

19

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 522 523**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.06.2006 E 10173990 (2)**97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.08.2014 EP 2267162**54 Título: **Cebadores, sondas y kits para la detección de especies bacterianas que pertenecen al género Rickettsia**

30 Prioridad:

17.06.2005 ES 200501481
17.06.2005 US 691231 P45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.11.2014

73 Titular/es:

INSTITUTO DE SALUD CARLOS III (100.0%)
Sinesio Delgado, 6
28029 Madrid, ES

72 Inventor/es:

ANDA FERNANDEZ, PEDRO;
ESCUDERO NIETO, RAQUEL;
JADO GARCIA, ISABEL;
RODRIGUEZ MORENO, ISABEL y
JIMENEZ ALONSO, MARÍA ISABEL

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel**ES 2 522 523 T3**

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

DESCRIPCIÓN

Cebadores, sondas y kits para la detección de especies bacterianas que pertenecen al género *Rickettsia*

- 5 La presente invención se refiere a la detección e identificación de especies bacterianas que provocan zoonosis, basada en el análisis de ADN. Más específicamente, la invención proporciona cebadores y kits para la detección de bacterias pertenecientes al género *Rickettsia* basados en la amplificación de ADN.

Antecedentes

- 10 Hasta la fecha hay descritas unas 200 enfermedades zoonóticas (bartonelosis, leptospirosis, borreliosis de Lyme...) que afectan a seres humanos. 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.

- 15 Determinados tipos de zoonosis se están difundiendo ahora 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 hallazgo frecuente de artrópodos infectados por más de uno de los patógenos incluidos en la presente invención, aumentan la posibilidad de que se transmita más de una de las especies bacterianas incluidas en la presente invención en una única picadura.

- 25 Como resultado, cada vez son más comunes las hospitalizaciones debidas a cuadros clínicos producidos por el contacto de seres humanos con animales o con diferentes clases de artrópodos, tales como mosquitos, garrapatas, pulgas, piojos, ácaros, etc., que 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 patógeno, por lo que no es posible un tratamiento específico y rápido, y en ocasiones se administra 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 estados de fase aguda. El cultivo no se considera 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.

- 35 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 muestras clínicas para ensayos de patógenos o de la metodología necesaria para realizar diferentes ensayos.

- 40 VITORINO LILIANA ET AL: "rRNA intergenic spacer regions for phylogenetic analysis of *Rickettsia* species." ANNALS OF THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES JUN 2003 LNKD- PUBMED:12860714, vol. 990, Junio 2003 (2003-06), páginas 726-733, ISSN: 0077-8923 desvela un par de cebadores para amplificar el espaciador intergénico rrl-rrf en varias especies de *Rickettsia*. Los amplicones producidos comprenden las secuencias espaciadoras 23S – 5S de las especies *R.bellii*, *R.slovaca*, *R.conorii*, *R.aeschlimannii*, *R.rickettsii*, *R.helvetica*, *R.typhi* y *R.prowazekii*.

- 45 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 ribosómico y emplea cebadores universales, que amplifican material genético tanto de bacterias diana como de otras que no lo son por lo que su sensibilidad es bastante reducida.

- 50 Otros métodos, tales 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). Sin embargo, el número de especies dentro de este género ha aumentado sensiblemente desde la presentación de dichas patentes y su aproximación, que consiste en diferenciar entre especies según el tamaño del amplicón obtenido en una PCR, no es útil para determinadas especies conocidas dentro del género que son de un tamaño similar al fragmento amplificado.

- 55 Aunque 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**, se han introducido mejoras respecto de los procedimientos descritos previamente, ya que es capaz de detectar un grupo mucho más amplio de especies dentro del mismo y otros géneros, utilizando sondas y cebadores completamente novedosos y con niveles de sensibilidad máximos.

- 65 Para la detección de **Coxiella burnetii**, se emplean los mismos cebadores y la misma región de ADN (secuencia de inserción IS1111) que los métodos anteriormente descritos. Se ha mejorado dicha detección combinándola con otra

serie de ensayos completamente novedosos 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***.

5 Descripción de la invención

Definiciones: PCR Múltiple o PCR Multiplex: la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) es un sistema mediante el que se amplifica o aumenta el número de copias de una secuencia de nucleótidos concreta de un organismo, mediante el uso de dos cebadores. La PCR múltiple 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.

La presente invención resuelve 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 para la detección de especies bacterianas causantes de zoonosis pertenecientes al género ***Rickettsia***.

La solución encontrada por la presente invención consiste en analizar una región del ADN bacteriano para determinar que especies se encuentran presentes. En concreto se analiza el **ARNr de espacio intergénico 23S-5S** para detectar la presencia de ***Rickettsia***.

De acuerdo con lo anterior, se describe un método para la detección de bacterias a partir de una muestra, que comprende las siguientes etapas:

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

En relación con esto, se describe un método para detectar:

- El género *Rickettsia*, y el grupo causante de la fiebre maculosa y el grupo causante del tifus, las especies *Rickettsia akari*, *R. bellii*, *R. slovaca*, *R. conorii*, *R. aeschlimannii*, *R. rickettsii*, *R. sibirica*, *R. helvetica*, *R. felis*, *R. australis*, *R. prowazekii*, y *R. typhi* (*R. mooserii*),

siendo todas ellas capaces de provocar zoonosis, infectar conjuntamente a un individuo y difíciles de identificar por la simple observación de los cuadros clínicos, basándose en la amplificación y análisis de los genes o regiones génicas concretas presentadas en la tabla 6.

De acuerdo con una realización específica, se amplifican fragmentos de ADN incluidos o comprendidos dentro de las secuencias cuyos números de referencia se muestran en la tabla 6.

