

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(10) Número de Publicación Internacional

WO 2011/048227 A1

PCT

(43) Fecha de publicación internacional
28 de abril de 2011 (28.04.2011)

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
C12Q 1/68 (2006.01) C12N 9/96 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2009/000507

(22) Fecha de presentación internacional:
22 de octubre de 2009 (22.10.2009)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US): BIOTOOLS BIOTECHNOLOGICAL & MEDICAL LABORATORIES, S.A. [ES/ES]; Valle de Tobalina, 52-43, E-28021 Madrid (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): MINGORANCE CRUZ, Jesús [ES/ES]; Hospital Universitario La Paz, Pº de la Castellana, 261, E-28046 Madrid (ES). CASTÁN GARCÍA, Pablo [ES/ES]; Biotools B&M Labs, S.A., Valle de Tobalina, 52 - 43, E-28021 Madrid (ES). FRANCO DE SARABIA ROSADO, Pedro Manuel [ES/ES]; Biotools B&M Labs, S.A., Valle de Tobalina, 52 - 43, E-28021 Madrid (ES).

(74) Mandatarios: ARIZTI ACHA, Monica et al.; Hermosilla, 3, E-28001 Madrid (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- con la parte de lista de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))

(54) Title: COMPOSITION, METHOD AND KIT FOR DETECTING BACTERIA BY MEANS OF SEQUENCING

(54) Título : COMPOSICIÓN, MÉTODO Y KIT PARA LA DETECCIÓN DE BACTERIAS MEDIANTE SECUENCIACIÓN

(57) Abstract: The present invention describes a method for detecting the presence and type of a microorganism present in a sample by means of stabilization and sequencing techniques and subsequent analysis of microsequences in genes encoding the ribosomal RNA most conserved, and on specific areas of the 16-S region with taxonomic value.

(57) Resumen: La presente invención describe un método para detectar la presencia y tipo de microorganismo presente en una muestra mediante técnicas de estabilización y de secuenciación, y posterior análisis de microsecuencias en genes codificantes para el RNA ribosomal de mayor conservación, y sobre áreas específicas de la región 16-S con valor taxonómico.

COMPOSICIÓN, MÉTODO Y KIT PARA LA DETECCIÓN DE BACTERIAS MEDIANTE SECUENCIACIÓN

SECTOR TÉCNICO DE LA INVENCIÓN

La presente invención describe un método para detectar la presencia y tipo de 5 microorganismo presente en una muestra mediante técnicas de estabilización y de secuenciación, y posterior análisis de microsecuencias en genes codificantes para el RNA ribosomal de mayor conservación, y sobre áreas específicas de la región 16-S con valor taxonómico.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

10 La septicemia, o sepsis, es un cuadro que se caracteriza por la presencia y diseminación de bacterias en la sangre. Es una infección grave, potencialmente mortal que empeora de forma rápida y que puede surgir de infecciones en todo el cuerpo, incluyendo infecciones con foco en los pulmones, el abdomen y las vías urinarias. Puede aparecer antes o al mismo tiempo que las infecciones óseas (osteomielitis), del sistema 15 nervioso central (meningitis) u otros tejidos y en estos casos es una condición potencialmente mortal en personas con sistema inmune debilitado. La forma más grave es la que se denomina shock séptico, y es una forma de evolución del cuadro que se alcanza cuando la carga bacteriana produce una disminución sostenida de la tensión arterial que impide el correcto aporte de oxígeno a los tejidos.

20 Se estima que en España se producen anualmente 50.000 nuevos casos de sepsis grave, y que por este motivo mueren 17.000 personas cada año. En todo el mundo se dan 18 millones de casos anuales, y como consecuencia de esta infección generalizada mueren cada día en el mundo 1.400 personas, lo que sitúa su morbilidad por delante de enfermedades con gran impacto social como el cáncer de mama o el 25 SIDA.

El diagnóstico rápido, y la identificación precoz del microorganismo causante de la infección, permiten la administración de una terapia temprana precisa orientada hacia el microorganismo encontrado, lo cual es crucial para la disminución de la severidad de la enfermedad e incluso para asegurar la supervivencia y recuperación de los pacientes 30 infectados. En este sentido, existe una correspondencia directa entre el diagnóstico e identificación precoces y la total ausencia de secuelas asociadas a este cuadro.

El hemocultivo es el método tradicional más utilizado en la identificación de microorganismos infectantes, pero tiene el inconveniente de tardar entre uno y cinco días en dar un resultado preciso. En el caso de infecciones causadas por hongos, un diagnóstico mediante hemocultivo puede llevar por encima de ocho días. En definitiva, el 5 hemocultivo es un método de diagnóstico eficaz pero lento para la determinación del microorganismo infectante y, en consecuencia, de la prescripción de la terapia adecuada para el tratamiento temprano de la infección. La sensibilidad diagnóstica es otro problema adicional de las técnicas diagnósticas asociadas al hemocultivo. Esta falta de sensibilidad también se aprecia en el método de diagnóstico mediante inmunoprecipitación, que 10 además se ve afectado por cambios estacionales en los patrones de antígenos superficiales para ciertos gérmenes patógenos. Además, estas técnicas basadas en las características bioquímicas y fenotípicas de los microorganismos a menudo fallan cuando se aplican a variantes clínicas debido a los cambios morfológicos o al estado metabólico 15 en que se encuentra el microorganismo patógeno en un determinado momento.

15 De hecho, los métodos tradicionales de laboratorio para la identificación de microorganismos no siempre pueden identificar múltiples agentes patógenos en una sola muestra clínica, ya que la identificación a partir de un cultivo está basada en la predominancia del microorganismo y puede ser influenciado por la selección positiva-negativa del mismo en el medio de cultivo. Existen evidencias que confirman la presencia 20 en múltiples ocasiones de más de un microorganismo por muestra clínica, siendo estos cuadros polimicrobianos muy difíciles de caracterizar mediante los métodos de cultivo tradicionales. El método objeto de esta invención es idóneo para detectar varios agentes patógenos en una sola muestra clínica independientemente de las proporciones de cada uno de ellos.

25 De las diversas técnicas existentes para la identificación y caracterización de microorganismos patógenos, las técnicas basadas en el material genético de los mismos, ADN (ácido desoxirribonucleico) y/o ARN (ácido ribonucleico), adquieren cada día mayor importancia. Así, actualmente existen varios ensayos de hibridación de ácidos nucleicos que pueden ser utilizados para identificar microorganismos. De éstos, entre los más 30 utilizados se encuentran la amplificación de ácidos nucleicos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR - Polymerase Chain Reaction) y la transcripción reversa acompañada de posterior amplificación del cDNA transcrita (RT-PCR - Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction), la amplificación de ácidos nucleicos en tiempo real o PCR cuantitativa (qPCR - quantitative PCR, también llamada Real Time

PCR), la LCR (Ligase Chain Reaction Nucleic Acid Amplification), la hibridación en fase líquida (LPH), y la hibridación *in situ*, entre otras. Estos ensayos de identificación específica de un determinado microorganismo utilizan diversos tipos de sondas nucleotídicas de hibridación marcadas principalmente con moléculas no-radioisotópicas 5 tales como la digoxigenina, biotina, fluoresceína o fosfatasa alcalina, a fin de generar una señal detectable al producirse la hibridación específica entre la sonda nucleotídica de hibridación y la secuencia del material genético, ADN y/o ARN, específica identificativa del microorganismo a identificar. Otra alternativa que asocia el diagnóstico de la infección 10 a la identificación del patógeno y sus peculiaridades es el método de PCR-RFLP (del inglés Restriction Fragment Length Polymorphism), referido a secuencias específicas de nucleótidos en el ADN que son reconocidas y cortadas por las enzimas de restricción generando usualmente patrones de distancia, longitud y disposición diferentes en el ADN de distintos patógenos dentro de una población polimórfica para estos fragmentos de restricción.

15 De entre las técnicas citadas, el procedimiento más ampliamente utilizado es el denominado PCR (Saiki et al., *Science*, 230, 1350-1354 (1985), Mullis et al., patentes norteamericanas US 4.683.195, US 4.683.202 y US 4.800.159). Esta técnica permite la amplificación exponencial seriada de ácidos nucleicos. Dicha amplificación se consigue mediante ciclos repetitivos de desnaturalización por calor del ácido nucleico a estudio, 20 unión de cebadores complementarios a dos regiones enfrentadas del ácido nucleico a amplificar, y extensión de la secuencia acotada entre los dos cebadores dentro del ácido nucleico, por acción de una enzima polimerasa termoestable. La repetición de ciclos sucesivos en este proceso consigue una amplificación exponencial del ácido nucleico a estudio. Así mismo, este proceso no genera una señal detectable e intrínseca, por lo que 25 el análisis de la presencia del ácido nucleico amplificado requiere un análisis adicional de los productos generados en presencia de un agente intercalante, generalmente mediante electroforesis sobre geles de agarosa o de acrilamida.

30 A fin de evitar este paso de detección sobre diferentes soportes, se ha desarrollado una variante de la PCR, la PCR en tiempo real o PCR cuantitativa, donde los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea, sin necesidad de ninguna acción posterior. Además, mediante la detección por fluorescencia de los fragmentos amplificados, se puede medir la cantidad de ADN sintetizado en cada momento durante la amplificación, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de ADN formado, lo que permite conocer y

registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación (Higuchi R, Fokler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: Real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio/Technology* 1993; 11: 1026-30).

La detección simultánea y/o la identificación de especies de microorganismos en una muestra determinada requiere la utilización de diferentes sondas nucleotídicas, de diferentes cebadores en el caso de la PCR, o de diferentes cebadores y/o sondas fluorescentes en el caso de la PCR en tiempo real. Todos han de resultar específicos para cada uno de los microorganismos a detectar, siendo necesario usualmente realizar ensayos diferentes para identificar cada uno de los microorganismos en cuestión. Esta necesidad de usar diferentes sondas y cebadores específicos para identificar cada uno de los microorganismos posiblemente presentes en la muestra complica tanto el desarrollo experimental de las sondas o cebadores a utilizar como la viabilidad y el coste del ensayo de identificación de múltiples microorganismos en una misma muestra. Por este motivo los sistemas multiplexados no han conseguido una implantación real en la rutina diagnóstica.

