un tratamiento específico y rápido no es posible, y en ocasiones llega demasiado tarde. Esto justifica, sin dejar lugar a dudas, la necesidad de un método integrado de detección.

30 Los métodos diagnósticos disponibles actualmente se limitan a la detección de anticuerpos que, por lo general, es retrospectiva y de escasa ayuda en el tratamiento de los pacientes en su fase aguda. El cultivo no es considerado un método diagnóstico, tanto por su dificultad tecnológica, que lo excluye de las prácticas habituales en un laboratorio de microbiología de hospital, como por la necesidad de instalaciones P3.

El diagnóstico molecular por amplificación de genoma mediante PCR supone una opción diagnóstica de gran valor. Sin embargo, no siempre se dispone de suficiente cantidad de muestra clínica como para ensayarla frente a una amplia batería de patógenos o no se dispone de la metodología necesaria para realizar diferentes ensayos.

40 Recientemente se ha publicado un trabajo (Blaskovic D. et al. 2005. Oligo-based detection of tick-borne bacteria. FEMS Microbiology Letters 243:273-8), que describe un método para la detección de 5 de los 6 patógenos propuestos por la presente invención. Dicho método está basado en el análisis de ADN ribosomal y emplea cebadores universales, que amplifican material genético tanto de bacterias diana como de otras que no los son por lo que su sensibilidad es bastante reducida.

Otros métodos como el descrito 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 de ADN (espacio intergénico 16S-23S) empleada por la presente invención. Sin embargo, el número de especies dentro de este género ha aumentado sensiblemente desde el registro 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 similar del fragmento amplificado.

55 El método aportado por la presente invención propone también el empleo de la región intergénica 16S-23S para la detección de especies pertenecientes al género *Bartonella*, aunque se aplican mejoras respecto de procedimientos descritos, puesto que es capaz de detectar un grupo mucho más amplio de especies del mismo y otros géneros, utilizando sondas y cebadores completamente novedosos y con niveles de sensibilidad máximos.

60 Para la detección de *Coxiella burnetii*, la presente invención emplea los mismos cebadores y la misma región de ADN (secuencia de inserción IS1111) que métodos anteriormente descritos. Como mejora, dicha detección es ahora combinada con otra serie de pruebas completamente novedosas para la identificación de otras especies bacterianas, que pueden ser transmitidas por los mismos vectores, y además aporta una nueva sonda de hibridación para la detección de *Coxiella burnetii*.

### 65 Descripción de la invención

Definiciones: PCR Múltiple o PCR Multiplex: la PCR es un sistema de amplificación o aumento en el número de copias de una secuencia de nucleótidos concreta de un organismo, mediante el uso de dos cebadores. La PCR múltiple

## ES 2 264 642 A1

o PCR multiplex es una variante de la PCR, que permite la amplificación simultánea de más de una secuencia diana empleando más de un par de cebadores.

5 La presente invención consigue resolver el problema de lo tedioso y complicado que resulta detectar un elevado número de bacterias, que causan zoonosis que pueden ser clínica y/o epidemiológicamente indistinguibles, mediante el desarrollo de un método y un Kit de detección para la identificación simultánea de especies bacterianas causantes de zoonosis pertenecientes a los géneros: *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Borrelia*, *Bartonella*, *Coxiella*, *Rickettsia* y *Francisella*.

10 La solución encontrada por la presente invención consiste en analizar diferentes regiones del ADN bacteriano simultáneamente para determinar en cada caso que especies se encuentran presentes. En concreto se analiza el gen *16S rRNA* para la identificación de *Anaplasma*, *Ehrlichia* y *Borrelia*; el espacio intergénico *23S-5S rRNA* para *Rickettsia*; el gen que codifica para el precursor de la proteína principal de membrana *TULA* para *Francisella*; el gen de la *transposasa IS1111* para *Coxiella* y el espacio intergénico *16S-23S* para *Bartonella*.

15 De acuerdo con lo mencionado, un primer aspecto de la invención se refiere a un método para la detección de bacterias a partir de una muestra, que comprende los siguientes pasos:

- 20 i) poner en contacto la muestra a analizar con una mezcla de reacción, que contiene cebadores específicos para la realización de PCR Multiplex.
- ii) amplificar mediante reacción en cadena de la polimerasa.
- 25 iii) Identificar la formación de los productos del paso anterior, siendo dicha formación indicativa de la presencia o ausencia de bacterias causantes de zoonosis.

En relación con este primer aspecto de la invención, ésta proporciona un método para detectar simultáneamente:

- *Anaplasma phagocytophilum*, *A. bovis*, *A. equi*, *A. marginale*, *A. centrale* y *A. ovis*.
- 30 • *Ehrlichia chaffeensis* y *E. ewingii*
- *Bartonella henselae*, *B. quintana*, *B. clarridgeiae*, *B. elizabethae*, *B. grahamii*, *B. vinsonii subespecie berk-hofii*, *B. vinsonii subespecie vinsonii*, *B. vinsonii subespecie aurupensis*, *B. bacilliformis*, *B. alsatica*, *B. bovis*, *B. doshiae*, *B. koehlerae*, *B. schoenbuchensis*, *B. taylori* y *B. tribocorum*.
- 35 • Todas las especies del género *Borrelia*.
- *Coxiella burnetii*.
- 40 • Cualquier subespecie de *Francisella tularensis*, incluyendo *F. tularensis* subesp. *tularensis*, *F. tularensis* subesp. *holarctica* y *F. tularensis* subesp. *novicida*, que se detectan conjuntamente, y la variante 3523 de la misma especie y los denominados endosimbiontes de diferentes especies de ixódidos y argásidos, que se detectan diferencialmente.
- 45 • El género *Rickettsia*, el grupo de las mismas causantes de las fiebres manchadas y el grupo causante del tifus, las especies *Rickettsia akari*, *R. bellii*, *R. slovacica*, *R. conorii*, *R. aeschlimannii*, *R. rickettsii*, *R. sibirica*, *R. helvetica*, *R. felis*, *R. australis*, *R. prowazekii*, y *R. typhi* (*R. mooserii*).

50 todas ellas capaces de provocar zoonosis, infectar conjuntamente a un individuo y difíciles de identificar por la observación de los cuadros clínicos, mediante la amplificación y análisis de genes o regiones génicas concretas presentadas en las tablas 1-6.

55 En una realización particular de este primer aspecto de la invención, se amplifican fragmentos de ADN incluidos o comprendidos en las secuencias cuyos números de acceso se muestran en las siguientes tablas 1-6.

60 En una realización más particular de este primer aspecto de la invención, las regiones amplificadas tienen un tamaño de entre 99 y 686 nucleótidos y contienen regiones variables empleadas para la identificación. En una realización aun más preferida de la invención, las regiones variables contienen o están incluidas en las SEQ ID NO:55 a SEQ ID NO:93 o secuencias complementarias, cuyas posiciones se muestran en las tablas de 1 a 6.