De acuerdo con una realización más específica, las regiones amplificadas tienen un tamaño de entre 99 y 686 nucleótidos y contienen regiones variables empleadas para la identificación. De acuerdo con una realización aún más específica, las regiones variables contienen o están incluidas dentro de las SEQ ID NO: 55, SEQ ID N°: 56 y SEQ ID N°: 82 a SEQ ID NO: 93 o secuencias complementarias, cuyas posiciones se muestran en la tabla 6.

De acuerdo con otra realización, los productos de amplificación, que permiten identificar los diferentes especies y grupos bacterianos se detectan mediante el empleo de sondas. De acuerdo con una realización más preferida, estas sondas tienen una longitud de entre 15 y 25 nucleótidos. Y de acuerdo con una realización aún más preferida, las sondas tienen secuencias SEQ ID NO:38-51; o secuencias complementarias (Tabla 6).

Los cebadores pueden diseñarse mediante alineamiento múltiple con programas informáticos tales como CLUSTAL X, que permite la identificación de regiones muy conservadas que sirven de molde. De acuerdo con otra realización específica, los cebadores hibridan con los genes indicados en la tabla 6 posterior y particularmente los que tienen secuencias con los números de referencia mostrados en la tabla 6 posterior. De acuerdo con una realización aún más específica los cebadores tienen secuencias que comprenden SEQ ID NO:36-37; o secuencias complementarias.

Breve explicación de las tablas:

- En la columna 1 (organismo) se indica la especie bacteriana o grupo de especies bacterianas detectado en cada caso.
- En la columna 2 (gen) se indica el gen o región del genoma 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 génicas o regiones genómicas variables indicada en cada tabla (columna 2).
- En la columna 4 (sonda) se indica la secuencia de las sondas empleadas para la detección de la especie o grupo de especies bacterianas referidas en la columna 1 de cada tabla.
- 5 ➤ En la columna 5 (secuencia 5'-3') se indica las referencias de las secuencias de las regiones variables que se amplifican para detectar cada 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 un gen o región genómica referido en la columna 2, así como la posición concreta de dicha secuencia en la que hibrida el cebador (columna 3).
 - 10 ○ Desde la segunda fila 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).

Tabla 1: *Anaplasma* y *Ehrlichia*: secuencia de cada uno de los cebadores y sondas utilizados en el proceso y su posición relativa en el gen de ARNr 16S.

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 N° 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 su posición relativa en el espacio intergénico de ARNr 16S-23S.

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-	SEQ ID 10 (S-QUIN)	SEQ ID 62	622-641 (AF368396)

		23R			
<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 de Tabla 2: <i>Bartonella</i> : secuencia de cada uno de los cebadores y sondas utilizados en el proceso y su posición relativa en el espacio intergénico 16S-23S ARNr.					
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: <i>Borrelia</i> : secuencia de cada uno de los cebadores y sondas utilizados en el proceso y su posición relativa en el gen de ARNr 16S.					
ORGANISMO	GEN	CEBADOR	SONDAS	SECUENCIA 5'-3'	POSICIÓN 5'-3'
<i>Borrelia spp.</i>	16S	SEQ ID 25 (BOF-3)			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 su posición relativa 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 su posición relativa.

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)

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

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)
Genérica	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 la fiebre maculosa</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. slovacca</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 de Tabla 6: Rickettsia: secuencia de cada uno de los cebadores y sondas utilizados en el proceso y su posición relativa en los genes de ARNr 23S, 5S y el espacio intergénico de ARNr 23S-5S.

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
Grupo Tifus	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)

5 Dada la 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 (consúltese J. Hoorfar *et al.*, "Making internal Amplification control mandatory for diagnostic PCR" J. of Clinical Microbiology, Dic. 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 del proceso de ensayo es indicativa de la presencia de factores, que han provocado un indeseado desarrollo de la PCR.

- 5 Un segundo método similar al previamente descrito en la invención, incluyendo al menos un CIA, preferentemente comprendido por una secuencia de ADN del gen de la **Tetrahidrocannabinol Sintasa** de la especie **Cannabis sativa** y, más preferentemente, con la secuencia con número de acceso AB183705.

10 De acuerdo con una realización más preferida, se amplifica una región de la secuencia AB183705, estando dicha secuencia incluida en la SEQ ID NO 94 o secuencias complementarias (Tabla 7).

De acuerdo con otra realización preferida, la región se amplifica mediante cebadores específicos cuyas secuencias comprenden o están incluidas en las SEQ ID NO 52 y SEQ ID NO 53 o secuencias complementarias.

- 15 Dentro del contexto de la descripción, el término “*específicos*” implica que los cebadores comprenden una secuencia de nucleótidos totalmente complementaria a los genes o fragmentos génicos empleados por la presente invención.

Tabla 7: Control interno: Gen amplificado, secuencia de cada uno de los cebadores y sondas utilizados en el proceso y su posición relativa.					
ORGANISMO	GEN	CEBADOR	SONDAS	SECUENCIA 5'-3'	POSICIÓN 5'-3'
CIA (Cannabis sativa)	THC Sintasa	SEQ ID 52 (CI-F)			77-99 (AB183705)
		SEQ ID 53 (CI-R)			447-427 (AB183705)
Cannabis sativa	THC Sintasa	SEQ ID 52 (CI-F) SEQ ID 53 (CI-R)	SEQ ID 54 (S-CI2)	SEQ ID 94	281-302 (AB183705)

20 La expresión “*regiones variables*” hace referencia a secuencias de ADN que permiten la identificación de las especies y grupos bacterianos, identificados por la presente invención.

De acuerdo con otra realización, la amplificación del CIA se detecta mediante hibridación con sondas. De acuerdo con una realización más preferida, dichas sondas tienen una longitud de 15 a 25 nucleótidos. Y, en una realización aún más preferida, dichas sondas tienen una secuencia comprendida o incluida en la SEQ ID NO 54 o secuencias complementarias.