En el caso de la PCR, existe en ciertas ocasiones la posibilidad de diseñar cebadores de consenso capaces de amplificar una región determinada del ADN común a varios microorganismos. En el caso de las eubacterias, son bien conocidos los cebadores de consenso que se unen a una o más regiones altamente conservadas del ADN bacteriano, por ejemplo, la región 16S altamente conservada del RNA ribosomal (rRNA) o bien la región 23S del mismo ADN ribosomal. Los moldes correspondientes pueden ser amplificados utilizando cebadores de consenso adecuados y el ADN bacteriano producto de esta amplificación puede ser entonces detectado mediante diversos métodos de detección (Anthony, Brown, French; J. Olin. "Rapid Diagnosis of Bacteremia by universal amplification of 23S Ribosomal DNA followed by Hybridization to an Oligonucleotide Array". *Microbiol.* 2000, pp. 781-788, y la solicitud de patente WO 00/66777).

Los métodos de detección estándares mediante amplificación sobre una muestra biológica para la identificación de bacterias, no siempre pueden identificar múltiples agentes patógenos presentes en la misma muestra, dado que la identificación precisa mediante amplificación depende de la utilización de cebadores específicos para cada una de las especies presentes en la muestra, lo que supone conocer o presuponer previamente las especies presentes. En el caso de utilizar en la reacción de amplificación cebadores genéricos, la identificación está basada en la predominancia del organismo y

puede ser influenciada por la prevalencia de una bacteria sobre otra. Existen evidencias de que en numerosos cuadros clínicos más de un organismo puede estar presente en la muestra de análisis, haciendo muy difícil su detección por los métodos tradicionales. El método objeto de esta patente es idóneo para la detección de varios agentes patógenos 5 en una sola muestra clínica de manera simultánea sin conocer o presuponer previamente las especies bacterianas presentes en la muestra.

Los adelantos en las técnicas de biología molecular y manejo del DNA recombinante han llevado al desarrollo de nuevos métodos de identificación rápida de múltiples agentes patógenos en un solo ensayo a partir de una muestra biológica 10 determinada a lo largo de los últimos años. Algunos de estos métodos de análisis multifactorial simultáneo (multiplexación) se describen a continuación. Klausegger et al. ("Gram-Type Specific Broad-Range POR Amplification for Rapid Detection of 62 Pathogenic Bacteria", J. Clin. Microbiol. 1999, pp. 464-466) muestran que el ADN / ARN de las bacterias Gram-positivas puede ser amplificado de manera específica en una 15 reacción de PCR utilizando cebadores universales diseñados especialmente para este grupo de bacterias, y que las bacterias Gram-negativas no son amplificadas en esta reacción de PCR, de manera que al menos es posible subdividir las eubacterias objeto de la investigación en Gram-positivas y Gram-negativas. Klausegger utiliza métodos microbiológicos convencionales para especificar con mayor precisión las bacterias Gram- 20 positivas que se han amplificado de esta manera. Según Klausegger, a través de este tratamiento al menos es posible tratar bacterias patógenas rápidamente, siendo dirigido el tratamiento hacia bacterias Gram-positivas o Gram-negativas en base al perfil de detección. Sin embargo, la publicación de Klausegger no permite ninguna identificación más precisa dentro de un corto período de tiempo, generando una profunda indefinición 25 desde el punto de vista de la praxis médica a la hora de acotar el tratamiento para pacientes de infección polimicrobiana.

La detección simultánea y/o la identificación de especies de microorganismos en una muestra dada se ha reportado recientemente con la técnica de multiplexado en PCR de múltiples cebadores para amplificaciones no solapantes, con múltiples grupos de 30 especies-pares de oligonucleótidos específicos y sondas correspondientes a los diferentes objetivos de amplificación (Corless, C. E., M. Guiver, R. Borrow, V. Edwards-Jones, A. J. Fox, and E. B. Kaczmarski. "Detección simultánea de *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* y *Streptococcus pneumoniae* en casos sospechosos de

meningitis y septicemia usando PCR en tiempo real". 2001. J. Clin. Microbiol. 39:1553-1558).

El uso de PCR multiplexada para la detección de genes de resistencia a antibióticos también ha sido descrito (J. Clin. Microbiol, 2003, 4089-4094, y 2005, 5026-5033). La sensibilidad de este ensayo (100 pg corresponden a 10 células de *Staphylococcus*, útiles en la detección directa de cultivos positivos) y la especificidad del mismo, requiere, sin embargo, mejoras procedimentales que aumenten su valor diagnóstico al situarse éste por debajo del horizonte clínico.

En la actualidad, existen varios métodos de multiplexación, pero cada uno 10 conlleva diversas limitaciones. En la detección multiplexada de bacterias mediante análisis de las temperaturas de fusión de las cadenas de ácido nucleico amplificadas (curvas de melting), se usan dos cebadores oligonucleotídicos por bacteria y cada bacteria es diferenciada según el tamaño y composición en bases nucleotídicas de la secuencia amplificada. Una limitación importante de este ensayo es que si hay dos 15 bacterias presentes, o diferentes niveles de bacterias-blanco presentes, el método no funciona correctamente. Bajo estas condiciones la amplificación sigue un perfil no lineal y se generan falsos positivos y negativos que son un problema intrínseco de este método.

Otras formas de detección múltiple de bacterias utilizan la amplificación de 20 regiones conservadas mediante cebadores universales. Un ejemplo de utilización de este método se puede encontrar en la patente US 6.699.670. Este método permite una rápida identificación de los agentes causantes de infección. Para identificar el microorganismo particular causante de la infección se hacen necesarios otros análisis, dado que, a priori, no se conoce la identidad del microorganismo, y en consecuencia se desconocen las 25 sondas específicas a utilizar para la identificación individual. Así, el número de sondas específicas de cada especie bacteriana que pueden incluirse en una reacción individual (incluidas la sonda universal y el control positivo) está restringido por la propia cinética enzimática de la reacción de amplificación y posterior generación de la señal de identificación medible. Este método también adolece de demasiados falsos positivos y falsos negativos por la propia estequiometría del proceso de hibridación.

30 Otros métodos describen la posibilidad de realizar, tras una amplificación obtenida utilizando cebadores universales, detecciones múltiples mediante la utilización de sondas universales que hibridan con regiones altamente conservadas con el fin de detectar la presencia de microorganismos, para posteriormente utilizar sondas especie-específicas

que hibridan a regiones no conservadas de los ácidos nucleicos extraídos de la muestra a fin de identificar individualmente cada uno de los microorganismo con precisión, de forma que se consigue evitar en buena medida los falsos positivos y negativos. Un ejemplo de estos métodos se puede encontrar en la solicitud de patente WO 2009/049007.

5 Entre las regiones de mayor valor taxonómico de cara a articular este tipo de aproximaciones se encuentra la secuencia del gen 16S del ARN ribosomal eubacteriano (16S rRNA) localizada entre las posiciones 1671 y 3229 de la cadena H del ADN mitocondrial. Este gen posee regiones altamente conservadas, prácticamente idénticas para todos los microorganismos, y regiones divergentes que son diferentes para las
10 diversas especies de microorganismos. Este gen 16S está presente en múltiples copias en los genomas de todos los patógenos bacterianos humanos que pertenecen al reino Eubacteria, y muchas especies bacterianas contienen hasta siete copias del gen. Un gen objetivo que está presente en múltiples copias aumenta la posibilidad de detección de los patógenos infectantes cuando estos se encuentran en baja proporción o diluidos en un
15 cuadro de infección polimicrobiana. Dado que la totalidad de la secuencia 16S rRNA está disponible, y estos datos indican la naturaleza altamente conservada del gen dentro del reino eubacteria, esta región es diana de identificación genérica para los integrantes de cualquier género eubacteriano. Además, hay suficiente variación en otras regiones internas y aledañas al gen 16S rRNA para proporcionar discriminación específica entre
20 las especies de los principales agentes causantes de cuadros clínicos infecciosos como la meningitis y diferentes variedades de septicemia. Es por ello que este gen ampliamente estudiado es utilizado por defecto en la identificación y caracterización de eubacterias. Diferentes descripciones de la utilización de este gen ribosomal pueden encontrarse en Weisburg W G., Barns S.M., Pelletier D., Lane D. "16S Ribosomal DNA
25 Amplification for Phylogenetic Study" Journal of Bacteriology, Jan. 1991, Vol 173 p. 697-703; Case RJ, Boucher Y, Dahllöf I, Holmström C, Doolittle WF, Kjelleberg S. "Use of 16S rRNA and rpoB genes as molecular markers for microbial ecology studies". January 2007. Appl. Environ. Microbiol. 73 (1): 278-88.y en Coenye T, Vandamme P "Intragenomic heterogeneity between multiple 16S ribosomal RNA operons in sequenced bacterial
30 genomes". November 2003. FEMS Microbiol. Lett. 228 (1): 45-9.

Con el fin de poder distinguir entre especies o mostrar variaciones genéticas tales como la presencia de factores de patogenicidad dentro de una misma especie bacteriana, la obtención de la secuencia nucleotídica desde su material genético constituye en muchos casos la única posibilidad de diferenciación. Esta secuencia nucleotídica puede

ser obtenida usando protocolos de secuenciación convencionales, basados en el procedimiento descrito por Sanger y Coulson en 1975 (Sanger F, Coulson AR. "A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase". *J Mol Biol.* Mayo 25, 1975, 94(3):441–448 y Sanger F, Nicklen s, y Coulson AR, "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors", *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977 Diciembre; 74(12): 5463–5467). Estos métodos están basados en el empleo de dideoxinucleótidos (ddNTPs) que carecen de uno de los grupos hidroxilo, de manera que cuando uno de estos nucleótidos se incorpora a una cadena de ADN en crecimiento, esta cadena no puede continuar elongándose ya que la enzima ADN polimerasa utilizada para realizar la elongación necesita un extremo 3' OH para añadir el siguiente nucleótido y el deoxinucleótido incorporado carece de este grupo hidroxilo. Posteriormente, se utilizan procedimientos electroforéticos, en gel o mediante electroforesis capilar automatizada, para resolver la secuencia nucleotídica en tripletes de incorporación para cada especie de dideoxinucleótidos. Estos procedimientos electroforéticos son de difícil introducción en la práctica clínica, debido principalmente a su coste económico y al tiempo que se requiere para el análisis.