65 En otra realización de este primer aspecto de la invención, los productos de amplificación, que permiten identificar los diferentes especies y grupos bacterianos son detectados mediante el empleo de sondas. En una realización más preferida, estas sondas tienen una longitud de entre 15 y 25 nucleótidos. Y en una realización aun más preferida, las sondas tienen secuencias que comprenden o están incluidas en las secuencias SEQ ID NO:3-6; SEQ ID NO:9-24; SEQ ID NO:27; SEQ ID NO:30; SEQ ID NO:33-35; SEQ ID NO:38-51; o secuencias complementarias (Tablas 1-6).

Los cebadores pueden ser diseñados mediante alineamiento múltiple con programas como CLUSTAL X, que permiten la identificación de regiones muy conservadas que sirven de molde. En otra realización particular de este primer

## ES 2 264 642 A1

aspecto de la invención los cebadores hibridan los genes indicados en las siguientes tablas de 1 a 6 y especialmente con secuencias cuyo número de acceso se muestra en las siguientes tablas 1-6. En una realización aun más particular los cebadores tienen secuencias que comprenden o están incluidas en las SEQ ID NO:1-2; SEQ ID NO:7-8; SEQ ID NO:25-26; SEQ ID NO:28-29; SEQ ID NO:31-32; SEQ ID NO:36-37; o secuencias complementarias.

Breve explicación de las tablas:

- En la columna 1 (organismo) se indica la especie o grupo de especies bacterianas que es detectado en cada caso.
- En la columna 2 (gen) se indica el gen o región del genoma que es empleado 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 región genómica indicada en cada tabla (columna 2).
- En la columna 4 (sonda) se indica la secuencia de las sondas que son empleadas para la detección de las la especie 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 (posición 5'-3'):
  - En la primera fila: 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 el cebador (columna 3).
  - Desde la fila 2 hasta la última de cada tabla, se indica un código de secuencia referente a un gen o región genómica referido en la columna 2, así como la posición concreta de dicha secuencia a la que se une la sonda (columna 4).

<b>Tabla 1: <i>Anaplasma</i> y <i>Ehrlichia</i>: secuencia de cada uno de los cebadores y sondas utilizados en el proceso y posición relativa de los mismos en el gen 16S rRNA.</b>					
ORGANISMO	GEN	CEBADOR	SONDAS	SECUENCIA 5'-3'	POSICIÓN 5'-3'
<i>Anaplasma spp</i> <i>Ehrlichia spp</i>	16S	SEQ ID 1 (16S/AE-F)			9-30 (U02521)
		SEQ ID 2 (16S/AE-R)			109-86 (U02521)
<i>Anaplasma phagocytophilum</i> <i>A. bovis</i> <i>A. equi</i>	16S	SEQ ID 1 (16S/AE-F)	SEQ ID 3 (S-PHA)	SEQ ID 57	52-73 (U02521)
		SEQ ID 2 (16S/AE-R)			8-29 (AF470698)
					8-29 (AF172167)
<i>Ehrlichia chaffeensis</i>	16S	SEQ ID 1 (16S/AE-F) SEQ ID 2 (16S/AE-R)	SEQ ID 4 (S-CHA)	SEQ ID 58	51-71 (AF147752)
<i>E. ewingii</i>	16S	SEQ ID 1 (16S/AE-F) SEQ ID 2 (16S/AE-R)	SEQ ID 5 (S-EWI)	SEQ ID 59	46-66 (U96436)
<i>A. marginale</i> <i>A. centrale</i> <i>A. ovis</i>	16S	SEQ ID 1 (16S/AE-F)	SEQ ID NO 6 (S-MCO)	SEQ ID 60	53-71 (AJ633048)
		SEQ ID 2 (16S/AE-R)			72-90 (AF414869)
					72-90 (AF414870)

Tabla 2: *Bartonella*: secuencia de cada uno de los cebadores y sondas utilizados en el proceso y posición relativa de los mismos en el espacio intergénico 16S-23S rRNA.

ORGANISMO	GEN	CEBADOR	SONDAS	SECUENCIA 5'-3'	POSICIÓN 5'-3'
<i>Bartonella spp.</i>	16S-23S	SEQ ID 7 (BAR/16-23F)			494-515 (AF369527)
		SEQ ID 8 (BAR/16-23R)			908-889 (AF369527)
<i>B. henselae</i>	16S-23S	SEQ ID 7 (BAR/16-23F) SEQ ID 8 (BAR/16-23R)	SEQ ID 9 (S-HENS)	SEQ ID 61	793-814 (AF369527)
<i>B. quintana</i>	16S-23S	SEQ ID 7 (BAR/16-23F) SEQ ID 8 (BAR/16-23R)	SEQ ID 10 (S-QUIN)	SEQ ID 62	622-641 (AF368396)
<i>B. clarridgeiae</i>	16S-23S	SEQ ID 7 (BAR/16-23F) SEQ ID 8 (BAR/16-23R)	SEQ ID 11 (S-CLAR)	SEQ ID 63	512-531 (AF312497)
<i>B. elizabethae</i>	16S-23S	SEQ ID 7 (BAR/16-23F) SEQ ID 8 (BAR/16-23R)	SEQ ID 12 (S-ELIZ)	SEQ ID 64	807-827 (L35103)
<i>B. grahamii</i>	16S-23S	SEQ ID 7 (BAR/16-23F) SEQ ID 8 (BAR/16-23R)	SEQ ID 13 (S-GRAH2)	SEQ ID 65	491-514 (AJ269790)
<i>B. vinsonii berkhofii</i>	16S-23S	SEQ ID 7 (BAR/16-23F) SEQ ID 8 (BAR/16-23R)	SEQ ID 14 (S-VIN-B)	SEQ ID 66	2242-2261 (AF143446)
<i>B. vinsonii arupensis</i>	16S-23S	SEQ ID 7 (BAR/16-23F) SEQ ID 8 (BAR/16-23R)	SEQ ID 15 (S-VIN-A1)	SEQ ID 67	686-706 (AF442952)
<i>B. vinsonii vinsonii</i>	16S-23S	SEQ ID 7 (BAR/16-23F) SEQ ID 8 (BAR/16-23R)	SEQ ID 16 (S-VIN-A2)	SEQ ID 68	821-841 (AF312504)
<i>B. bacilliformis</i>	16S-23S	SEQ ID 7 (BAR/16-23F) SEQ ID 8 (BAR/16-23R)	SEQ ID 17 (S-BACI)	SEQ ID 69	474-493 (AJ422181)
<i>B. alsatica</i>	16S-23S	SEQ ID 7 (BAR/16-23F) SEQ ID 8 (BAR/16-23R)	SEQ ID 18 (S-ALS)	SEQ ID 70	589-608 (AF312506)

Continuación Tabla 2: *Bartonella*: secuencia de cada uno de los cebadores y sondas utilizados en el proceso y posición relativa de los mismos en el espacio intergénico 16S-23S rRNA.