El método descrito en el presente documento permite detectar las bacterias anteriormente mencionadas, independientemente de la procedencia de las muestras. Dichas muestras pueden haberse obtenido a partir de biopsias, raspados, insectos, fluidos biológicos (sangre, orina, saliva, etc.), campo, etc. La muestra una vez tomada se pretrata para poder llevar a cabo una PCR Múltiple y una posterior identificación de los amplicones.

La invención también proporciona kits de diagnóstico para aplicar el método descrito por la invención que contiene:

- Cebadores específicos con secuencias: SEQ ID 36-37 y opcionalmente SEQ ID 52 y 53 como CIA.
- Sondas con secuencias: SEQ ID 38-51 y opcionalmente SEQ ID 54 (S-CI2) como CIA.

Del mismo modo, los kits pueden incluir todos los agentes reactivos necesarios para aplicar cualquiera de los métodos descritos. Esto incluye, sin ningún tipo de limitación, el uso de tampones, polimerasas, cofactores para optimizar su actividad, 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 con los que se aplica son: velocidad (las bacterias pueden detectarse en menos de 8 horas), especificidad (los iniciadores empleados son específicos de cada) y un alto nivel de sensibilidad.

Dentro del contexto de la descripción y reivindicaciones de la memoria descriptiva, no se pretende que la palabra “comprende” y sus variaciones, tales como “comprendiendo”, excluyan otros aditivos, componentes, integrantes o etapas. No se pretende que ni el ejemplo de realización, ni los dibujos complementarios sean limitantes de la invención, sino que deben considerarse como un apoyo para su mejor comprensión.

50 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-CI2 hace referencia a la sonda de CIA (Tabla 7).

Figura 2.- A) Membrana de hibridación que 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 detección simultánea de especies pertenecientes a los 7 géneros. En este ejemplo: *A. phagocytophilum*, *A. marginale*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *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-CI2 que hace referencia a la sonda de CIA (Tabla 7).

Figura 3.- Membrana de hibridación que muestra los resultados de un estudio de especificidad llevado a cabo en el grupo de sondas indicado (Tablas 1-7) en diferentes especies de bacterias, artrópodos y mamíferos. Los resultados muestran que en ningún caso las sondas se unen a las muestras procedentes de los organismos ensayados. La sonda S-CI2 hace referencia a la sonda de CIA (Tabla 7).

Ejemplo de realización

Alineamientos, diseños de cebadores y sondas

Por comparación y alineamiento de múltiples 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 su concentración óptima, se ensayó empíricamente de la misma manera que las sales de magnesio y albúmina sérica bovina.

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

Se llevó a cabo un primer análisis de la especificidad de cada una de las sondas comparando su secuencia con bases de datos públicas (genbank) empleando programas informáticos tales como BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). La especificidad se demostró posteriormente llevando a cabo ensayos en una diversidad de muestras de ADN de diferentes especies bacterianas y eucarióticas (Figura 3).

Medios 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 se llevó a cabo usando procedimientos bien conocidos en este campo y disponibles en el mercado (Kit de ADN Mini, Qiagen,N. Referencia: 51304)

Tabla 8. Origen de los ADN utilizados en la invención		
ORGANISMO	ADN NATIVO (origen)	ADN SINTÉTICO*
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	X (1)	
<i>A. marginale</i>	X (1)	
<i>Ehrlichia chaffeensis</i>		X
<i>E. ewingii</i>		X
<i>Borrelia burgdorferi</i>	X (2)	
<i>B. garinii</i>	X (2)	
<i>B. afzelii</i>	X (2)	
<i>B. lusitaniae</i>	X (2)	
<i>B. japonica</i>	X (2)	
<i>B. hermsii</i>	X (2)	
<i>B. parkeri</i>	X (2)	
<i>Francisella tularensis tularensis</i>	X (3)	
<i>F. tularensis subesp. holarctica</i>	X (3)	
<i>F. tularensis subesp. Novicida</i>	X (3)	
<i>Francisella variante 3523</i>		X
<i>Francisella Endosimbiontes</i>		X
<i>Bartonella alsatica</i>	X (4)	

<i>B. bacilliformis</i>	X (4)	
<i>B. bovis</i>	X (4)	
<i>B. clarridgeiae</i>	X (4)	
<i>B. doshiae</i>	X (4)	
<i>B. elizabethae</i>	X (4)	
<i>B. grahamii</i>	X (4)	
<i>B. henselae</i>	X (4)	
<i>B. koehlerae</i>	X (4)	
<i>B. quintana</i>	X (4)	
<i>B. schoenbuchensis</i>	X (4)	
<i>B. taylorii</i>	X (4)	
<i>B. tribocorum</i>	X (4)	
<i>B. vinsonii subesp. Arupensis</i>	X (4)	
<i>B. vinsonii subesp. Berkhofii</i>	X (4)	
<i>B. vinsonii subesp. Vinsonii</i>	X (4)	
<i>Coxiella burnetii</i>	X (5)	
<i>Rickettsia aeschlimannii</i>		X
<i>R. akari</i>	X (5)	
<i>R. australis</i>	X (5)	
<i>R. bellii</i>	X (5)	
<i>R. conori</i>	X (5)	
<i>R. felis</i>	X (5)	
<i>R. Helvetica</i>	X (5)	
<i>R. rickettsii</i>	X (5)	
<i>R. sibirica</i>		X
<i>R. slovacae</i>	X (5)	
<i>R. prowazekii</i>		X
<i>R. typhi</i>	X (5)	
<i>Brucella melitensis</i>	X (6)	
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	X (7)	
<i>C. psittaci</i>	X (7)	
<i>Escherichia coli</i>	X (6)	
<i>Legionella pneumophila</i>	X (8)	
<i>Leptospira interrogans</i>	X (4)	
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	X (7)	
<i>Ochrobactrum antropi</i>	X (4)	
<i>Orientia tsutsugamushi</i>	X (5)	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	X (4)	
<i>Salmonella enterica Typhi</i>	X (4)	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	X (6)	
<i>Treponema pallidum</i>	X (7)	
<i>Ixodes ricinus</i>	X (9)	
<i>Dermacentor marginatus</i>	X (9)	
<i>Ripicephalus sanguineus</i>	X (9)	
<i>Apodemus sylvaticus</i>	X (9)	
ADN humano	X (10)	
Control Interno		X

Origen del ADN natural:

1: Muestra positiva

5

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

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.