Un ejemplo de aplicación de la secuenciación convencional basada en el método Sanger en la identificación de bacterias puede encontrarse en Fontana, et. al. "Use of MicroSeq 500 16S RNA Gene-Based Sequencing for Identification of Bacterial Isolates that Commercial Automated Systems Failed to Identify", 2005. *J Clin. Micr.* Vol.43, No. 2.

La elevada demanda de secuenciación de bajo coste que se ha generado desde el planteamiento de iniciativas como el Proyecto Genoma Humano y sus derivaciones a otros modelos animales, vegetales y microbianos, principalmente, ha dado lugar a la aparición de nuevas tecnologías de secuenciación. Una de estas nuevas tecnologías de secuenciación es la denominada "secuenciación mediante síntesis", la cual utiliza el proceso de síntesis de ADN por ADN polimerasa para identificar las bases presentes en la molécula complementaria de ADN. Básicamente, los diversos métodos de secuenciación mediante síntesis desarrollados hasta el momento consisten en marcar el cebador oligonucleotídico o los terminadores con un compuesto fluorescente, para posteriormente activar la reacción de secuencia. Los productos de la reacción se detectan directamente durante la electroforesis al pasar por delante de un láser que excitando los fluoróforos permite detectar la fluorescencia emitida.

Uno de los métodos de secuenciación más difundidos mediante síntesis es la pirosecuenciación, técnica que utiliza la polimerización del ADN dependiente de la enzima ADN polimerasa para polimerizar nucleótidos en secuencia. El proceso se completa incorporando cada vez un tipo de deoxinucleótidos diferente para detectar y 5 cuantificar después el número y especie de nucleótido añadido a una determinada localización por medio de la luz emitida en la liberación de los pirofosfatos (subproductos de la extensión por polimerización de la cadena de ADN). Descripciones de esta técnica pueden encontrarse en M. Margulies, et al. "Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors". 2005. Nature 437, 376-380 y en M. Ronaghi, S. Karamohamed, 10 B. Pettersson, M. Uhlen, and P. Nyren "Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release". 1996. Analytical Biochemistry 242, 84:89. Métodos de secuenciación utilizando la pirosecuenciación pueden encontrarse en las solicitudes de patentes WO1998/028440 y WO2000/043540, asignadas a Pyrosequencing AB, y WO2005/060345, asignada a Biotage AB. Debido a las limitaciones inherentes a la 15 técnica, la pirosecuenciación únicamente permite la secuenciación de fragmentos cortos de ADN, con un máximo de entre 50 y 80 nucleótidos por reacción completada.

La pirosecuenciación está empezando a ser una técnica ampliamente utilizada para identificar la especie a la que pertenecen bacterias cuya presencia se sospecha o que ya ha sido previamente comprobada por otros métodos de identificación, tales como 20 la PCR en tiempo real. Su aplicación sobre muestras clínicas permite incluso efectuar la identificación de factores de patogeneidad y/o resistencias a antibióticos de determinadas bacterias, pero no existe en la actualidad un método de pirosecuenciación que pueda ser utilizado en la identificación taxón-específica de bacterias a partir de muestras clínicas, de alimentos o medioambientales, sin tener un conocimiento previo del grupo genérico al 25 que pertenece la/s bacteria/s que se encuentran en esa muestra, así como para la identificación simultánea de varias bacterias presentes en una muestra sin conocer ni sospechar previamente qué bacterias pueden encontrarse en ella.

Básicamente, la pirosecuenciación se ha orientado desde su nacimiento al análisis masivo, pero no focalizado, de secuencias más o menos cortas dentro de una mezcla de 30 muestras de ADN por identificar. De hecho, la revista Science ha registrado dentro de su lista de los avances moleculares más relevantes del año 2008 la extracción de más de un millón de bases del ADN de un fósil de Neandertal, 13 millones de bases del genoma de un Mamut, y más de 15 millones de bases del ADN de bacterias, hongos, virus y plantas de la época en que vivieron esos animales; usando nuevas técnicas de análisis como la

metagenómica y la pirosecuenciación. Por este motivo, la aproximación de análisis focalizado taxón-específico para cualquier especie eubacteriana mediante pirosecuenciación busca una aplicación nueva en un campo de menor avance para esta técnica.

5 Se citan a continuación, a modo de referencia, diversos ejemplos de la utilización focalizada de esta técnica en el campo de la identificación de microorganismos: Brown-Elliott BA, Brown JM, Conville PS, Wallace RJ Jr. "Clinical and laboratory features of the Nocardia spp. based on current molecular taxonomy". Clin Microbiol Rev. 2006 Apr;19(2), 259-82; Jalava J and Marttila H. "Application of molecular genetic methods in macrolide, 10 lincosamide and streptogramin resistance diagnostics and in detection of drug-resistant Mycobacterium tuberculosis". APMIS. Dec 2004, 112(11-12): 838-855; Clarke SC. "Pyrosequencing: nucleotide sequencing technology with bacterial genotyping applications". Expert Rev Mol Diagn. 2005 Nov. 5(6):947-53; Ronaghi M., Elahi E. "Review Pyrosequencing for microbial typing". Journal of Chromatography B. 2002, 782 15 67-72; Engstrand L. "The usefulness of nucleic acid tests for the determination of antimicrobial resistance". Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation. 2003, Volume 63, Supplement 239: 47-52.

Un ejemplo de utilización de la secuenciación mediante síntesis utilizando el gen 16S puede encontrarse en J. A. Jordan, A. R. Butchko, M. B. Durso "Use of 20 Pyrosequencing of 16S rRNA Fragments to Differentiate between Bacteria Responsible for Neonatal Sepsis.". Journal of Molecular Diagnostics, February 2005, Vol. 7, No. , 105-110. Otro ejemplo de utilización puede encontrarse en la patente WO/2004/046385 "A method for inter-species differentiation and identification of a gram-positive bacteria", asignada a Biotage AB.

25 Otro ejemplo de la utilización de la secuenciación mediante síntesis en la identificación de microorganismos en una muestra puede encontrarse en la patente US 2004 023209, asignada a Pyrosequencing AB. Esta patente describe un procedimiento de identificación de bacterias que utiliza como cebadores de la reacción de amplificación oligonucleótidos degenerados o de baja especificidad, mediante el procedimiento de 30 amplificación de ácidos nucleicos denominado "primer extensión", que amplifican regiones inespecíficas de los genes bacterianos 16S y CoNS, en lugar de los cebadores oligonucleotídicos específicos de regiones determinadas del gen 16S descritos en la presente invención. Los fragmentos nucleotídicos obtenidos mediante la utilización de los

cebadores degenerados presentan diferentes tamaños, y estos fragmentos de diferentes tamaños son posteriormente secuenciados, analizándose las secuencias obtenidas para conseguir la identificación a nivel especie del microorganismo en cuestión.

Un ejemplo de comparación de homologías relativas entre *M. genitalium* y *H. influenzae* (240 genes comunes), así como con 25 grupos bacterianos [no se dibujan todos ellos; sólo el área de solapamiento genómico] seleccionados de manera aleatoria (80 genes). En todos los casos, los genes ribosomales sobre los que se centra esta invención están conservados y adoptan una distribución relativa según el diagrama de la figura 1. (C): Distribución relativa -según diagrama circular- del área de solapamiento genómico correspondiente a la primera superposición de la figura anterior. Los arcos correspondientes a genes ribosomales presentan una longitud proporcional al total de la homología entre las especies analizadas (*M. genitalium* y *H. influenzae*).

En la amplificación de ácidos nucleicos mediante estas técnicas (amplificación que también es utilizada en los procedimientos de secuenciación mediante síntesis), cada uno de los componentes que intervienen en la reacción, es decir, la enzima ADN polimerasa, el tampón de reacción con los aditivos mejorantes de la reacción o estabilizantes, el cloruro de magnesio, o cloruro de manganeso en caso de RT, los oligonucleótidos utilizados como cebadores de la reacción, los desoxirribonucleótidos (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) y la muestra conteniendo el ácido nucleico a amplificar, se encuentran por separado, conservados mediante congelación, y deben ser mezclados de manera previa a la realización de la reacción, siendo necesario añadir y mezclar cantidades muy pequeñas (microlitros) de cada uno de ellos. Esta acción produce frecuentes errores en la administración y pipeteo de cada uno de los reactivos citados, lo que acaba generando una incertidumbre acerca de la reproducibilidad de los resultados obtenidos mediante la aplicación de estas técnicas, incertidumbre especialmente preocupante en el caso del diagnóstico humano. Esta variabilidad por la posibilidad de error en el pipeteo de los diversos reactivos a añadir a la reacción de amplificación también afecta a la sensibilidad de la técnica, lo cual genera una nueva incertidumbre acerca de la aplicación de estas técnicas en el diagnóstico humano de enfermedades, y especialmente en la determinación de niveles de infección y de niveles de expresión génica.

Además, durante el pipeteo y adición a la mezcla de reacción de la muestra a analizar, se producen aerosoles que frecuentemente producen contaminaciones cruzadas

entre muestras a analizar (Kwok, S. et al., *Nature*, 1989, 339:237-238), generándose resultados falsos positivos, de gran transcendencia en el caso del diagnóstico humano.

Se han desarrollado diversos sistemas de preparación y estabilización de actividades enzimáticas con el objetivo de evitar errores inherentes a la excesiva manipulación que habitualmente requiere su utilización, así como para eliminar problemas de contaminaciones cruzadas. La solicitud de patente WO 93/00807 describe un sistema para la estabilización de biomateriales durante el proceso de liofilización. Otras referencias son las patentes y documentos que se indican a continuación: US 5.861.251 asignada a Bioneer Corporation; WO 91/18091, US 4.891.319 y US 5.955.448, asignadas a Quadrant Holdings Cambridge Limited; US 5.614.387, asignada a Gen-Probe Incorporated; US 5.935.834, asignada a Asahi Kasei Kogyo Kabushiki Kaisha, y las publicaciones: Pikal M.J., *BioPharm* 3:18-20, 22-23, 26-27 (1990); Carpenter et al., *Cryobiology* 25:459-470 (1988); Roser B., *Biopharm* 4:47-53 (1991); Colaco et al, *Bio/Technol.* 10:1007-1011 (1992); y Carpenter et al., *Cryobiology* 25:244-255 (1988).