ORGANISMO	GEN	CEBADOR	SONDAS	SECUENCIA 5'-3'	POSICIÓN 5'-3'
<i>B. bovis</i>	16S-23S	SEQ ID 7 (BAR/16-23F) SEQ ID 8 (BAR/16-23R)	SEQ ID 19 (S-BOV2)	SEQ ID 71	455-478 (AY116638)
<i>B. doshiae</i>	16S-23S	SEQ ID 7 (BAR/16-23F) SEQ ID 8 (BAR/16-23R)	SEQ ID 20 (S-DOSH)	SEQ ID 72	724-743 (AJ269786)
<i>B. koehlerae</i>	16S-23S	SEQ ID 7 (BAR/16-23F) SEQ ID 8 (BAR/16-23R)	SEQ ID 21 (S-KOE)	SEQ ID 73	778-803 (AF312490)
<i>B. schoenbuchensis</i>	16S-23S	SEQ ID 7 (BAR/16-23F) SEQ ID 8 (BAR/16-23R)	SEQ ID 22 (S-SCHO2)	SEQ ID 74	446-466 (AY116639)
<i>B. taylori</i>	16S-23S	SEQ ID 7 (BAR/16-23F) SEQ ID 8 (BAR/16-23R)	SEQ ID 23 (S-TAY)	SEQ ID 75	655-673 (AJ269784)
<i>B. tribocorum</i>	16S-23S	SEQ ID 7 (BAR/16-23F) SEQ ID 8 (BAR/16-23R)	SEQ ID 24 (S-TRIB)	SEQ ID 76	692-713 (AF312505)

Tabla 3: *Borrelia*: secuencia de cada uno de los cebadores y sondas utilizados en el proceso y posición relativa de los mismos en el gen 16S rRNA.

ORGANISMO	GEN	CEBADOR	SONDAS	SECUENCIA 5'-3'	POSICIÓN 5'-3'
<i>Borrelia spp.</i>	16S	SEQ ID 25 (BOF-3)	[REDACTED]	[REDACTED]	336-356 (AJ224139)
		SEQ ID 26 (BOR)			567-547 (AJ224139)
<i>Borrelia</i>	16S	SEQ ID 25 (BOF-3) SEQ ID 26 (BOR)	SEQ ID 27 (SG-BOR3)	SEQ ID 77	364-383 (AJ224139)

**Tabla 4: *Coxiella*: secuencia de cada uno de los cebadores y sondas utilizados en el proceso y posición relativa de los mismos en la secuencia de inserción (transposasa) IS1111.**

ORGANISMO	GEN	CEBADOR	SONDAS	SECUENCIA 5'-3'	POSICIÓN 5'-3'
<i>Coxiella burnetii</i>	Transposasa IS1111	SEQ ID 28 (TRANS 1)			200-221 (M80806)
		SEQ ID 29 (TRANS 2)			885-865 (M80806)
<i>Coxiella burnetii</i>	Transposasa IS1111	SEQ ID 28 (TRANS 1) SEQ ID 29 (TRANS 2)	SEQ ID 30 (S-IS1111)	SEQ ID 78	520-539 (M80806)

**Tabla 5: *Francisella*: Gen amplificado, secuencia de cada uno de los cebadores y sondas utilizados en el proceso y posición relativa de los mismos.**

ORGANISMO	GEN	CEBADOR	SONDAS	SECUENCIA 5'-3'	POSICIÓN 5'-3'
<i>Francisella spp.</i>	17 kDa Tul4	SEQ ID 31 (FT594)			593-617 (M32059)
		SEQ ID 32 (FT827)			825-804 (M32059)
<i>F. tularensis</i>	17 kDa Tul4	SEQ ID 31 (FT594) SEQ ID 32 FT827	SEQ ID 33 (S-TUL)	SEQ ID 79	658-680 (M32059)
<i>Variante 3523</i>	17 kDa Tul4	SEQ ID 31 (FT594) SEQ ID 32 FT827	SEQ ID 34 (S-TUL3523)	SEQ ID 80	169-188 (AY243029)
<i>Endosimbiontes</i>	17 kDa Tul4	SEQ ID 31 (FT594) SEQ ID 32 (FT827)	SEQ ID 35 (S-ENDOS2)	SEQ ID 81	533-553 (AY375423)

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

**Tabla 6: Rickettsia: secuencia de cada uno de los cebadores y sondas utilizados en el proceso y posición relativa de los mismos en los genes 23S, 5S rRNA y el espacio intergénico 23S-5S rRNA.**

ORGANISMO	GEN	CEBADOR	SONDAS	SECUENCIA 5'-3'	POSICIÓN 5'-3'
<i>Rickettsia spp.</i>	23S-5S	SEQ ID 36 (RCK/23-5-F)			1-22 (AY125012)
		SEQ ID 37 (RCK/23-5-R)			388-367 (AY125012)
<i>Genérica</i>	23S-5S	SEQ ID 36 (RCK/23-5-F) SEQ ID 37 (RCK/23-5-R)	SEQ ID 38 (SG-RICK)	SEQ ID 82	51-71 (AY125012)
<i>Grupo de las Fiebres Manchadas</i>	23S-5S	SEQ ID 36 (RCK/23-5-F) SEQ ID 37 (RCK/23-5-R)	SEQ ID 39 (SG-SFG)	SEQ ID 83	123-141 (AY125012)
<i>R. akari</i>	23S-5S	SEQ ID 36 (RCK/23-5-F) SEQ ID 37 (RCK/23-5-R)	SEQ ID 40 (S-AKA4)	SEQ ID 84	291.105-291.126 (AAFE01000001)
<i>R. bellii</i>	23S-5S	SEQ ID 36 (RCK/23-5-F) SEQ ID 37 (RCK/23-5-R)	SEQ ID 41 (S-BELLII)	SEQ ID 85	2721-2743 (U11015)
<i>R. slovaca</i>	23S-5S	SEQ ID 36 (RCK/23-5-F) SEQ ID 37 (RCK/23-5-R)	SEQ ID 42 (S-SLO)	SEQ ID 86	194-211 (AY125009)
<i>R. conorii</i>	23S-5S	SEQ ID 36 (RCK/23-5-F) SEQ ID 37 (RCK/23-5-R)	SEQ ID 43 (S-CON)	SEQ ID 87	186-204 (AY125012)
<i>R. aeschlimannii</i>	23S-5S	SEQ ID 36 (RCK/23-5-F) SEQ ID 37 (RCK/23-5-R)	SEQ ID 44 (S-AESCH)	SEQ ID 88	183-204 (AY125016)
<i>R. rickettsii</i> <i>R. sibirica</i>	23S-5S	SEQ ID 36 (RCK/23-5-F) SEQ ID 37 (RCK/23-5-R)	SEQ ID 45 (S-RI/SI)	SEQ ID 89	2814-2833 (U11022)
<i>R. helvetica</i>	23S-5S	SEQ ID 36 (RCK/23-5-F) SEQ ID 37 (RCK/23-5-R)	SEQ ID 46 (S-HELV)	SEQ ID 90	360-342 (AY125017)
<i>R. felis</i>	23S-5S	SEQ ID 36 (RCK/23-5-F) SEQ ID 37 (RCK/23-5-R)	SEQ ID 47 (S-FEL)	SEQ ID 55	186-207 (SEQ ID 55)

**Continuación Tabla 6: Rickettsia: secuencia de cada uno de los cebadores y sondas utilizados en el proceso y posición relativa de los mismos en los genes 23S, 5S rRNA y el espacio intergénico 23S-5S rRNA.**