10

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

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 (Supl):575-82.

5 4: Composición de los medios de cultivo axénicos específicos para cada especie disponible en: <http://cip.pasteur.fr/index.html.en>

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

10 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" enriquecido con 5% de sangre de carnero.

15 7: ADN extraído de portaobjetos para inmunofluorescencia indirecta comercial.

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

20 Edelstein 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.

25 10 ADN extraído de muestras clínicas de pacientes con enfermedades no relacionadas.

ADN sintético

30 Se preparó ADN sintético de acuerdo con las correspondientes secuencias enumeradas 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.

Amplificación, hibridación y validación

35 Esta etapa incluyó el análisis experimental de las regiones variables detectadas anteriormente mediante PCR para su validación. El ADN aislado se amplificó por PCR (Saiki *et al.*, (1985) *Science* 230, 1350; 1354), aplicando la siguiente tabla de ciclos de temperatura y composición de la mezcla de reacción, junto con los cebadores específicos usados previamente para tal efecto.

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

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

- H₂O: En función del volumen de ADN final
- Tampón Taq Gold LD: 9 µl
- Cl₂Mg [3 mM]: 6 µl
- 45 - dNTP [200 mM] :1 µl x 4
- BSA [0,8 µg/µl]: 4 µl
- 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/µl]: 0,5 µl de cada uno (7 µl)
- Taq Gold LD: 0,5 µl [2,5 unidades]
- 50 - 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, Dic. 1995, p. 3091-3095, aunque aplicando las siguientes modificaciones (Figuras 1 y 2A):

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

10 El resultado de las hibridaciones se muestra en las figuras 1 y 2A, donde se puede apreciar que cada una de las sondas de la invención se une específicamente a los amplicones de cada una de las especies bacterianas que se detectan mediante el método de la invención.

Preparación de muestras y PCR múltiple.

15 Una de las ventajas de usar sistemas de identificación basados en análisis por PCR y RLB consiste es que no son necesarios cultivos bacterianos puros. De este modo, y tras la validación de los cebadores y las sondas con muestras de ADN de las diferentes especies y subespecies enumeradas en las tablas 1-6, preparadas siguiendo los procedimientos citados en la tabla 8 y analizadas por duplicado, se llevó a cabo un análisis basado en PCR múltiple de una mezcla de ADN control preparada en condiciones de laboratorio, seguido del ensayo de RLB, empleando los
20 cebadores y sondas específicamente diseñados y los ciclos de temperatura y la composición de mezcla de reacción indicados anteriormente, cuyos resultados se muestran en la figura 2B. En dicha figura se puede apreciar que fue posible llevar a cabo la detección simultánea de las especies bacterianas presentes en la muestra.

25 Detección de inhibidores de PCR

Para la detección de inhibidores de PCR, se construyó un control interno de amplificación (CIA) que se amplificase junto con el ADN diana, utilizando cebadores específicos (Tabla 7), diseñados de acuerdo con regiones conservadas de la secuencia AB183705 (Tabla 7) perteneciente al gen de la THC sintasa de la especie *Cannabis sativa*. Concretamente, el amplicón de CIA se corresponde con una secuencia de 371 pares de bases para la que se diseñó
30 también una sonda (Tabla 7) para su detección durante el análisis RLB.

Especificidad del método

35 La alta especificidad del presente método está basada en la especificidad de los cebadores y sus sondas, que se ensayaron 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 no relacionadas de bacterias, artrópodos y mamíferos utilizadas en el desarrollo del método		
	ESPECIE	RESULTADO DE RLB
	Bacterias	
1	<i>Brucella melitensis</i>	Negativo
2	<i>Chlamydia pneumoniae</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 pneumoniae</i>	Negativo
8	<i>Ochrobactrum antropi</i>	Negativo
9	<i>Orientia tsutsugamushi</i>	Negativo
10	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Negativo
11	<i>Salmonella enterica</i> Typhi	Negativo
12	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Negativo
13	<i>Treponema pallidum</i>	Negativo
	Artrópodos	
14	<i>Ixodes ricinus</i>	Negativo
15	<i>Dermacentor marginatus</i>	Negativo
16	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Negativo
	Mamíferos	

ES 2 522 523 T3

17	<i>Apodemus sylvaticus</i>	Negativo
18	Ser humano	Negativo

LISTADO DE SECUENCIAS

5	<110> Instituto de Salud Carlos III <120> CEBADORES, SONDAS Y KITS PARA DETECCIÓN DE ESPECIES BACTERIANAS QUE PERTENECEN AL GÉNERO RICKETTSIA	
10	<130> 1613.1B <150> ES20050001481 <151> 17-06-2005 <160> 94	
15	<170> PatentIn versión 3.5 <210> 1 <211> 22 <212> ADN <213> Anaplasma spp	
25	<400> 1 cagaacgaac gctggcggca ag	22
30	<210> 2 <211> 24 <212> ADN <213> Anaplasma spp	
35	<400> 2 gcattactca cccgtctgcc actc	24
40	<210> 3 <211> 22 <212> ADN <213> Anaplasma bovis	
45	<400> 3 ggmmtattct ttagcttg ct	22
50	<210> 4 <211> 21 <212> ADN <213> Ehrlichia chaffeensis	
55	<400> 4 attgcttata acctttggt t	21
60	<210> 5 <211> 21 <212> ADN <213> Ehrlichia ewingii	
60	<400> 5 gaacaattcc taaatagtct c	21
60	<210> 6 <211> 19 <212> ADN <213> Anaplasma marginale <400> 6 cagcttgctg cgtgatgg	19