15 Biotools Biotechnological & Medical Laboratories, S.A, autor de la presente solicitud, ha desarrollado un sistema de estabilización mediante gelificación de mezclas complejas de biomoléculas que permite la estabilización de mezclas de reacción durante largos periodos de tiempo en las más variadas condiciones de almacenamiento (WO 02/072002). Mediante la utilización de este sistema se han conseguido estabilizar 20 mezclas de reacción complejas, tales como mezclas para reacciones de amplificación génica, que contienen todos los reactivos necesarios para la realización del experimento, alicuotados en viales independientes "listos para usar" (ready-to-use), en los que únicamente es necesario reconstituir la mezcla de reacción y añadir el ácido nucleico problema.

25 En resumen, actualmente existe una demanda creciente de métodos diagnósticos capaces de identificar bacterias de una manera rápida y precisa en muestras clínicas, evitando contaminaciones cruzadas y simplificando la compleja manipulación humana que generalmente requieren los métodos moleculares anteriormente descritos, mejorando sustancialmente la reproducibilidad y confiabilidad de los resultados diagnósticos 30 obtenidos. En situaciones de emergencia clínica causadas por septicemia, la identificación certera, rápida y precisa de la bacteria o de las bacterias presentes y/o causantes de la infección o potencial futura infección es una necesidad de primer orden en la práctica médica para la prescripción del mejor tratamiento disponible adecuado.

Esta necesidad diagnóstica rápida, precisa, reproducible y de sencilla realización no se encuentra satisfecha en la actualidad.

La presente invención tiene por propósito satisfacer esta necesidad de identificación taxón-específica simultánea, rápida, precisa, reproducible y de sencilla realización de las bacterias presentes en una muestra clínica cuando no se conoce previamente el género de bacterias se encuentran presentes en la muestra mediante el método y kit objetos de la invención.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. (A y B): Comparación de homologías relativas entre *M. genitalium* y *H. influenzae* (240 genes comunes), así como con 25 grupos bacterianos [no se dibujan todos ellos; sólo el área de solapamiento genómico] seleccionados de manera aleatoria (80 genes). En todos los casos, los genes ribosomales sobre los que se centra esta invención están conservados y adoptan una distribución relativa según el diagrama de la figura 1. **(C):** Distribución relativa -según diagrama circular- del área de solapamiento genómico correspondiente a la primera superposición de la figura anterior. Los arcos correspondientes a genes ribosomales presentan una longitud proporcional al total de la homología entre las especies analizadas (*M. genitalium* y *H. influenzae*).

Figura 2: Resultados de la reacción de pirosecuenciación relativos al ejemplo 1.

Figura 3: Resultados de la reacción de pirosecuenciación relativos al ejemplo 2.

Figura 4: Calidad de la pirosecuenciación utilizando los reactivos de amplificación gelificados. **(A)** Sobre una secuencia obtenida de 36 bases, todas fueron consideradas de buena resolución, no registrándose ninguna posible indeterminación. **(B)** Sobre una secuencia de 38 bases, al igual que en la Fig. 4a en 38 bases secuenciadas no se registró ninguna indeterminación. **(C)** Sobre una secuencia de 33 bases. En este caso, sólo 4 fueron consideradas de buena resolución (bases en gris claro), dos se consideraron de resolución media (bases en blanco), y 27 fueron consideradas como posibles indeterminaciones (bases en gris oscuro).

OBJETO DE LA INVENCIÓN

La presente invención consiste en un nuevo método rápido, preciso y de sencilla manipulación para diferenciación e identificación de bacterias en una muestra biológica,

mediante el análisis por secuenciación (método de secuenciación mediante síntesis) de tres regiones del gen 16S del RNA ribosomal bacteriano, obteniéndose un patrón genético taxón-específico basado en la secuencia nucleotídica obtenida, así como el kit que contiene estabilizados por gelificación y posteriormente secados hasta un grado de 5 humedad del 10% al 30%, los reactivos necesarios para llevar a cabo dicho método. Para la realización de esta identificación taxón-específica no es necesario el conocimiento previo ni la suposición de la familia, del género ni de la especie de la bacteria o conjunto de diferentes bacterias contenidas en la muestra. Preferentemente, el método de secuenciación utilizado es la secuenciación mediante síntesis, y dentro de los diversos 10 métodos de secuenciación mediante síntesis que se utilizan en la actualidad, el método utilizado preferentemente es la pirosecuenciación, si bien podría ser utilizado cualquier otro método de análisis de secuencias de ácidos nucleicos actualmente utilizado o por utilizar en un futuro.

Las secuencias nucleotídicas que identifican a cada una de las bacterias son bien 15 conocidas, y se encuentran disponibles en diversas bases de datos genéticas publicadas, tales como GenBank y EMBL, entre otras.

Mediante la utilización de la pirosecuenciación y de la estabilización mediante el proceso de gelificación de los diversos reactivos que intervienen en la pirosecuenciación en cada uno de los pocillos de las placas en las que se realiza el análisis, se obtiene un 20 resultado diagnóstico rápido, fiable y con una muy baja manipulación manual.

Además, sorprendentemente, al llevar a cabo la estabilización mediante el proceso de gelificación por adición al medio de una solución acuosa estabilizante y posterior secado hasta un grado de humedad entre un 10% y un 30%, se obtiene la ventaja inesperada de una mejora en la resolución de entre un 75% y un 90%, incluso en 25 tamaños de secuencias normales (30-50 bases). Como consecuencia de dicha ventaja se puede obtener también una secuenciación de fragmentos que son entre un 20% y un 35% más largos que los obtenidos con los métodos que no incluyen dicha estabilización.

La presente invención permite además en un único análisis la identificación múltiple de las diversas bacterias que pudieran estar presentes en la muestra biológica, 30 sin necesidad de tener un conocimiento previo ni suposición del tipo de bacterias que pudieran estar presentes, utilizando para ello únicamente tres pares de cebadores en la amplificación del fragmento a secuenciar, cuyo valor taxonómico permite solapar la

información generada por cada secuencia avanzando en el proceso de identificación de los niveles de Familia a Género y finalmente a Especie.

Adicionalmente, la presente invención permite descartar falsos negativos procedentes de hemocultivos. Por ejemplo, en la Tabla 1 se muestra el porcentaje de 5 resultados identificados con éxito a nivel de especie, género y familia sobre 60 muestras de hemocultivo positivas tras la incubación y porcentaje de resultados identificados con éxito a nivel de especie, género y familia sobre 12 muestras de hemocultivo negativas tras la incubación.

% De identificación	Taxón Familia	Taxón Género	Taxón Especie
Hemocultivo positivo	100%	99%	96%
Hemocultivo negativo	45%	45%	40%

10 TABLA 1: se muestra el porcentaje de resultados identificados con éxito a nivel de especie, género y familia

Debido a la gran sensibilidad del análisis es imprescindible la utilización de una enzima ADN polimerasa ultrapurificada (libre de cualquier contaminación con ADN bacteriano que pudiera generarse durante el proceso de síntesis biológica de la enzima) en el paso de secuenciación mediante síntesis, pues la presencia de este ADN contaminante puede 15 dar lugar a falsos positivos que modificarían el resultado del diagnóstico (C.E. Corless, J. Clin. Microbiol, 2000, 1747-1752). Esta posible contaminación es especialmente importante cuando la enzima ADN polimerasa ha sido sintetizada como recombinante en *Escherichia coli*, pues las bacterias que integran el grupo taxonómico al que pertenece *E. coli* (las Gram-negativas γ -Proteobacterias) son los principales patógenos a identificar en 20 caso de septicemia. Además, dada la proximidad evolutiva existente entre ellas, el incremento exponencial en el número de copias inherente a la amplificación de ácidos nucleicos exige el uso de una enzima ADN polimerasa de alta fidelidad de copia, con el fin de evitar la introducción de mutaciones puntuales en los ciclos iniciales de amplificación que pudieran falsear la secuencia obtenida. Esta alteración de la secuencia 25 obtenida supondría un resultado erróneo del análisis El kit descrito en esta patente incorpora la enzima Ultratools DNA polimerasa, manufacturada por Biotools Biotechnological & Medical Laboratories S.A. para evitar este problema.it

Más concretamente, la presente invención consiste en un proceso que requiere un paso inicial de extracción genérico mediante técnicas estandarizadas, manuales o automatizadas, seguido de un proceso de amplificación inicial del ADN ribosomal de mayor conservación, que permiten -mediante la utilización de tres reacciones de 5 amplificación diferentes y simultáneas- una superposición seriada de los resultados generados por su secuenciación para alcanzar los niveles taxonómicos de identificación a nivel de Género, Familia y Especie. Esta amplificación inicial de las regiones ribosomales seleccionadas tiene como objeto la generación de fragmentos marcados por biotinilización en el extremo 3'OH, que serán posteriormente inmovilizados, aislados por 10 desnaturalización básica de la doble hélice generada y, finalmente, secuenciados. Este proceso de amplificación se realiza en una placa multipocillo en la cual cada uno de ellos contiene todos los reactivos necesarios para realizar la amplificación específica para el proceso de secuenciación posterior, es decir, Biotools ADN polimerasa ultrapura y de alta fidelidad de copia, cebadores biotinilados descritos en la presente invención, 15 deoxinucleótidos a incorporar en la reacción de amplificación (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), y el tampón de reacción optimizado. Todos estos reactivos se encuentran estabilizados mediante gelificación según el proceso descrito en la patente WO 02/072002, de manera que para realizar esta amplificación únicamente es necesario agregar agua bidestilada y el ácido nucleico extraído de la muestra en el paso inicial de 20 extracción genérico, pues el resto de los reactivos necesarios ya se encuentran dispensados sobre la placa multipocillo previamente bajo a las concentraciones precisas requeridas.

Los productos biotinilados obtenidos mediante la reacción de amplificación anterior constituyen el sustrato para la reacción de pirosecuenciación inmediatamente 25 posterior. Estos productos biotinilados son purificados previamente a su transferencia a la segunda placa en la cual se lleva a cabo el proceso de pirosecuenciación, utilizando el procedimiento e instrumentación recomendados por el fabricante del aparato utilizado para la secuenciación mediante síntesis. El proceso de purificación se realiza en tres pasos y sólo requiere un sistema de dispensación conectado a una bomba de vacío, 30 según se describe por el fabricante del aparato utilizado para la pirosecuenciación.