ORGANISMO	GEN	CEBADOR	SONDAS	SECUENCIA 5'-3'	POSICIÓN 5'-3'
<i>R. australis</i>	23S-5S	SEQ ID 36 (RCK/23-5-F) SEQ ID 37 (RCK/23-5-R)	SEQ ID 48 (S-AUS)	SEQ ID 56	230-249
<i>Grupo Tifus</i>	23S-5S	SEQ ID 36 (RCK/23-5-F) SEQ ID 37 (RCK/23-5-R)	SEQ ID 49 (SG-TG)	SEQ ID 91	2804-2827 (U11018)
<i>R. prowazekii</i>	23S-5S	SEQ ID 36 (RCK/23-5-F) SEQ ID 37 (RCK/23-5-R)	SEQ ID 50 (S-PROW)	SEQ ID 92	2824-2846 (U11018)
<i>R. typhi</i> ( <i>R. mooserii</i> )	23S-5S	SEQ ID 36 (RCK/23-5-F) SEQ ID 37 (RCK/23-5-R)	SEQ ID 51 (S-TYPHI)	SEQ ID 93	188-211 (AY125019)

Dada la gran abundancia de inhibidores de PCR, tales como los ácidos húmico y fúlvico, metales pesados, heparina, etc. que pueden dar lugar a falsos negativos, y aunque existen métodos que reducen la concentración este tipo de moléculas, es recomendable (cf. J. Hoorfar *et al.*, "Making internal Amplification control mandatory for diagnostic PCR" J. of Clinical Microbiology, Dec. 2003, pp.5835) que las pruebas de PCR contengan un Control Interno de Amplificación (CIA). Este CIA no es más que un fragmento de ADN, que se amplifica simultáneamente con la muestra diana, de tal modo que su ausencia al final de las pruebas es indicativa de la presencia de factores, que han provocado un indeseado desarrollo de la PCR.

Un segundo aspecto de la invención se relaciona con un método similar al descrito en el primer aspecto de la misma, incluyendo al menos un CIA, preferentemente constituido por una secuencia de ADN del gen de la *Tetrahydrocannabinólico Sintasa* de la especie *Cannabis sativa* y más preferentemente con la secuencia con número de acceso AB183705.

En una realización más preferida se amplifica una región de la secuencia AB183705 cuya secuencia comprende o está incluida en la SEQ ID NO 94 o secuencias complementarias (Tabla 7).

En una realización también preferida, la amplificación de la región se lleva a cabo mediante cebadores específicos cuyas secuencias comprenden o están incluidas en las SEQ ID NO 52 y SEQ ID NO 53 o secuencias complementarias.

A lo largo de la descripción, el término "específicos" implica que los cebadores comprenden una secuencia nucleotídica totalmente complementaria a los genes o fragmentos génicos empleados por la presente invención.

Los términos "regiones variables" hacen referencia a secuencias de ADN a que permiten la identificación de las especies y grupos bacterianos, que son identificados por la presente invención.

**Tabla 7: Control interno: Gen amplificado, secuencia de cada uno de los cebadores y sondas utilizados en el proceso y posición relativa de los mismos.**

ORGANISMO	GEN	CEBADOR	SONDAS	SECUENCIA 5'-3'	POSICIÓN 5'-3'
CIA ( <i>Cannabis sativa</i> )	THC Sintasa	SEQ ID 52 (CI-F)			77-99 (AB183705)
		SEQ ID 53 (CI-R)			447-427 (AB183705)
<i>Cannabis sativa</i>	THC Sintasa	SEQ ID 52 (CI-F) SEQ ID 53 (CI-R)	SEQ ID 54 (S-C12)	SEQ ID 94	281-302 (AB183705)

En otra realización del segundo aspecto de la invención, la detección de la amplificación del CIA se realiza mediante hibridación con sondas. En una realización más preferida, estas sondas tienen una longitud de entre 15 y nucleótidos. Y en una realización aun más preferida, las sondas tienen una secuencia que comprenden o están incluidas en la SEQ ID NO 54 o secuencias complementarias.

## ES 2 264 642 A1

Con el método proporcionado por la presente invención es posible detectar las bacterias y grupos bacterianos mencionados, independientemente de la procedencia de las muestras. Dichas muestras pueden haber sido obtenidas a partir de biopsias, raspados, insectos, fluidos biológicos (sangre, orina, saliva, etc.), campo, etc. La muestra una vez tomada es pretratada para poder llevar a cabo una PCR Múltiple y una posterior identificación de los amplicones.

La invención también proporciona kits de diagnóstico para llevar a cabo el método descrito por la invención que comprenden:

- Cebadores específicos de secuencia: SEQ ID 1-2, SEQ ID 7-8, SEQ ID 25-26, SEQ ID 28-29, SEQ ID 31-32, SEQ ID 36-37 y opcionalmente SEQ ID 52 y 53 como CIA.
- Las sondas de secuencia: SEQ ID 3-6, SEQ ID 9-24, SEQ ID 27, SEQ ID 30, SEQ ID 33-35, SEQ ID 38-51 y opcionalmente SEQ ID 54 (S-C12) como CIA.

Del mismo modo, los kits pueden incluir todos aquellos reactivos necesarios para llevar a cabo cualquiera de los métodos descritos. Esto incluye, sin ningún tipo de limitación, el uso de tampones, polimerasas, cofactores para obtener una actividad óptima de éstas, agentes para prevenir la contaminación, etc. Por otro lado los kits pueden incluir todos los soportes y recipientes necesarios para su puesta en marcha y optimización.

Las ventajas del presente método y de los kits para llevarlo a cabo son: velocidad (posible detectar 39 especies y grupos bacterianos en menos de 8 horas), especificidad (los iniciadores empleados son específicos de cada especie o grupo de bacterias) y la elevada sensibilidad.

A lo largo de toda la descripción y reivindicaciones de la especificación, la palabra “comprende” y las variaciones de la misma, tal como “comprendiendo”, no pretende excluir otros aditivos, componentes, integrantes o etapas. Tanto el ejemplo de realización, como los dibujos que acompañan no pretenden ser limitantes de la invención, sino que deben ser tomados como un apoyo para la mejor comprensión de ésta.

### Descripción de las figuras

Figura 1.- Membrana de hibridación muestra la validación de los cebadores, las sondas y las regiones variables para la detección de especies de *Anaplasma* y *Ehrlichia* (A), *Borrelia* (B), *Francisella* (C), *Bartonella* (D) y *Coxiella* (E), mediante el uso de sondas específicas (Tablas 1-5). La sonda S-C12 hace referencia a la sonda (Tabla 7) que es empleada para el CIA.

Figura 2: A) Membrana de hibridación muestra la validación de los cebadores, las sondas y las regiones variables para la detección de especies de *Rickettsia*; B) Membrana de hibridación que muestra un ejemplo de la realización de detección la simultánea de especies pertenecientes a los 7 géneros. En este ejemplo: *A. phagocytophilum*, *A. marginale*, *E. chaffeensis*, *E. ewingi*, *B. henselae*, *B. burgdorferi*, *F. tularensis tularensis*, *R. conorii* y *R. prowazekii*, ensayados a  $10^3$ ,  $10^2$  y  $10$  equivalentes de genoma/copias. En ambos casos (A y B) se emplea la sonda S-C12 que hace referencia a la sonda (Tabla 7) que es empleada para el CIA.