ES 2 522 523 T3

<210> 7
 <211> 22
 <212> ADN
 5 <213> Bartonella spp

 <400> 7
 ttgataagcg tgaggtcgga gg 22

 10 <210> 8
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Bartonella henselae

 15 <400> 8
 caaagcaggt gctctcccag 20

 <210> 9
 <211> 22
 20 <212> ADN
 <213> Bartonella henselae

 <400> 9
 atcggttcaa tcatatcgct tt 22
 25

 <210> 10
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Bartonella quintana
 30

 <400> 10
 cgcttatcca ttggtttaa 20

 <210> 11
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Bartonella clarridgeiae
 35

 <400> 11
 acgatgctaa aagtgctat 20
 40

 <210> 12
 <211> 21
 <212> ADN
 45 <213> Bartonella elizabethae

 <400> 12
 taagttccct tcaagaggat a 21
 50

 <210> 13
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Bartonella grahamii
 55

 <400> 13
 attcaagttg atgaattgg ttat 24

 <210> 14
 <211> 20
 <212> ADN
 60 <213> Bartonella vinsonii berkhofii

 <400> 14
 ttctggacac tattgataaa 20
 65
 <210> 15
 <211> 21

ES 2 522 523 T3

<212> ADN
 <213> Bartonella vinsonii arupensis

 5 <400> 15
 actgttgga attgcttaac c 21

 <210> 16
 <211> 21
 <212> ADN
 10 <213> Bartonella vinsonii vinsonii

 <400> 16
 atgaaaatat tgagagattt g 21

 15 <210> 17
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Bartonella bacilliformis

 20 <400> 17
 cctatgattg attctaggc 20

 <210> 18
 <211> 20
 25 <212> ADN
 <213> Bartonella alsatica

 <400> 18
 gctggtgaaa ctgcttata 20
 30
 <210> 19
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Bartonella bovis
 35
 <400> 19
 cgttttgata gtcttttggtg ttgc 24

 40 <210> 20
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Bartonella doshiae

 45 <400> 20
 tttgaacctt ctctctttat 20

 <210> 21
 <211> 27
 <212> ADN
 50 <213> Bartonella koehlerae

 <400> 21
 ttaaattata tcactttggg tcatagc 27

 55 <210> 22
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Bartonella schoenbuchensis

 60 <400> 22
 gctgataagt ttgctgataa g 21

 <210> 23
 <211> 19
 <212> ADN
 65 <213> Bartonella taylorii

ES 2 522 523 T3

	<400> 23 tatccatttc gcttaggca	19
5	<210> 24 <211> 22 <212> ADN <213> Bartonella tribocorum	
10	<400> 24 ttctattaag ttgtcaaag gg	22
15	<210> 25 <211> 21 <212> ADN <213> Borrelia spp	
20	<400> 25 taagaatctt ccgcaatggg c	21
25	<210> 26 <211> 21 <212> ADN <213> Borrelia spp	
30	<400> 26 atccgcctac tcacccttta c	21
35	<210> 27 <211> 20 <212> ADN <213> Borrelia spp	
40	<400> 27 tgacggagcg aactgcgtg	20
45	<210> 28 <211> 22 <212> ADN <213> Coxiella burnetii	
50	<400> 28 tatgtatcca ccgtagccag tc	22
55	<210> 29 <211> 21 <212> ADN <213> Coxiella burnetii	
60	<400> 29 cccaacaaca cctccttatt c	21
65	<210> 30 <211> 20 <212> ADN <213> Coxiella burnetii	
	<400> 30 gcaagaatac ggactcacga 20	
	<210> 31 <211> 23 <212> ADN <213> Francisella spp	
	<400> 31 gyaggttag ckagctgttc tac	23

ES 2 522 523 T3

5 <210> 32
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Francisella tularensis

 <400> 32
 ggagcytgcc attgtaatct tac 23

 10 <210> 33
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Francisella tularensis

 15 <400> 33
 agatactgct gctgctcaga cag 23

 20 <210> 34
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Francisella tularensis

 25 <400> 34
 gcatcagata agggcaccgc 20

 30 <210> 35
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Francisella tularensis

 <400> 35
 cagctacacc aacrgccgta g 21

 35 <210> 36
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Rickettsia spp

 40 <400> 36
 gataggtcrg rtgtggaagc ac 22

 45 <210> 37
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Rickettsia spp

 <400> 37
 tcgggayggg atcgtgtgtt tc 22

 50 <210> 38
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Rickettsia spp

 55 <400> 38
 tagctcgatt grttacttt g 21

 60 <210> 39
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Rickettsia spp

 65 <400> 39
 actcacaarg ttatcaggt 19
 <210> 40
 <211> 22

ES 2 522 523 T3

	<212> ADN <213> Rickettsia akari	
5	<400> 40 gatcatgcag caatacatta gc	22
10	<210> 41 <211> 23 <212> ADN <213> Rickettsia bellii	
15	<400> 41 gtgtttattc tataatatgt cag	23
20	<210> 42 <211> 18 <212> ADN <213> Rickettsia slovacae	
25	<400> 42 gtagcccctg ccacgata	18
30	<210> 43 <211> 19 <212> ADN <213> Rickettsia conorii	
35	<400> 43 ggtatatact gtagccctg	19
40	<210> 44 <211> 22 <212> ADN <213> Rickettsia aeschlimanni	
45	<400> 44 atattatact gtatgtagcc cc	22
50	<210> 45 <211> 20 <212> ADN <213> Rickettsia rickettsii	
55	<400> 45 ggtatactgt agtcctgcaa	20
60	<210> 46 <211> 19 <212> ADN <213> Rickettsia helvetica	
65	<400> 46 catggcttga tccacgta	19
70	<210> 47 <211> 22 <212> ADN <213> Rickettsia felis	
75	<400> 47 taatgttata ccgtgtccc gc	22
80	<210> 48 <211> 20 <212> ADN <213> Rickettsia australis	