Esta segunda placa contiene en cada pocillo todos los reactivos necesarios para llevar a cabo la reacción de pirosecuenciación sobre cada uno de los fragmentos marcados en la amplificación previa. Estas enzimas y reactivos incorporados a cada uno de los pocillos de la placa son la ADN polimerasa ultrapura y de alta fidelidad, ATP-

sulfurilasa, Luciferasa, Apirasa, cebador de secuenciación, luciferina, adenosin-5'-fosfatosulfato (APS), deoxinucleótidos a incorporar en la reacción de extensión de la cadena de ADN a secuenciar (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), y el tampón de reacción. 5 Todos estos reactivos se encuentran estabilizados mediante gelificación según se describe en la patente WO 02/072002, a las concentraciones precisas requeridas para completar la reacción de secuenciación mediante síntesis.

El proceso descrito en esta patente también incorpora como innovación el uso del mismo cebador en la reacción de secuenciación mediante síntesis que el utilizado en la reacción de amplificación previa para acotar el extremo no biotinilado durante la 10 amplificación inicial. Esta aportación permite reducir el número de cebadores necesarios a dos (Amplificación fwd*-biotinilado, Amplificación rvs = Secuenciación fwd), siempre que las condiciones de la secuencia acotada en la amplificación inicial sean compatibles con la actividad de las enzimas que intervienen en el proceso final de secuenciación (ADN polimerasa ultrapura de alta fidelidad, ATP-sulfurilasa, Luciferasa y Apirasa).

15 Se ha comprobado que los componentes integrantes de la mezcla de gelificación suministrados por Biotools Biotechnological & Medical Laboratories S.A. y descritos en la patente WO 02/072002 estabilizan los reactivos y enzimas que intervienen en las reacciones tanto de amplificación como de pirosecuenciación posterior, mejorando el rendimiento de la capacidad de resolución, y consiguiéndose como consecuencia la 20 secuenciación de fragmentos oligonucleotídicos más largos que los que es posible secuenciar cuando estos reactivos y enzimas no se encuentran estabilizados mediante gelificación. La mejora entre un 75% y un 90% de la resolución de la pirosecuenciación es inesperada y además importante para llegar a obtener cifras de hasta el 100% de certidumbre en la identificación de las bacterias en la muestra. Por indeterminación de 25 secuencia se considera la no determinación precisa de la base nucleotídica que compone la secuencia del ácido nucleico. Al añadir la mezcla estabilizante, se observa una sustancial mejora de la discriminación entre el pico de emisión que corresponde al nucleótico que se incorpora y el ruido de fondo causado por el resto de los sustratos de la reacción de pirosecuenciación. La calidad viene determinada por lo bien definido que 30 queda el pico de emisión de un dNTP que se integra a la secuencia, generando una intensidad que claramente lo diferencia del ruido e interferencia del fondo. Por eso en el caso de la mezcla no gelificada, sólo se obtienen las tres primeras bases de máxima calidad según el algoritmo del pirosecuenciador porque a partir de la tercera ronda, el fondo se diferencia cada vez menos de los picos de emisión correspondientes a cada

dNTP incorporado. Un ejemplo es el de dos secuencias de calidad alta en su totalidad obtenidas al aplicar la gelificación (ejemplo 3, figura 4).

Concretamente, se considera especialmente beneficiosa la mezcla de gelificación formada por trehalosa, melezitosa, glucógeno o rafinosa y lisina o betaina, en la reacción 5 de pirosecuenciación.

Las secuencias obtenidas tras el proceso de secuenciación mediante síntesis son comparadas con las secuencias depositadas y anotadas en bases de datos públicas con el fin de obtener la identificación precisa de los microorganismos presentes en la muestra a analizar. El alineamiento de las secuencias generadas es totalmente compatible con los 10 motores de búsqueda de uso estandarizado en investigación y clínica pudiendo ser realizado, por ejemplo, utilizando el motor de búsqueda BLAST sobre la base de secuencias GenBank (NCBI), Assemble, etc.

La composición y los reactivos descritos pueden ser empaquetados en kits individuales. El kit que incorpora la presente invención está compuesto por una primera 15 placa multipocillo que contiene en cada pocillo uno de los tres pares de cebadores nucleotídicos marcados en su extremo 3' OH mediante biotina, o cualquier otro tipo de marcaje utilizable para la secuenciación, tales como fluoróforos, necesarios para la obtención de los fragmentos secuenciables marcados, junto con todos los reactivos necesarios para una amplificación libre de DNA contaminante (enzima ADN polimerasa 20 ultrapura y de alta fidelidad, deoxinucleótidos y tampón de reacción), dosificados a las concentraciones óptimas para la generación de la reacción de amplificación, todos ellos premezclados y estabilizados mediante gelificación. Los fragmentos resultantes de esta amplificación podrían ser secuenciados mediante cualquier método conocido de secuenciación, siendo la secuencia obtenida identificativa de la especie de bacteria, o de 25 las distintas especies de bacterias, presentes en la muestra. Preferentemente, estos fragmentos resultantes de esta amplificación son secuenciados mediante técnicas de secuenciación mediante síntesis, y más preferentemente, mediante la técnica denominada pirosecuenciación.

En esta primera placa anteriormente descrita se obtienen los fragmentos 30 marcados secuenciables, y que son transferidos tras purificación a una segunda placa que en cada pocillo contiene premezclados todos los elementos necesarios para llevar a cabo la reacción de secuenciación, a las concentraciones óptimas para la generación de la reacción de amplificación, y estabilizados mediante gelificación. En el caso preferente

de la utilización de la pirosecuenciación, estos elementos necesarios que se encuentran premezclados y estabilizados son: la ADN polimerasa ultrapura y de alta fidelidad, ATP-sulfurilasa, Luciferasa, Apirasa, cebador de secuenciación (según lo descrito anteriormente), luciferina, adenosin-5'-fosfatosulfato (APS), deoxinucleótidos a incorporar 5 en la reacción de extensión de la cadena de ADN a secuenciar (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), y el tampón de reacción.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

En la presente invención, se entiende por "identificación taxón-específica" la capacidad que tiene un determinado método analítico de distinguir e identificar a nivel 10 taxonómico de especie, una determinada eubacteria entre otras varias especies de microorganismos que pudieran estar presentes o no en la muestra a analizar.

Por "muestra" se entiende cualquier tipo de muestra que potencialmente pudiera contener bacterias, y la cual es posible analizar mediante el método indicado en la presente invención, bien directamente o bien indirectamente, por ejemplo mediante 15 cultivo bacteriano realizado a partir de la muestra inicial. La muestra puede ser de sangre, orina, líquido cefalorraquídeo, esputo, secreción nasal, o cualquier otro tipo de fluido o secreción corporal, procedente tanto de humanos como animales, o el cultivo bacteriano de cualquier tipo o formato, realizado a partir de estos fluidos. La muestra también puede proceder de alimentos o líquidos alimentarios, tanto destinados a humanos como para 20 animales, o del cultivo bacteriano realizado a partir de estos alimentos, o de muestras tomadas en el medio ambiente, tales como aguas, suelos o aire, concentradas o no, o del cultivo bacteriano realizado a partir de dichas muestras medioambientales.

Por "oligonucleótido" se entiende un polímero monocatenario integrado por al menos dos subunidades nucleotídicas unidas entre sí mediante un enlace de tipo 25 covalente o interacción fuerte equivalente. Los grupos azúcares de las subunidades nucleotídicas pueden ser ribosa, deoxiribosa, o modificaciones derivadas de estos azúcares. Las unidades nucleotídicas de un oligonucleótido pueden estar unidas por enlaces fosfodiester, fosfotioato, metilfosfoato, o cualquier otro enlace que no evite la capacidad de hibridación del oligonucleótido. Además, un oligonucleótido puede contener 30 nucleótidos no comunes o moléculas no nucleotídicas, tales como péptidos. Tal y como es utilizado en la presente invención, un oligonucleótido es un ácido nucleico, preferentemente ADN, pero pudiendo ser ARN, o una molécula que contiene una combinación de ribonucleótidos o deoxiribonucleótidos covalentemente unidos.

El término “cebador” hace referencia a un oligonucleótido que actúa como punto de iniciación de la síntesis enzimática del ADN bajo condiciones en las cuales la polimerización de los nucleótidos se produce a partir del citado cebador, extendiéndolo, e introduciendo los nucleótidos de manera complementaria a la cadena de ácido nucleico 5 que sirve como molde. Esta elongación de la cadena se produce en unas condiciones apropiadas de temperatura y de tampón de reacción. En la presente invención, el cebador es preferiblemente un oligonucleótido monocatenario de longitud comprendida entre 15 y 40 nucleótidos.

En la presente invención los términos “ácido nucleico”, “oligonucleótido” y 10 “cebador” hacen referencia a fragmentos oligoméricos integrados por nucleótidos. Estos términos no deben ser limitados por su longitud expresada en forma de nucleótidos que integran el polímero lineal, siendo los nucleótidos que los componen deoxiribonucleótidos conteniendo 2-deoxi-D-ribosa, ribonucleótidos conteniendo D-ribosa, y cualquier otro N-glicósido de una base púrica o pirimidínica, o de modificaciones de estas bases púricas y 15 pirimidínicas. Estos términos hacen referencia a ADN monocatenario y bicanetario, así como ARN monocatenario o bicanetario.

El término “condiciones de amplificación” hace referencia a las condiciones de reacción (temperatura, condiciones de tamponamiento, etc.) en las que se produce la reacción de amplificación del ácido nucleico molde que se pretende amplificar. En la 20 presente invención, las condiciones de amplificación tienen como único requerimiento mantener la temperatura de anillamiento en 54°C. El resto de los parámetros pueden ser ajustados dependiendo de la procedencia, método de extracción y rendimiento, sin pérdidas contrastadas de robustez en el proceso.

Por “amplificación” se entiende la reacción que aumenta el número de copias de 25 una región determinada de un ácido nucleico.

Por “secuenciación” se entiende cualquier proceso químico, físico o enzimático destinado a conocer la secuencia nucleotídica específica de un fragmento de ácido ribonucleico (ARN) o de ácido desoxirribonucleico (ADN) procedente de una muestra determinada.

30 El término “secuenciación mediante síntesis” hace referencia a cualquier método de secuenciación de ácidos nucleicos que requiera la actividad enzimática necesaria para consolidar enlaces nucleotídicos entre las subunidades anteriormente descritas como

deoxirribonucleótidos, siendo éstos los sustratos funcionales de la reacción de secuenciación.