Figura 3: Membrana de hibridación que muestra los resultados de la realización de un estudio de especificidad del grupo de sondas indicadas (Tablas 1-7) frente a diferentes especies bacterianas, artrópodos y mamíferos. El resultado muestra que en ningún caso las sondas se unen a muestras procedentes de los organismos ensayados. La sonda S-C12 hace referencia a la sonda (Tabla 7) que es empleada para el CIA.

### Ejemplo de realización

#### Alineamientos, diseños de cebadores y sondas

Por comparación y alineamientos múltiples de secuencias obtenidas a partir de bases de datos públicas como Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), se identificaron regiones conservadas, a partir de las cuales se diseñaron cebadores específicos (Tablas 1-6) para su empleo en PCR múltiple. La compatibilidad entre los cebadores, así como la concentración óptima, se comprobó empíricamente, igual que se realizó con la concentración de sales de magnesio y albúmina bovina sérica.

A partir de los alineamientos de las secuencias seleccionadas se identificaron regiones variables, que permitieron el diseño de sondas para la diferenciación entre las diferentes especies bacterianas y grupos génicos (Tablas 1 - 6), mediante RLB (Reverse Line Blotting) (kaufhold A, Podbielski A, Baumgarten G, Blokpoel M, Top J, Schouls L. Rapid typing of group-a streptococci by the use of DNA amplification and nonradioactive allele-specific oligonucleotide probes. FEMS Microbiology Letters 119: 19-25 (1994)).

Un primer análisis de la especificidad de cada uno de las sondas se realizó mediante su comparación de su secuencia con bases de datos públicas (genbank) empleando programas tales como BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). La especificidad se demostró posteriormente con ensayos frente una variedad de muestras de ADN de diferentes especies bacterianas y eucarióticas (Figura 3).

## ES 2 264 642 A1

### *Medio de cultivo y aislamiento de ADN*

Las especies y grupos génicos seleccionados para su identificación se obtuvieron de colecciones privadas, de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) y/o el banco de muestras disponibles en el Centro Nacional de Microbiología (CNM). Todas las especies analizadas se muestran en la tabla 8.

El aislamiento del material genético fue realizado por procedimientos disponibles comercialmente y sobradamente conocidos en el estado de la técnica (DNA Mini Kit, Qiagen, N. Referencia: 51304).

10

TABLA 8

*Origen de los ADN utilizados en la invención*

15

Organismo	DNA nativo (origen)	DNA sintético*
<i>Anaplasma phagocytophllum</i>	X (1)	
20 <i>A. marginale</i>	X (1)	
<i>Ehrlichia chaffeensis</i>		X
<i>E. ewingii</i>		X
25 <i>Borrelia burgdorferi</i>	X (2)	
<i>B. garinii</i>	X (2)	
30 <i>B. afzelii</i>	X (2)	
<i>B. lusitaniae</i>	X (2)	
<i>B. japónica</i>	X (2)	
35 <i>B. hermsii</i>	X (2)	
<i>B. parkeri</i>	X (2)	
40 <i>Francisella tularensis tularensis</i>	X (3)	
<i>F. tularensis subespecie holarctica</i>	X (3)	
<i>F. tularensis subesp. Novicida</i>	X (3)	
45 <i>Francisella variante 3523</i>		X
<i>Francisella Endosimbiontes</i>		X
50 <i>Bartonella alsatica</i>	X (4)	
<i>B. bacilliformis</i>	X (4)	
<i>B. bovis</i>	X (4)	
55 <i>B. clarridgeiae</i>	X (4)	
<i>B. doshiae</i>	X (4)	
60 <i>B. elizabethae</i>	X (4)	
<i>B. grahamii</i>	X (4)	
<i>B. henselae</i>	X (4)	
65 <i>B. koehlerae</i>	X (4)	

# ES 2 264 642 A1

TABLA 8 (continuación)

	Organismo	DNA nativo (origen)	DNA sintético*
5	<i>B. quintana</i>	X (4)	
	<i>B. schoenbuchensis</i>	X (4)	
10	<i>B. taylorii</i>	X (4)	
	<i>B. tribocorum</i>	X (4)	
	<i>B. vinsonii subesp. Arupensis</i>	X (4)	
15	<i>B. vinsonii subesp. Berkhofii</i>	X (4)	
	<i>B. vinsonii subesp. Vinsonii</i>	X (4)	
20	<i>Coxiella burnetii</i>	X (5)	
	<i>Rickettsia aeschlimannii</i>		X
	<i>R. akari</i>	X (5)	
25	<i>R. australis</i>	X (5)	
	<i>R. bellii</i>	X (5)	
30	<i>R. conori</i>	X (5)	
	<i>R. felis</i>	X (5)	
	<i>R. Helvetica</i>	X (5)	
35	<i>R. rickettsii</i>	X (5)	
	<i>R. sibirica</i>		X
40	<i>R. slovacca</i>	X (5)	
	<i>R. prowazekii</i>		X
	<i>R. typhi</i>	X (5)	
45	<i>Brucella melitensis</i>	X (6)	
	<i>Chlamydia pneumoniae</i>	X (7)	
50	<i>C. psittaci</i>	X (7)	
	<i>Escherichia coli</i>	X (6)	
	<i>Legionella pneumophila</i>	X (8)	
55	<i>Leptospira interrogans</i>	X (4)	
	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	X (7)	
60	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	X (4)	
	<i>Orientia tsutsugamushi</i>	X (5)	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	X (4)	
65	<i>Salmonella enterica Typhi</i>	X (4)	

## ES 2 264 642 A1

TABLA 8 (continuación)

	Organismo	DNA nativo (origen)	DNA sintético*
5	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	X (6)	
	<i>Treponema pallidum</i>	X (7)	
10	<i>Ixodes ricinus</i>	X (9)	
	<i>Dermacentor marginatus</i>	X (9)	
	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	X (9)	
15	<i>Apodemus sylvaticus</i>	X (9)	
	ADN humano	X (10)	
20	Control Interno		X

### Origen del ADN natural

25 1: Muestra positiva

2: Medio de cultivo axénico, según se describe en:

30 Benach JL, Coleman JL, and Golightly MG. 1988. A murine monoclonal antibody binds an antigenic determinant in outer surface protein A, an immunodominant basic protein of the Lyme disease spirochete. *J. Immunol.* 140:265-72.

3: Medio de cultivo axénico, según se describe en:

35 Anda P, Segura del Pozo J, Diaz Garcia JM, Escudero R, Garcia Peña FJ, Lopez Velasco MC, Sellek RE, Jimenez Chillaron MR, Sanchez Serrano LP, Martinez Navarro JF. 2001. Waterborne outbreak of tularemia associated with crayfish fishing. *Emerg. Infect. Dis.* 7 (Suppl):575-82.

4: Composición de los medios de cultivo axénicos específicos para cada especie disponible en:

40 <http://cip.pasteur.fr/index.html.en>

5: Propagación en cultivos celulares mediante la técnica de “shell vial”, según se describe en:

45 Marrero M, Raoult D. 1989. Centrifugation-shell vial technique for rapid detection of Mediterranean spotted fever rickettsia in blood culture. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 40: 197-9.