ES 2 522 523 T3

<400> 48
 gacaagtta gttatgcaat 20

5 <210> 49
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Rickettsia spp

10 <400> 49
 gttattctat cgtttatgt yacg 24

15 <210> 50
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Rickettsia prowazekii

20 <400> 50
 tacgattga tagtaaagtt ttg 23

25 <210> 51
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Rickettsia typhi

<400> 51
 atgtcacgat ttgaccgtaa gatc 24

30 <210> 52
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Cannabis sativa

35 <400> 52
 atgatgctga gggatgtcc tac 23

40 <210> 53
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Cannabis sativa

<400> 53
 gttttctcct ccaccaccac g 21

45 <210> 54
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Cannabis sativa

50 <400> 54
 gtggacactt tagtgagga gg 22

55 <210> 55
 <211> 377
 <212> ADN
 <213> Rickettsia felis

60 <220>
 <221> unión_cebador
 <222> (186)..(207)

<400> 55

ES 2 522 523 T3

	gatagtcgg gtgtggaagc acagtaatgt gtgtagctaa ctgatactaa tagctcgatt	60
	gatttacttt gctgtgagat tacatatgca tatagtgtta attctataaa aatgtagtat	120
	caactcacia agttatcagg ttaaattagc tttaccaatg aataaaaatg ttgttgaca	180
	gctaataatg ttataccgtg gtccccccac ggtatctaga aaaatthtta atatttagat	240
	tcttgcttcc gcaggaatga taaatttagt catgcaacia cattaacagc aaactataat	300
	acaaatctat cththththth gtttgattg ctgacttggt ggttatagca tgagtgaaac	360
	acacgatccc atccccga	377
5	<210> 56 <211> 343 <212> ADN <213> Rickettsia australis	
10	<220> <221> unió_n_cebador <222> (230)..(249)	
	<400> 56	
	ccgatactaa tagctcgatt gatttacttt gctgtgggat tacatatgca tatgggtgta	60
	attctataaa catgtaagtg tcaactcaca aagtatcag gttaaattag ctttatcaat	120
	gaataaagat gttgttgac agctaataat gtcactctgt ggcttgacca cagtatctag	180
	cagtatctag aaaaatthtat aatatttggg ttcctgcttc cgtaggagtg acaagtttag	240
	ttatgcaata acattaacag cgaactataa taciaaatcta ththththth agtttgatt	300
	gctagcttg tggttatagc atgagtgaac cacacgatcc cga	343
15	<210> 57 <211> 22 <212> ADN <213> Anaplasma bovis	
20	<400> 57 agcaagctat aaagaataak cc 22	
25	<210> 58 <211> 21 <212> ADN <213> Ehrlichia chaffeensis	
30	<400> 58 aaccaaaagg ttataagcaa t 21	
35	<210> 59 <211> 21 <212> ADN <213> Erlichia ewingii	
	<400> 59 gagactatt aggaattgt c 21	
40	<210> 60 <211> 19 <212> ADN <213> Anaplasma marginale	
45	<400> 60 ccatacacgc agcaagctg 19	

ES 2 522 523 T3

<210> 61
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Bartolella henselae
 5
 <400> 61
 aaagcgatat gattgaaccg at 22
 <210> 62
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Bartonella quintana
 10
 <400> 62
 ttaaaccaaa tggataagcg 20
 <210> 63
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Bartonella clarridgeiae
 20
 <400> 63
 atagcaactt ttagcatcgt 20
 25
 <210> 64
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Bartonella elizabethae
 30
 <400> 64
 tatkctcttg aaggaactt a 21
 <210> 65
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Bartonella grahamii
 35
 <400> 65
 ataaccaaat tcatcaactt gaat 24
 40
 <210> 66
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Bartonella vinsonii berkhofii
 45
 <400> 66
 tttatcaata ggtccgaaa 20
 <210> 67
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Bartonella vinsonii arupensis
 50
 <400> 67
 ggtaagcaa ttccaacaag t 21
 <210> 68
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Bartonella vinsonii vinsonii
 60
 <400> 68
 caaatctctc aatatttca t 21
 65
 <210> 69
 <211> 20

ES 2 522 523 T3

<212> ADN
 <213> Bartonella bacilliformis

 5 <400> 69
 gcctagaaat caatcatagg 20

 <210> 70
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Bartonella alsatica

 <400> 70
 tataagcaag ttcaccagc 20

 15 <210> 71
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Bartonella bovis

 20 <400> 71
 gcaacacaaa agactatcaa aacg 24

 <210> 72
 <211> 20
 <212> ADN
 25 <213> Bartonella doshiae

 <400> 72
 ataaagagag aaggtcaaa 20
 30

 <210> 73
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Bartonella koehlerae
 35

 <400> 73
 cgatgaccc aaagtatat aattdaa 27

 40 <210> 74
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Bartonella schoenbuchensis

 45 <400> 74
 cttatcagca aacttatcag c 21

 <210> 75
 <211> 19
 <212> ADN
 50 <213> Bartonella taylori

 <400> 75
 tgctaagcg aatggata 19

 55 <210> 76
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Bartonella tribocorum

 60 <400> 76
 cccttgaca aacttaatag aa 22

 <210> 77
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> Borrelia burgdorferi