Por "patrón nucleotídico" se entiende el producto/resultado de la secuenciación, preferentemente de la secuenciación mediante síntesis. El patrón nucleotídico representa 5 el orden en el que los nucleótidos son incorporados en la reacción de secuenciación.

Por "estabilización" se entiende la preservación de las cualidades químicas y bioquímicas de los diversos reactivos, tampones de reacción, mejorantes de reacción, y enzimas que intervienen en una reacción enzimática, en este caso la amplificación de ácidos nucleicos y las reacciones asociadas a la secuenciación mediante síntesis, una 10 vez incluidos todos estos reactivos, tampones de reacción, potenciadores de reacción y enzimas en un mismo contenedor, en este caso tubos o placas multipocillo, de manera que se encuentran dosificados cada uno de ellos a las cantidades óptimas de reacción, y no interactúan ni reaccionan entre sí, inmovilizando la reacción bioquímica en la que intervienen, pudiéndose activar la reacción enzimática a voluntad del usuario, sin haberse 15 producido una disminución significativa de su actividad, habiendo transcurrido días, semanas, meses o incluso años después de su mezcla y estabilización.

La estabilización así entendida se consigue mediante la adición de una mezcla estabilizante a una solución que contiene la mezcla de reacción, y la posterior eliminación de la totalidad o parte del agua presente en la solución resultante. Esta eliminación de la 20 totalidad o parte del agua puede ser conseguida mediante procesos de liofilización, desecado en lecho fluido, desecado a temperatura ambiente y presión atmosférica, desecado a temperatura ambiente y baja presión, desecado a alta temperatura y presión atmosférica, y desecado a alta temperatura y baja presión.

En la presente invención, el procedimiento de estabilización preferentemente 25 utilizado es la estabilización mediante gelificación, descrito en la patente WO 02/072002, asignada a Biotools Biotechnological & Medical Laboratories, S.A. La mezcla estabilizante de la mezcla de reacción preferentemente está compuesta por trehalosa, melezitosa, lisina o betaína y glucógeno o rafinosa, a diferentes concentraciones en dependencia de la reacción enzimática a estabilizar. Más preferentemente la mezcla de gelificación está 30 compuesta por trehalosa, melezitosa, glucógeno y lisina. El método de extracción del agua de la mezcla de reacción tras la adición de la mezcla de agentes estabilizantes es preferentemente en la presente invención la desecación mediante vacío a temperatura comprendida entre los 30°C y los 40°C, dependiendo de la reacción enzimática a

estabilizar. Concretamente, en la presente invención el contenido de humedad se mantiene entre un 10-30% de agua.

La presente invención hace referencia a un método para realizar la identificación taxón-específica de una o varias eubacterias simultáneamente en una muestra, mediante 5 el análisis del patrón nucleotídico de la o las secuencias de nucleótidos obtenidas mediante secuenciación mediante síntesis de tres regiones diferentes pertenecientes al gen 16S del ARN ribosomal, previamente amplificadas antes de proceder a sus secuenciación. La invención se basa en primera instancia, en la posibilidad de identificar 10 una bacteria llegando al nivel taxonómico de especie, utilizando el patrón nucleotídico obtenido por la superposición de las secuencias de tres regiones separadas del gen 16S 15 del ARN ribosomal. Este patrón nucleotídico representa una firma genética inequívoca identificativa de las diferentes especies bacterianas presentes en una muestra, y puede ser comparado con los patrones de referencia depositados en las diversas bases de datos genéticas publicadas utilizando motores de búsqueda expresamente diseñados para ello.

Para llevar a cabo la invención, se utilizan tres pares de cebadores diferentes diseñados con el fin de amplificar tres regiones diferentes del gen 16s del ARN ribosomal eubacteriano (Tabla 2). Las secuencias específicas de este gen son bien conocidas y se encuentran disponibles en varias bases de datos publicadas, tales como GenBank y 20 EMBL. Los cebadores de amplificación han sido diseñados en base al estado del arte, considerando su contenido en las bases citosina y guanina, así como las múltiples alternativas de diseño que pudieran solaparse en las regiones seleccionadas con el fin de evitar la formación de estructuras secundarias internas, previniendo la formación de 25 dimerizaciones entre cebadores y ponderando sus temperaturas de fusión para alcanzar un óptimo ajuste a la cadena nucleotídica molde. Se ha fijado un estándar de temperatura de anillamiento a 54°C, que podría verse modificado en función de cambios entre las secuencias a hibridar.

Región V1

Bio-V1F	Bio- SEQ. ID No. 1	Biotin-GKAGAGTTGATCCTGGCTCAG
V1b	SEQ. ID No. 2	GYRTTACTCACCCGTYCGCCRCT

Región V2

Bio-AS5	Bio- SEQ. ID No. 3	Biotin-ACACGGYCCAGACTCCTAC
AS9b	SEQ. ID No. 4	CGGCTGCTGGCACGKAGTTAGCC

Región V3

Bio-V3F	Bio- SEQ. ID No. 5	Biotin-GCAACGCGAAGAACCTTACC
V3S	SEQ. ID No. 6	GACGACARCCATGCASCACCT

TABLA 2: Secuencias de los cebadores utilizados en la amplificación por PCR del gen 16S
5 del ARNr.

La primera pareja de cebadores indicados en la tabla 2 amplifica la región del gen 16S acotada por sus secuencias, generando un fragmento promedio de aproximadamente 250 pares de bases nucleotídicas dentro de la región ribosomal altamente conservada. Al tratarse del fragmento de mayor tamaño, el resultado de su 10 secuencia identifica a nivel genérico a la eubacteria presente en la muestra, si bien es necesaria la superposición de las secuencias obtenidas con los pares de cebadores siguientes para alcanzar un nivel de identificación a nivel de especie.

La segunda y tercera parejas de cebadores indicados en la tabla 2 amplifica la región del gen 16S acotada por sus secuencias, generando un fragmento promedio de 15 aproximadamente 100 pares de bases nucleotídicas dentro de la región ribosomal altamente conservada. Dependiendo del grado de variación intraespecífica de la eubacteria presente en la muestra, se hará necesaria la superposición con uno o ambos productos de amplificación menor, si bien el solapamiento de las tres secuencias (250bp + 100bp + 100bp) genera un porcentaje de identificación superior al 96%, tal y como se 20 recoge en las Figuras 2 y 3.

Los fragmentos de amplificación obtenidos pueden ser secuenciados utilizando cualquier tipo de reacción de amplificación de secuencias específicas del ADN o del ARN de un organismo cualquiera. En la presente invención, los fragmentos de amplificación son obtenidos de manera simultánea y en la misma reacción de amplificación mediante la 25 técnica de PCR, utilizando las tres parejas de cebadores indicadas en la tabla 2 y descritos anteriormente (secuencias SEQ. ID. No. 2, 4 y 6). De cara al diseño de un

procedimiento robusto, es prácticamente necesario el uso de una ADN polimerasa que no contenga trazas de ADN exógeno contaminante y que a la par tenga una baja tasa de error en la incorporación de los nucleótidos, tal como la enzima Ultratools ADN polimerasa (Biotools Biotechnological & Medical Laboratories, S.A.).

5 Las condiciones de amplificación mediante PCR indicadas en la Tabla 3 fueron optimizadas para conseguir las condiciones de reacción apropiadas para la amplificación de manera simultánea de las tres regiones del gen 16S bacteriano extraído de la muestra. Cada fragmento de amplificación puede ser también amplificado en reacciones de PCR realizadas por separado. En la presente invención, la amplificación se realiza en
10 una única reacción mediante la cual se amplifican de manera simultánea las tres regiones que posteriormente se secuenciarán para identificar la especie o las especies bacterianas presentes en la muestra.

Desnaturalización inicial	96°C durante 5 minutos
Programa cíclico	30 ciclos
Paso 1 (desnaturalización)	95°C durante 1 minuto
Paso 2 (anillamiento)	54°C durante 1 minuto
Paso 3 (extensión)	74°C durante 30 segundos
Extensión final	72°C durante 10 minutos

15 TABLA 3: Tabla orientativa de las condiciones de amplificación. (La amplificación tiene como único requerimiento mantener la temperatura de anillamiento en 54°C, el resto de los parámetros pueden ser ajustados dependiendo de la procedencia, método de extracción y rendimiento, sin pérdidas contrastadas de robustez en el proceso).

EJEMPLOS

20 **Ejemplo 1:**

La muestra de sangre original fue recogida en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario La Paz en formato estándar de extracción sanguínea en planta por vía intravenosa. El cuadro presentado por el paciente requería una identificación exacta del patógeno, porque no permitía definir origen ni evolución encontrándose sometido a
25 tratamiento antibiótico profiláctico según la práctica habitual para infecciones diagnosticadas, pero no caracterizadas. Un mililitro (1 ml) de la muestra de sangre fue

inoculado a un hemocultivo estándar para el enriquecimiento de la muestra, tardando 7h en generar el resultado positivo de crecimiento microbiano por incubación a 37°C. Dos gotas del hemocultivo fueron depositadas sobre el sistema GenoCard® (Hain Lifescience), para la inmovilización de muestras procedente de hemocultivo, resultando 5 adsorbidas a la superficie de la tarjeta perforable. Utilizando un sacabocados, se realizaron seis perforaciones para extraer seis trozos de superficie adsorbida, que fueron inmediatamente transferidos a razón de dos por pocillo a una placa multipocillo preparada como se explica a continuación.

La placa se dividió en grupos de tres pocillos/contenedores. En el primer pocillo de 10 cada uno de estos grupos, se añadió la mezcla de reacción compuesta por 0,4 µl de enzima Ultratools DNA polimerasa, manufacturada por Biotools Biotechnological & Medical Laboratories S.A., 5 µl del tampón de reacción que acompaña a la enzima antes citada y comercializado junto a ella, entre 0,1 µl y 0,3 µl de una solución 100mM contiendo los cuatro deoxirribonucleótidos que conforman la cadena del ácido 15 deoxirribonucleico (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), y entre 0,2 µl y 0,4 µl de una solución 100 µM de la pareja de cebadores descritos en la tabla 2 y que amplifican la región V1. A esta mezcla de reacción se le añadió la mezcla de estabilización, compuesta por entre 1 µl y 4 µl de una solución de trehalosa dihidrato 1M, entre 1 µl y 3 µl de una solución de melezitosa monohidrato 0,75M, entre 1 µl y 4 µl de glucógeno a una concentración de 20 200 gr/l, y entre 0,1 µl y 0,5 µl de DL lisina 0,05M. En el segundo pocillo se añadió la misma mezcla de reacción y la misma mezcla de estabilización que las utilizadas para el primer pocillo, reemplazando los cebadores que amplifican la región V1 por los que amplifican la región V2. En el tercer pocillo se añadió la misma mezcla de reacción y la misma mezcla de estabilización que las utilizadas para el primer pocillo, reemplazando 25 los cebadores que amplifican la región V1 por los que amplifican la región V3.