6: Agar “Mueller Hinton” suplementado con 5% de sangre de carnero.

50 7: ADN extraído de portaobjetos para inmunofluorescencia indirecta de origen comercial.

8: Medio de cultivo axénico según se describe en:

55 Edeistein PH. 1981. Improved semiselective medium for isolation of *Legionella pneumophila* from contaminated clinical and environmental samples. *J. Clin. Microbiol.* 14:298-303.

9: ADN extraído de ejemplares libres de patógenos.

10: ADN extraído de muestras clínicas de pacientes con enfermedad no relacionada.

60 • *ADN sintético*

65 El ADN sintético se preparó en base a las correspondientes secuencias citadas en las tablas 1 a 7 (Columna 6), mediante sucesiva elongación por PCR de la cadena de ADN, utilizando cebadores de aproximadamente 70 nucleótidos, solapados entre sí en aproximadamente 20 nucleótidos.

## ES 2 264 642 A1

### Amplificación, hibridación y validación

En este paso se procede a realizar el análisis experimental de las zonas variables detectadas anteriormente mediante PCR para su validación. El ADN aislado se amplificó por PCR (Saiki *et al.*, (1985) Science 230, 1350;1354), 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 para tal efecto.

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 para un volumen final de 50  $\mu$ L:

- H<sub>2</sub>O: En función del volumen de ADN
- Buffer Taq Gold LD: 9  $\mu$ L
- Cl<sub>2</sub>Mg [3 mM]: 6  $\mu$ L
- dNTPs [200 mM]: 1  $\mu$ L x 4
- BSA [0,8 ug/uL]: 4  $\mu$ L
- 14 Cebadores específicos (SEQ ID 1-2, SEQ ID 7-8, SEQ ID 25-26, SEQ ID 28-29, SEQ ID 31-32, SEQ ID 36-37, SEQ ID 52-53) [50 pm/ $\mu$ L]: 0,5  $\mu$ L de cada uno (7  $\mu$ L)
- Taq Gold LD: 0,5  $\mu$ L [2,5 unidades]
- 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. 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 (Figura 1 y 2A):

- 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

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

### Preparación de muestras y PCR múltiple

Una de las ventajas de los sistemas de identificación basados en análisis por 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 1-6, preparadas siguiendo los procedimientos citados en la tabla 8 y analizándolas por duplicado, se procedió a la realización de un análisis por PCR múltiple de una mezcla de ADN control preparada en laboratorio, seguido de la prueba de RLB, empleando los cebadores y sondas específicas diseñados, los ciclos de temperatura y la composición de mezcla de reacción indicados anteriormente cuyos resultados se muestran en la figura 2B. En la dicha figura se aprecia que es posible realizar la detección simultánea de aquellas especies bacterianas que estaban presentes en la muestra.

*Detección de inhibidores de PCR*

Para la detección de inhibidores de PCR, se construyó un control de interno de amplificación (CIA) que fuese amplificado junto los ADN diana, utilizando cebadores específicos (Tabla 7), que fueron diseñados a partir de regiones conservadas de la secuencia AB183705 (Tabla 7) 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 (Tabla 7) para su detección durante el RLB.

*Especificidad del método*

La alta especificidad del presente método está basada de la especificidad de los cebadores y sus sondas, los cuales fueron probados con otra serie de organismos (Tabla 9), siguiendo el método descrito por la presente invención, comprobándose que en ningún caso se detectaba la formación de amplicones detectables mediante hibridación (Figura 3).

TABLA 9

*Especificidad: especies bacterianas no relacionadas y de artrópodos y mamíferos utilizadas durante la puesta a punto del método*

	Especie	Resultado RLB
	Bacterias	
1	<i>Brucella melitensis</i>	Negativo
2	<i>Chlamydia penumoniae</i>	Negativo
3	<i>C. psittaci</i>	Negativo
4	<i>Escherichia coli</i>	Negativo
5	<i>Legionella pneumophila</i>	Negativo
6	<i>Leptospira interrogans</i>	Negativo
7	<i>Mycoplasma penumoniae</i>	Negativo
8	<i>Ochrobactrum antropi</i>	Negativo
9	<i>Orientia tsutsugamushi</i>	Negativo
10	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Negativo
11	<i>Salmonella enterica Typhi</i>	Negativo
12	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Negativo
13	<i>Treponema pailidum</i>	Negativo
	Artrópodos	
14	<i>Ixodes ricinos</i>	Negativo
15	<i>Dermacentor marginatus</i>	Negativo
16	<i>Ripicephalus sanguineus</i>	Negativo
	Mamíferos	
17	<i>Apodemus sylvaticus</i>	Negativo
18	Humano	Negativo

## ES 2 264 642 A1

### REIVINDICACIONES

1. Método para la detección simultánea de especies bacterianas causantes de zoonosis pertenecientes a los géneros: *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Bartonella*, *Borrelia*, *Coxiella*, *Francisella* y *Rickettsia* que comprende:

- a. Poner en contacto la muestra a analizar con una mezcla de reacción que comprenda cebadores específicos que amplifiquen las secuencias: SEQ ID 55-93.
- b. Amplificar mediante reacción en cadena de la polimerasa.
- c. Identificar la formación de productos del paso anterior, siendo dicha formación indicativa de la presencia o ausencia de bacterias causantes de zoonosis.

2. Método según la reivindicación 1 donde las especies bacterianas detectadas son:

- a. *Anaplasma phagocytophilum*, *A. bovis*, *A. equi*, *A. marginale*, *A. centrale* y *A. ovis*.
- b. *Ehrlichia chaffeensis* y *E. ewingii*.
- c. *Bartonella henselae*, *B. quintana*, *B. clarridgeiae*, *B. elizabethae*, *B. grahamii*, *B. vinsonii* subespecie *berk-hofii*, *B. vinsonii* subespecie *vinsonii*, *B. vnisonii* subespecie *arupensis*, *B. bacilliformis*, *B. alsatica*, *B. bovis*, *B. doshiae*, *B. koehlerae*, *B. schoenbuchensis*, *B. taylori* y *B. tribocorum*.
- d. Especies del género *Borrelia*.
- e. *Coxiella burnetii*.
- f. *Francisella turalensis* subesp. *holarctica* y *F. tularensis* subesp. *novicida*, la variante 3523 de *Francisella turalensis* y el grupo endosimbionte de *Francisella*.
- g. Especies causantes de las fiebres manchadas y el grupo causante del tifus, las especies *Rickettsia akari*, *R. bellii*, *R. slovacica*, *R. conorii*, *R. aeschlimannii*, *R. rickettsii*, *R. sibirica*, *R. helvetica*, *R. felis*, *R. australis*, *R. prowazekii*, y *R. typhi*.

3. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde los cebadores comprenden las secuencias SEQ ID 1, 2, 7, 8, 25, 26, 28, 29, 31, 32, 36, 37.

4. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde la detección simultánea de los productos de amplificación se realiza mediante sondas que comprenden las secuencias SEQ ID 3-6, 9-24, 27, 30, 33-35, 38-51.

5. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende al menos un control de amplificación interno.