ES 2 522 523 T3

	<400> 77 cacgcagtgt cgctccgtca	20
5	<210> 78 <211> 20 <212> ADN <213> Coxiella burnetii	
10	<400> 78 tcgtgagtcc gtattctgc	20
15	<210> 79 <211> 23 <212> ADN <213> Francisella tularensis	
20	<400> 79 ctgtctgagc agcagcagta tct	23
25	<210> 80 <211> 20 <212> ADN <213> Francisella tularensis	
30	<400> 80 gcggtgccct tatctgatgc	20
35	<210> 81 <211> 21 <212> ADN <213> Francisella spp	
40	<400> 81 ctacggcygt tgggtagct g	21
45	<210> 82 <211> 21 <212> ADN <213> Rickettsia spp	
50	<400> 82 caaagtaaay caatcgagct a	21
55	<210> 83 <211> 19 <212> ADN <213> Rickettsia spp	
60	<400> 83 acctgataac yttgtgagt	19
65	<210> 84 <211> 22 <212> ADN <213> Rickettsia akari	
70	<400> 84 gctaatgtat tgctgcatga tc	22
75	<210> 85 <211> 23 <212> ADN <213> Rickettsia bellii	
80	<400> 85 ctgacatatt atagaataaa cac	23

ES 2 522 523 T3

<210> 86
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Rickettsia slovaca
 5

 <400> 86
 tatcgtggca ggggctac 18
 10
 <210> 87
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Rickettsia conorii
 15
 <400> 87
 cagggctaca gtatataac 19

 <210> 88
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Rickettsia aeschlimannii
 20
 <400> 88
 ggggctacat acagtataat at 22
 25
 <210> 89
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Rickettsia rickettsii
 30
 <400> 89
 ttgcaggact acagtataac 20
 35
 <210> 90
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Rickettsia helvetica
 40
 <400> 90
 taccgtggat caagccatg 19
 45
 <210> 91
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Rickettsia spp
 <400> 91
 cgtracataa aacgatagaa taac 24
 50
 <210> 92
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Rickettsia prowazekii
 55
 <400> 92
 caaaacttta ctatcaaadc gta 23
 60
 <210> 93
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Rickettsia typhi
 <400> 93
 gatcctacgg tcaaatcgtg acat 24
 65
 <210> 94

ES 2 522 523 T3

<211> 22
<212> ADN
<213> Cannabis sativa

5 <400> 94
cctcctccac taaagtgcc ac 22

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un par de cebadores que tienen un cebador que comprende SEQ ID NO: 36 y un cebador que comprende SEQ ID NO: 37, y capaces de amplificar SEQ ID NO: 55, 56, 82-93 de especies bacterianas que provocan zoonosis, que pertenecen al género *Rickettsia*.
2. El par de cebadores de acuerdo con la reivindicación 1 que tienen la secuencia SEQ ID NO: 36 y SEQ ID NO: 37.
- 10 3. Sonda que consiste en la secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 38-51, y capaz de hibridar con SEQ ID NO: 55, 56, 82-93 de especies bacterianas que provocan zoonosis, que pertenecen al género *Rickettsia*.
4. Un kit que comprende el par de cebadores de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2.
- 15 5. El kit de acuerdo con la reivindicación 4, que comprende además los cebadores SEQ ID NO: 52 y SEQ ID 53.
6. Un kit que comprende la sonda de acuerdo con la reivindicación 3.
7. El kit de acuerdo con la reivindicación 6, que comprende además la sonda SEQ ID NO: 54.