La placa así preparada se introdujo en una estufa de desecación al vacío y se sometió a un proceso de desecación calentando la placa entre 30°C y 37°C y sometiéndola a un vacío de 30 milibares durante un tiempo de dos a cuatro horas, hasta conseguir un grado de humedad entre el 10% y el 20%, obteniéndose de esta manera 30 una mezcla de reacción estabilizada conteniendo en el mismo pocillo todos los elementos y reactivos necesarios para la realización de la reacción de amplificación de la secuencia del ácido nucleico a secuenciar. El procedimiento anterior realizado para conseguir la mezcla de reacción estabilizada puede ser repetido, además de la placa multipocillo utilizada, en cualquier otro contenedor o cámara de reacción o superficie utilizadas o que

pudieran llegar a utilizarse para la realización de la reacción de amplificación de los ácidos nucleicos.

La amplificación se realizó bajo las condiciones ilustradas en la tabla 3, generando una serie de productos de amplificación que fueron transferidos a la placa de 5 pirosecuenciación según el protocolo recomendado por el fabricante del instrumento utilizado para la pirosecuenciación (Sample Preparation Guidelines for PSQ™96 and PSQ 96MA Systems, elaborado por Biotage AB, Suecia). La pirosecuenciación posterior se realizó en el aparato PSQ™96, fabricado por Biotage AB, Suecia, utilizando la mezcla enzimática para la secuenciación por síntesis descrita en apartados anteriores (ADN 10 polimerasa ultrapura y de alta fidelidad, ATP-sulfurilasa, Luciferasa, Apirasa, cebador de secuenciación, luciferina, adenosin-5'-fosfatosulfato (APS), deoxinucleótidos a incorporar en la reacción de extensión de la cadena de ADN a secuenciar (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), y tampón de reacción, generando el pirograma recogido en la figura 2 y que resultó automáticamente procesado por el software Identifire® (Biotage AB, Suecia) 15 (SEQ. ID. No 7). El resultado de las alineaciones automáticas según lo descrito en la descripción de la invención, produjo el resultado inequívoco con un 100% de identidad para el patógeno *Enterococcus faecalis* (figura 2).

Ejemplo 2:

La muestra original fue recogida en el Servicio de Microbiología del Hospital 20 Universitario La Paz en formato estándar para extracción sanguínea en planta por vía intravenosa. El cuadro presentado por el paciente requería una identificación exacta del patógeno, porque no permitía definir origen ni evolución encontrándose sometido a tratamiento antibiótico profiláctico según la praxis para infecciones diagnosticadas, pero no caracterizadas. Posible sospecha de cuadro polimicrobiano. Un mililitro (1 ml) de la 25 muestra de sangre fue inoculado a un hemocultivo estándar para el enriquecimiento de la muestra, tardando 7h en generar el resultado positivo a crecimiento microbiano por incubación a 37°C. Dos gotas del hemocultivo fueron depositadas sobre el sistema GenoCard® (Hain Lifescience), para la inmovilización de muestras procedente de hemocultivo, resultando adsorbidas a la superficie de la tarjeta perforable. Utilizando un 30 sacabocados, se realizaron seis perforaciones para extraer seis trozos de superficie adsorbida, que fueron inmediatamente transferidos a razón de dos por pocillo a una placa multipocillo preparada como se explica a continuación.

La placa se dividió en grupos de tres pocillos/contenedores. En el primer pocillo de cada uno de estos grupos, se añadió la mezcla de reacción compuesta por 0,4 µl de enzima Ultratools DNA polimerasa, manufacturada por Biotools Biotechnological & Medical Laboratories S.A., 5 µl del tampón de reacción que acompaña a la enzima antes citada y comercializado junto a ella, entre 0,1 µl y 0,3 µl de una solución 100mM contiendo los cuatro deoxirribonucleótidos que conforman la cadena del ácido deoxirribonucleico (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), y entre 0,2 µl y 0,4 µl de una solución 100 µM de la pareja de cebadores descritos en la tabla 2 y que amplifican la región V1. A esta mezcla de reacción se le añadió la mezcla de estabilización, compuesta por entre 1 µl y 4 µl de una solución de trehalosa dihidrato 1M, entre 1 µl y 3 µl de una solución de melezitosa monohidrato 0,75M, entre 1 µl y 4 µl de glucógeno a una concentración de 200 gr/l, y entre 0,1 µl y 0,5 µl de DL lisina 0,05M. En el segundo pocillo se añadió la misma mezcla de reacción y la misma mezcla de estabilización que las utilizadas para el primer pocillo, reemplazando los cebadores que amplifican la región V1 por los que amplifican la región V2. En el tercer pocillo se añadió la misma mezcla de reacción y la misma mezcla de estabilización que las utilizadas para el primer pocillo, reemplazando los cebadores que amplifican la región V1 por los que amplifican la región V3.

La placa así preparada se introdujo en una estufa de desecación al vacío y se sometió a un proceso de desecación calentando la placa entre 30°C y 37°C y 20 sometiéndola a un vacío de 30 milibares durante un tiempo de dos a cuatro horas, hasta conseguir un grado de humedad entre el 10% y el 20%, obteniéndose de esta manera una mezcla de reacción estabilizada contenido en el mismo pocillo todos los elementos y reactivos necesarios para la realización de la reacción de amplificación de la secuencia del ácido nucleico a secuenciar. El procedimiento anterior realizado para conseguir la 25 mezcla de reacción estabilizada puede ser repetido, además de la placa multipocillo utilizada, en cualquier otro contenedor o cámara de reacción o superficie utilizadas o que pudieran llegar a utilizarse para la realización de la reacción de amplificación de los ácidos nucleicos.

La amplificación se realizó bajo las condiciones ilustradas en la tabla 3, generando 30 una serie de productos de amplificación que fueron transferidos a la placa de pirosecuenciación según el protocolo recomendado por el fabricante del instrumento utilizado para la pirosecuenciación (Sample Preparation Guidelines for PSQ™96 and PSQ 96MA Systems, elaborado por Biotage AB, Suecia). La pirosecuenciación posterior se realizó en el aparato PSQ™96, fabricado por Biotage AB, Suecia, utilizando la mezcla

enzimática para la secuenciación por síntesis descrita en apartados anteriores (ADN polimerasa ultrapura y de alta fidelidad, ATP-sulfurilasa, Luciferasa, Apirasa, cebador de secuenciación, luciferina, adenosin-5'-fosfatosulfato (APS), deoxinucleótidos a incorporar en la reacción de extensión de la cadena de ADN a secuenciar (dATP, dCTP, dGTP, 5 dTTP), y tampón de reacción, generando el pirograma recogido en la figura 3, y que resultó automáticamente procesado por el software Identifire® (SEQ. ID. No. 8). El resultado de las alineaciones automáticas según lo descrito en la descripción detallada de la invención, produjo el resultado inequívoco con un 100% de identidad para el patógeno *Moraxella catarrhalis* y varios resultados potenciales con variedades de carácter 10 zoonótico que alcanzaron el 98% tal y como se ilustra en el informe definitivo generado por el sistema Identifire® (Biotage AB, Suecia). El subcultivo posterior y antibiograma permitió identificar al menos dos variedades de *Moraxella*, confirmando el positivo para la variedad *M. Catharrhalis* y la presencia en infección polimicrobiana de las variedades zoonóticas (figura 3).

15 **Ejemplo 3:**

Para mostrar el efecto mejorante de la reacción de pirosecuenciación de la mezcla utilizada para la estabilización mediante gelificación de la mezcla de reacción de amplificación (trehalosa, melezitosa, lisina y glucógeno), se recogieron tres muestras de sangre en el mismo día, y se realizó el hemocultivo de cada una de ellas. Los tres 20 hemocultivos generaron valor positivo en el incubador tras ocho horas y se subcultivaron en placas de agar-sangre no selectivo para recuento de Unidades Formadoras de Colonias (CFUs).

Los tres produjeron un resultado en el mismo orden de dilución, por lo que el recuento indica una concentración inicial en el mismo orden de magnitud de partida y 25 muy similar tras el enriquecimiento. La determinación del rango de concentración de las tres muestras ensayadas se llevó a cabo sembrando diluciones hasta un valor de 10^{-9} en placas conteniendo agar Mueller-Hinton (5% de sangre), e incubando a 37°C durante 18h. La concentración bacteriana se ajustó al recuento de colonias en la placa correspondiente a la dilución más alta con presencia de bacterias. La lectura se repitió a 30 las 24 h, de modo que la concentración final en el medio Mueller-Hinton fuera de aproximadamente 5×10^5 UFC/ml para las tres muestras ensayadas.

Se procesaron dos muestras seleccionadas aleatoriamente dentro de las tres caracterizadas mediante el procedimiento descrito en el párrafo anterior, utilizando tubos

de reacción contenido en cada uno de ellos los cebadores biotinilados descritos en la tabla 2 como Bio-V1F y V1b para la amplificación de la región V1 del gen 16S del ARNr (SEQ. ID. No. 1 y SEQ. ID. No. 2), previamente incorporados sobre la placa a las concentraciones precisas requeridas, y estabilizados tal y como se detalla en el proceso 5 descrito en el ejemplo 1 de la presente invención, junto al resto de los reactivos y enzimas necesarios para la realización de la reacción de amplificación.