6. Método según la reivindicación 5, en donde el control de amplificación interno comprende:

- a. La amplificación de la SEQ ID 94 con cebadores específicos.
- b. Detección de la formación del producto de amplificación del paso anterior.

7. Método según la reivindicación 6, en donde los cebadores específicos tienen las secuencias 52 y 53.

8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 5-7, donde la detección del producto de amplificación es llevada a cabo mediante la sonda de SEQ ID 54.

9. Cebadores de SEQ ID 1, 2, 7, 8, 25, 26, 28, 29, 31, 32, 36 y 37, **caracterizados** porque son capaces de amplificar las secuencias definidas según la reivindicación 1.

10. Cebador de SEQ ID 52 y 53, **caracterizados** porque son capaces de amplificar la secuencia definida según la reivindicación 6.

11. Sondas de secuencia SEQ ID 3-6, 9-24, 27, 30, 33-35 y 38-51, **caracterizadas** porque son capaces de hibridar con las secuencias definidas según la reivindicación 1.

12. Sonda de SEQ ID 54, **caracterizada** porque es capaz de hibridar con la secuencia definida según la reivindicación 8.

13. Kit de diagnóstico capaz de llevar a cabo el método según las reivindicaciones 1 a 8.

## ES 2 264 642 A1

14. Kit según la reivindicación anterior que comprende cebadores según las reivindicaciones 9 y 10.

15. Kit según la reivindicación anterior que comprende sondas según las reivindicaciones 11 y 12.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