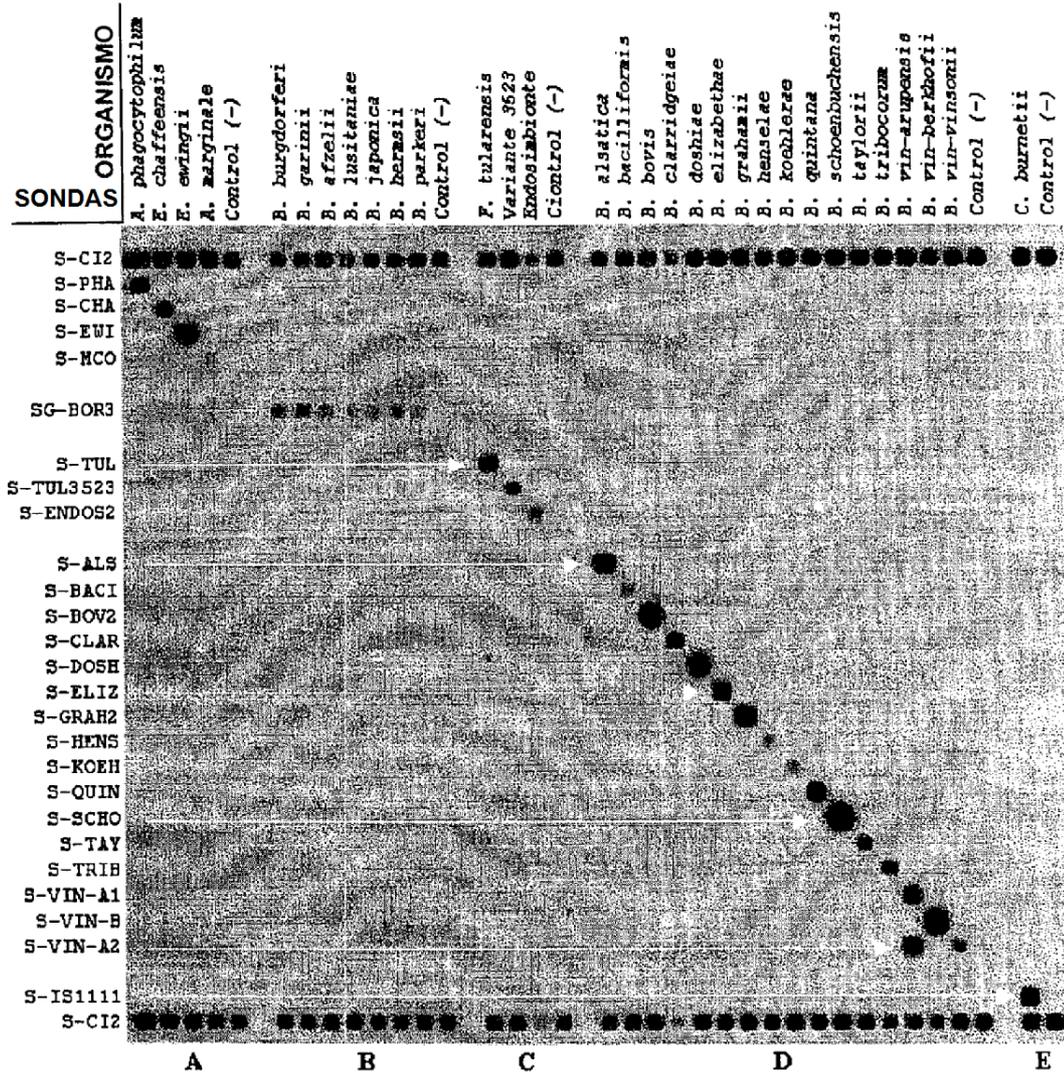


FIGURA 1

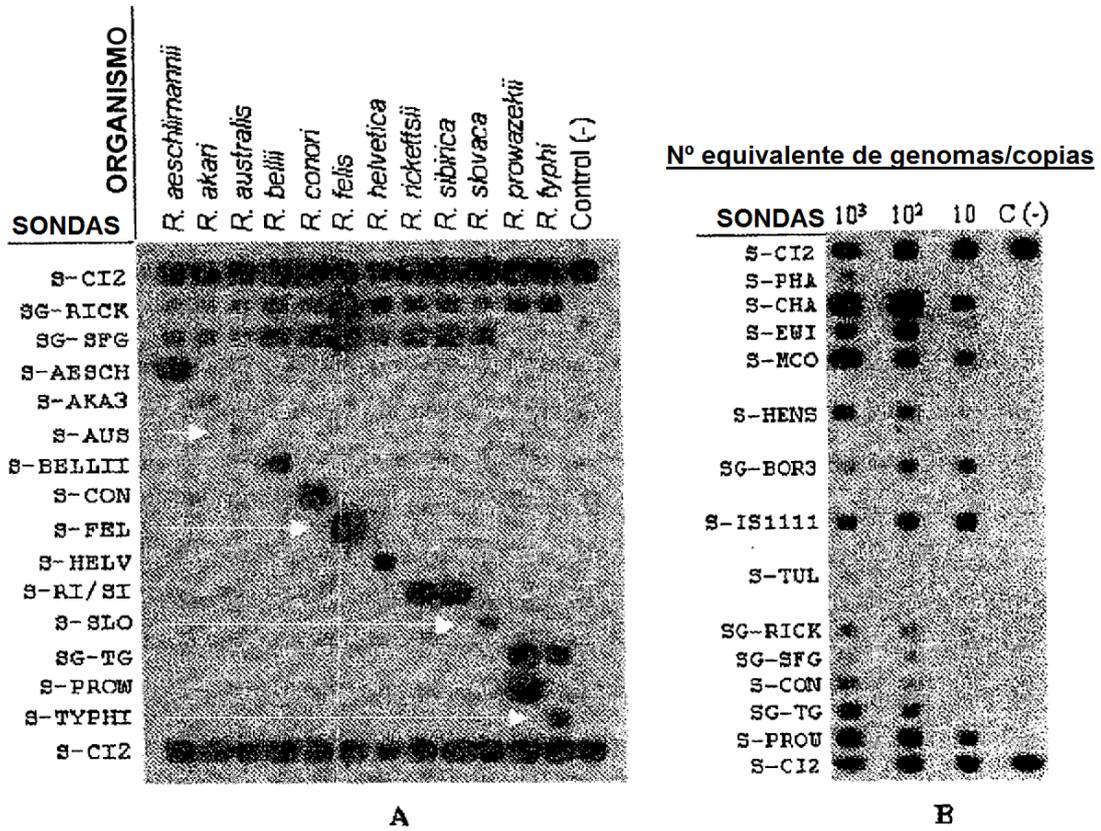


FIGURA 2

SONDAS	ORGANISMO
S-PHA	<i>Brucella melitensis</i>
S-CHA	<i>Chlamydia pneumoniae</i>
S-EWI	<i>C. psittaci</i>
S-MCO	<i>Escherichia coli</i>
S-ALS	<i>Legionella pneumophila</i>
S-BACI	<i>Legionella pneumophila</i>
S-BOV	<i>Legionella pneumophila</i>
S-CLAR	<i>Legionella pneumophila</i>
S-DOSH	<i>Legionella pneumophila</i>
S-ELIZ	<i>Legionella pneumophila</i>
S-GRAM2	<i>Legionella pneumophila</i>
S-MENS	<i>Legionella pneumophila</i>
S-KOEH	<i>Legionella pneumophila</i>
S-QUIN	<i>Legionella pneumophila</i>
S-SCHO	<i>Legionella pneumophila</i>
S-TAY	<i>Legionella pneumophila</i>
S-TRIB	<i>Legionella pneumophila</i>
S-VIN-A1	<i>Legionella pneumophila</i>
S-VIN-A2	<i>Legionella pneumophila</i>
S-VIN-B	<i>Legionella pneumophila</i>
SG-BOR3	<i>Legionella pneumophila</i>
S-IS1111	<i>Legionella pneumophila</i>
S-TUL	<i>Legionella pneumophila</i>
SG-RICK	<i>Legionella pneumophila</i>
SG-SFG	<i>Legionella pneumophila</i>
SG-TG	<i>Legionella pneumophila</i>
S-CI2	<i>Legionella pneumophila</i>
	<i>Mycobacterium avium</i>
	<i>Ochrobactrum anitropi</i>
	<i>Orientia tsutsugamushi</i>
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	<i>Salmonella enterica Typhi</i>
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
	<i>Treponema pallidum</i>
	<i>Xodes ricinus</i>
	<i>Demecenter marginatus</i>
	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>
	<i>Apodemus sylvaticus</i>
	ADN humano
	Control negativo

FIGURA 3