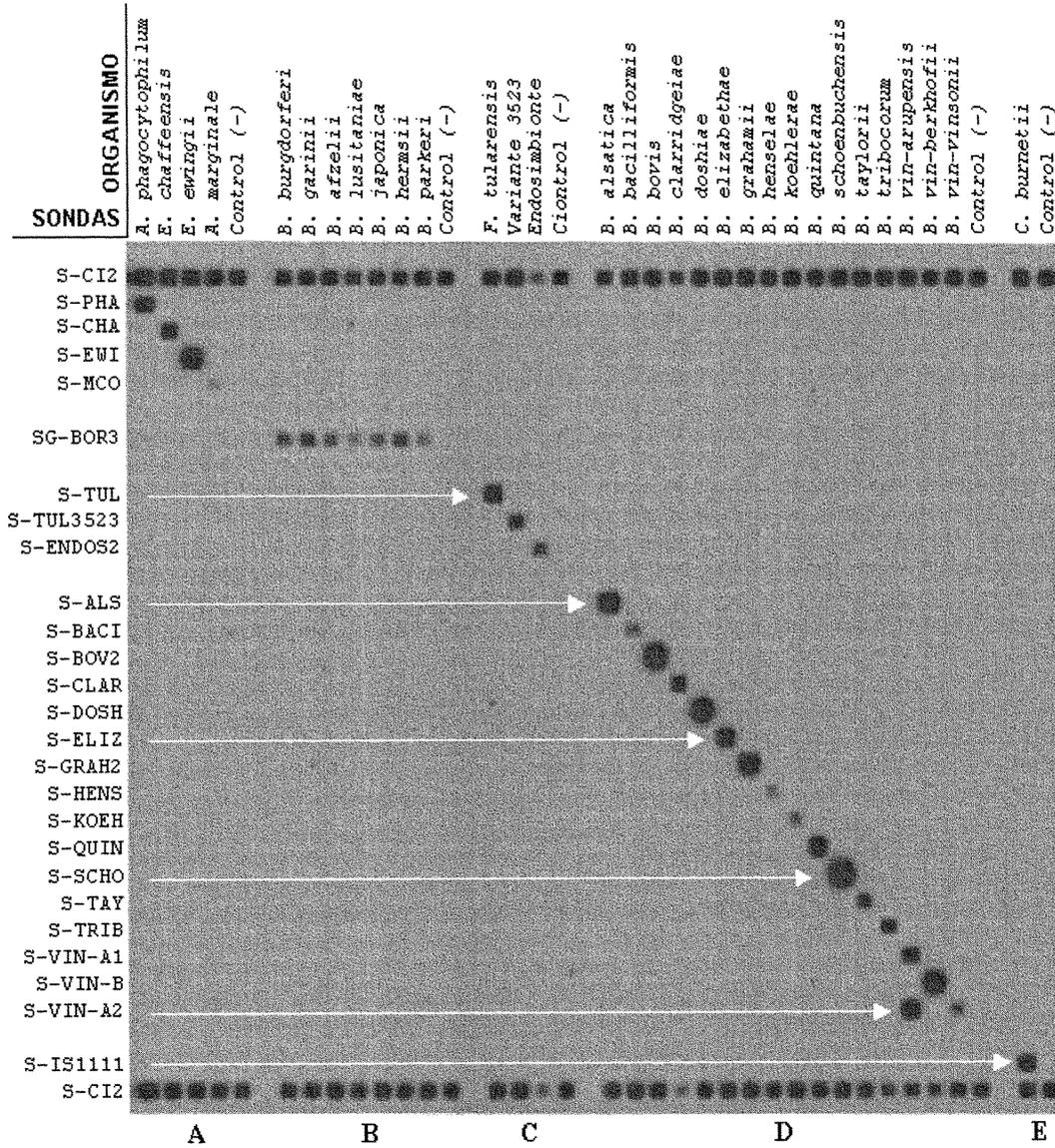


FIGURA 1

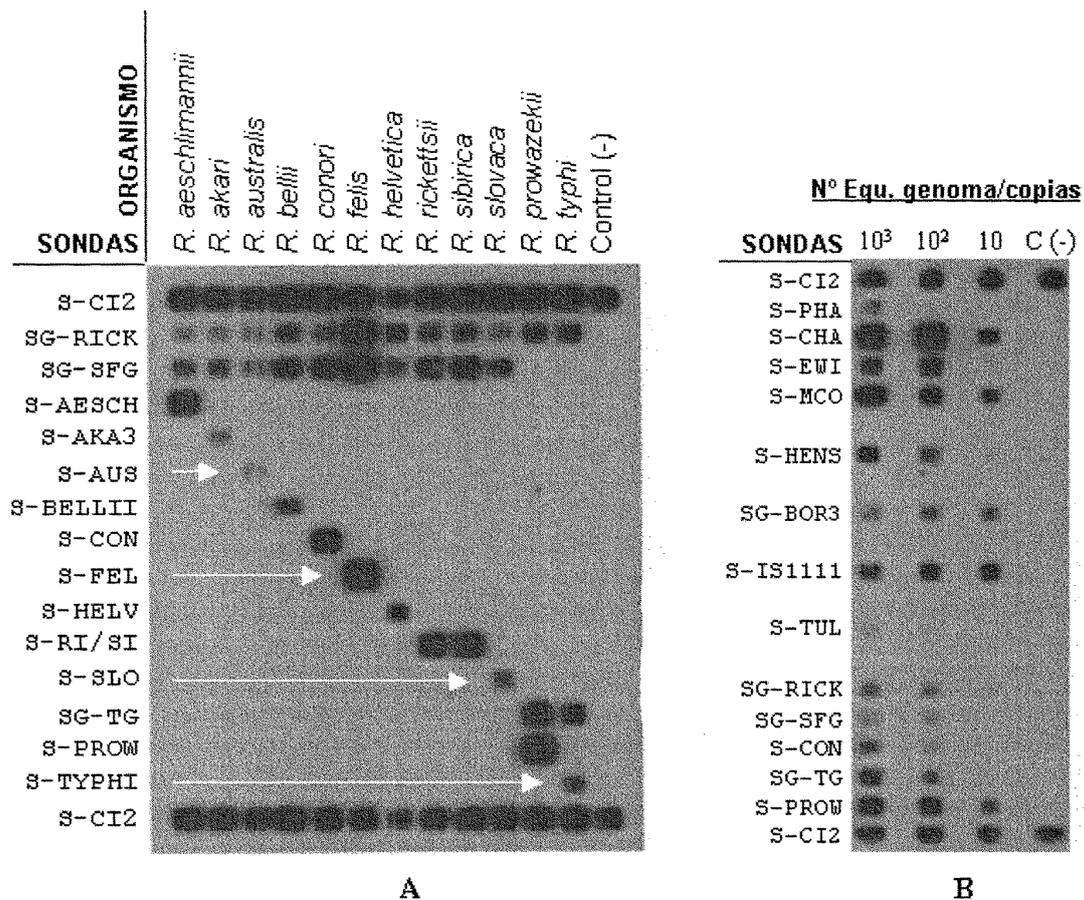


FIGURA 2

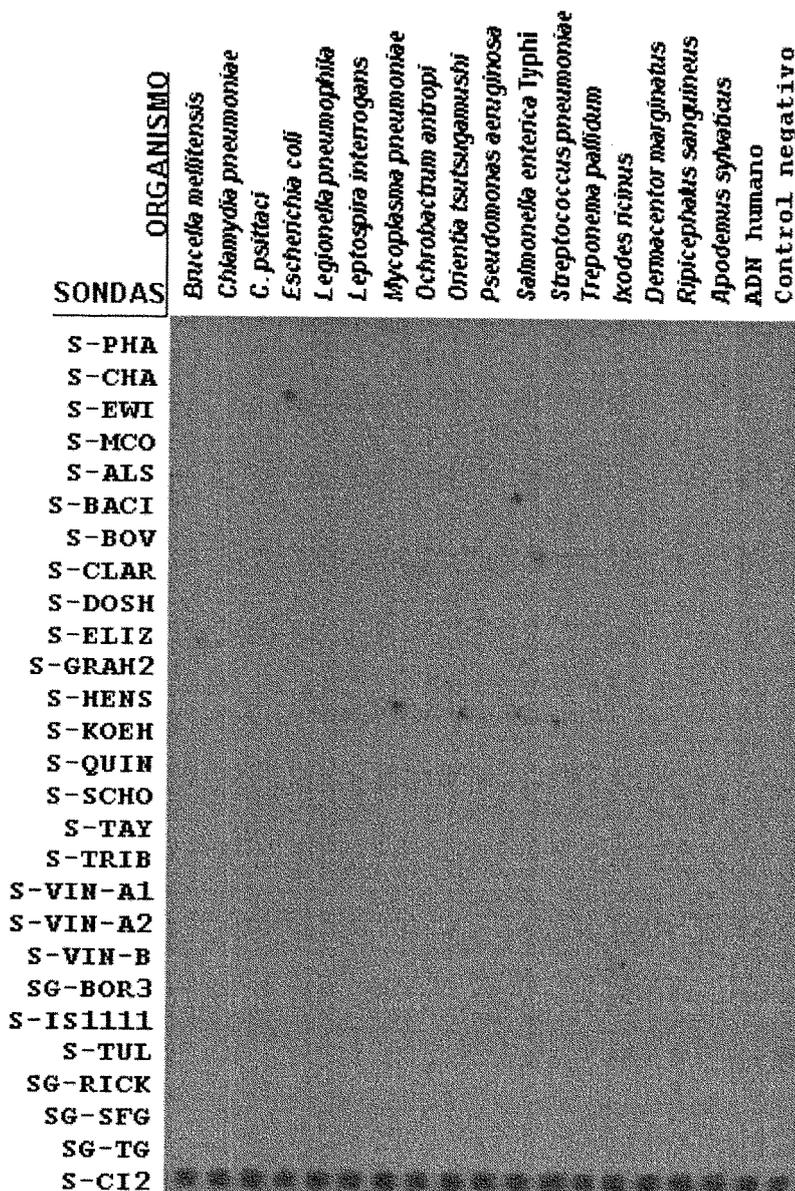


FIGURA 3



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 264 642

② Nº de solicitud: 200501481

③ Fecha de presentación de la solicitud: 17.06.2005

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	COIRAS, M.T., et al. Oligonucleotide array for simultaneous detection of respiratory viruses using a reverse-line blot hybridization assay. J. Med. Virol. Junio 2005, Vol. 76, páginas 256- 264. Publicado on line el 15 de abril de 2005; todo el documento.	
A	BEKKER, C.P.J., et al. Simultaneous detection of Anaplasma and Erlichia species in ruminants and detection of Erlichia rumiantium and Amblyomma variegatum ticks by reverse line blot hybridization. Vet. Microbiol. 22 de octubre de 2002, Vol. 89, nº 2-3, páginas 223-238; todo el documento.	
A	SCHOULS, L. M., et al. Detection and identification of Erlichia, Borrelia burgdorferi Sensu Lato, and Bartonella species in dutch Ixodes ricinus ticks. J. Clin. Microbiol. Julio 1999, Vol 37, nº 7, páginas 2215-2222; todo el documento.	
A	EP 1013775 A1 (LUTZ, H.) 20.06.2000, secuencia nº 42. & Base de datos EMBL, Hinxton, UK; 16.09.2000; [en línea]; LUTZ, H. "Quantitative polymerase chain reaction using a fluorogenic real-time detection system"; número de acceso AX027227; todo el documento.	

**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**

24.11.2006

**Examinador**

B. Pérez Esteban

**Página**

1/3



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 264 642

② Nº de solicitud: 200501481

③ Fecha de presentación de la solicitud: 17.06.2005

④ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	JP 2004283153 A (SHIGETA DOBUTSU YAKUHHIN KOGYO KK) 14.10.2004, (resumen) WPI [en línea] Londres (Reino Unido): Derwent Publications, Ltd. [recuperado el 18.10.2006]. Recuperado de: EPOQUENET, EPO, DW200472, nº de acceso 2004- 731893 [72]. & Base de datos GSN, 30.12.2004; [en línea]; SHIGETA DOBUTSU YAKUHHIN KOGYO KK "Hyghly precise and rapid detection method of Q fever causing microbe, Coxiella burnetii, involves performing PCR using primers, and blood, egg, milk, excrement, animal organs, hair, biological fluid, bone, etc., as samples"; números de acceso ADT48981 y ADT48982; todo el documento.	
A	WO 02070728 A2 (THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY) 12.09.2002, todo el documento.	

#### 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

24.11.2006

Examinador

B. Pérez Esteban

Página

2/3

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

**C12Q 1/68** (2006.01)

**C07H 21/04** (2006.01)

**G01N 33/569** (2006.01)