En los pocillos donde se efectuó la caracterización de cada una de estas muestras, se añadió la mezcla de reacción compuesta por 0,4 μ l de enzima Ultratools DNA polimerasa, manufacturada por Biotools Biotechnological & Medical Laboratories 10 S.A., 5 μ l del tampón de reacción que acompaña a la enzima antes citada y comercializado junto a ella, entre 0,1 μ l y 0,3 μ l de una solución 100mM contiendo los cuatro deoxirribonucleótidos que conforman la cadena del ácido deoxirribonucleico (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), y entre 0,2 μ l y 0,4 μ l de una solución 100 μ M de la pareja de cebadores descritos en la tabla 2 y que amplifican la región V1. A esta mezcla de 15 reacción se le añadió la mezcla de estabilización, compuesta por entre 1 μ l y 4 μ l de una solución de trehalosa, dihidrato 1M entre 1 μ l y 3 μ l de una solución de melezitosa, monohidrato 0,75M entre 1 μ l y 4 μ l de glucógeno a una concentración de 200 gr/l, y entre 0,1 μ l y 0,5 μ l de DL lisina 0,05M.

Tras la reacción de amplificación y posterior pirosecuenciación del fragmento 20 amplificado (el producto de la amplificación inicial es directamente transferido a la placa de pirosecuenciación para su desnaturalización, equilibrado y pirosecuenciación propiamente dicha, sin necesidad de cuantificación intermedia) se obtuvieron dos secuencias de 36 bases (SEQ. ID. No. 9) y 38 bases (SEQ. ID. No. 10) de máxima 25 calidad, utilizando un programa de dispensación específico para estos cebadores con 60 ciclos de pirosecuenciación. Según el software Identifire® del pirosecuenciador PyroMark Q96 ID fabricado por Biotage AB, los pirogramas obtenidos quedan recogidos en las figuras 4 A y B.

Paralelamente, se procesó la tercera muestra mediante el mismo procedimiento de pirosecuenciación, pero habiendo realizado la amplificación inicial sin aplicar la mezcla 30 gelificada, mezclando de manera manual mediante una pipeta los diferentes reactivos y enzimas necesarios para la realización de la reacción de amplificación en el tubo de reacción, incluyendo los cebadores biotinilados descritos en la tabla 2 como Bio-V1F y V1b para la amplificación de la región V1 del gen 16S del ARNr (0,4 μ l de enzima

Ultratools DNA polimerasa, manufacturada por Biotools Biotechnological & Medical Laboratories S.A., 5 μ l del tampón de reacción que acompaña a la enzima antes citada y comercializado junto a ella, entre 0,1 μ l y 0,3 μ l de una solución 100mM contiendo los cuatro deoxirribonucleótidos que conforman la cadena del ácido deoxirribonucleico 5 (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), y entre 0,2 μ l y 0,4 μ l de una solución 100 μ M de la pareja de cebadores descritos en la tabla 2 y que amplifican la región V1).

Tras la reacción de amplificación y posterior pirosecuenciación aplicando los algoritmos para calcular la calidad de secuencia en base a la cantidad de luminiscencia registrada por el sistema PyroMark Q96 ID Biotage AB, se obtuvo la secuencia que 10 aparece en la Figura 4C (SEQ. ID. No 11).

Únicamente las cuatro primeras bases secuenciadas fueron consideradas de máxima calidad por el software Identifire® del pirosecuenciador PyroMark Q96 ID Biotage AB. Se obtuvo una calidad determinada como baja por el software para 27 bases, y 2 bases de las 33 totales fueron calificadas como de calidad media por el software 15 Identifire® del pirosecuenciador PyroMark Q96 ID Biotage AB. El pirograma obtenido se muestra como imagen en la Figura 4C.

En el caso de la mezcla no gelificada, sólo las tres primeras bases tienen una calidad óptima, ya que a partir de la tercera ronda de secuenciación, el fondo comienza a generar interferencias con las emisiones de los dNTPS incorporados.

20 En este ejemplo 3 se puede observar que las secuencias obtenidas utilizando la etapa de gelificación se identifican en un 100% como secuencias óptimas, no presentando indeterminaciones, mientras que el ensayo que no utiliza la estabilización por gelificación solo el 12% de la secuencia obtenida es considerada como secuencia inequívoca, un 6% de la secuencia es considerada como de resolución media y el resto 25 de la secuencia obtenida (27 de 33 bases, es decir, el 82%) es considerada como posibles indeterminaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la detección, diferenciación e identificación taxón-específica de eubacterias en una muestra biológica, mediante el análisis por técnicas de secuenciación, concretamente pirosecuenciación de tres regiones del gen 16S del RNA ribosomal bacteriano, **caracterizado** porque comprende los siguientes pasos:
 - 5 a. Estabilización de la mezcla de reacción por gelificación mediante adición al medio de una solución acuosa estabilizante y posterior secado hasta un grado de humedad entre un 10% y un 30%.
 - 10 b. Reacción de amplificación mediante PCR del ADN total extraído de la muestra utilizando los pares de cebadores especificados en la tabla 2 (SEQ. ID. No. 1 a 6).
 - 15 c. Secuenciación mediante síntesis, concretamente pirosecuenciación de los productos de PCR obtenidos en el paso a. usando los mismos cebadores no biotinilados indicados en la tabla 2 y utilizados para amplificación del ADN total extraído de la muestra (SEQ. ID. No. 2, 4 y 6).
2. Método de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** porque la reacción de amplificación se lleva a cabo mediante una reacción de amplificación de ácidos nucleicos (PCR) integrada por una desnaturación inicial a 95°C durante 5 minutos y 30 ciclos de desnaturación a 95°C durante 1 minuto, anillamiento a 54°C durante 20 1 minuto, extensión a 74°C durante 30 segundos, y una extensión final a 72°C durante 10 minutos.
- 25 3. Método de acuerdo con las reivindicaciones 1-2, **caracterizado** porque las secuencias obtenidas de la amplificación de la PCR se someten a pirosecuenciación y posteriormente se identifican mediante comparación con las secuencias depositadas y anotadas en bases de datos públicas o privadas.
4. Método de acuerdo con las reivindicaciones 1-3, **caracterizado** porque cada una de las secuencias obtenidas mediante la secuenciación de los fragmentos amplificados mediante la reacción de amplificación descrita en la reivindicación 3 aporta un nivel de información adicional, de modo que si la secuencia obtenida mediante la reacción que fue amplificada utilizando los cebadores de amplificación SEQ. ID. No. 5 y 6 no aportara un nivel de información suficiente para garantizar la identificación precisa de 30

- la Especie de eubacteria presente en la muestra, el solapamiento de esta secuencia con la secuencia obtenida mediante la reacción que fue amplificada utilizando los cebadores de amplificación SEQ. ID. No. 3 y 4 puede llegar a dar información precisa a nivel Especie y Género eubacteriano, y si aún así la secuencia solapada no 5 aportara un nivel de coincidencia suficiente para garantizar su identificación, su posterior solapamiento con la secuencia obtenida mediante la reacción que fue amplificada utilizando los cebadores de amplificación SEQ. ID. No. 1 y 2 da en todos los casos una secuencia que informa con precisión acerca de la Familia, Género y/o Especie de la eubacteria presente en la muestra.
- 10 5. Método de acuerdo con las reivindicaciones 1-4, **caracterizado** porque utilizando la mezcla de gelificación formada por trehalosa, melezitosa, glucógeno o rafinosa y lisina o betaína, en la reacción de pirosecuenciación se obtiene mejora de la resolución de la pirosecuenciación de entre un 75% y 90% y como consecuencia también se obtiene una secuenciación de fragmentos más largos.
- 15 6. Método de acuerdo con la reivindicación 5, **caracterizado** porque la mezcla de gelificación está compuesta por trehalosa, melezitosa, glucógeno y lisina.
7. Un kit integrado por tres tubos o recipientes de reacción, o series de tres tubos de reacción, conteniendo cada uno de estos tubos o recipientes todos los elementos necesarios para la realización de la reacción de PCR (ADN polimerasa ultrapura, 20 deoxinucleótidos dATP, dCTP, dGTP, dTTP, tampón de reacción y cebadores de reacción) descrita en la reivindicación 1, de modo que el primer tubo contiene los cebadores SEQ. ID. No. 1 y 2, el segundo tubo SEQ. ID. No. 3 y 4, y el tercer tubo los cebadores SEQ. ID. No. 5 y 6.
- 25 8. Kit de acuerdo con la reivindicación 7, **caracterizado** porque está integrado por tres tubos o recipientes conteniendo todos los reactivos necesarios para llevar a cabo la reacción de pirosecuenciación: ADN polimerasa ultrapura y de alta fidelidad, ATP-sulfurilasa, luciferasa, apirasa, cebador de secuenciación, luciferina, adenosin-5'-fosfatosulfato, deoxinucleótidos dATP, dCTP, dGTP, dTTP, tampón de reacción y cebador de pirosecuenciación, de modo que en el primer tubo se adiciona el cebador 30 de pirosecuenciación SEQ. ID. No. 2 con el fin de secuenciar el amplicón obtenido mediante la amplificación realizada con los cebadores de amplificación SEQ. ID. No. 1 y 2, en el segundo tubo se adiciona el cebador de pirosecuenciación SEQ. ID. No. 4 con el fin de secuenciar el amplicón obtenido mediante la amplificación realizada con

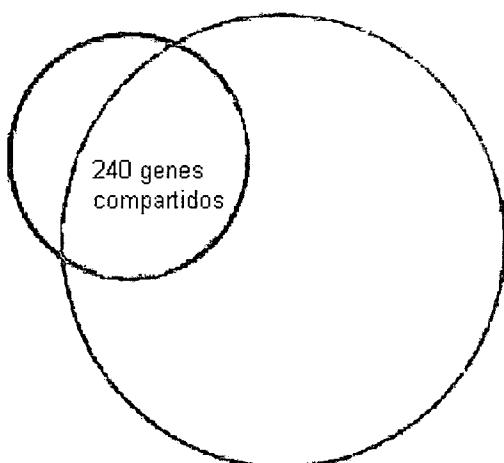
los cebadores de amplificación SEQ. ID. No. 3 y 4, y en el tercer tubo se adiciona el cebador de pirosecuenciación SEQ. ID. No. 6 con el fin de secuenciar el amplicón obtenido mediante la amplificación realizada con los cebadores de amplificación SEQ. ID. No. 5 y 6.

- 5 9. Kit de acuerdo con la reivindicación 8, **caracterizado** porque cada uno de los tubos indicados en la reivindicación anterior se encuentran estabilizados mediante la adición de una mezcla de estabilización conteniendo trehalosa, melezitosa, lisina y glucógeno, siendo posteriormente desecados mediante aplicación de vacío a una temperatura de 30°C.
- 10 10. Kit de acuerdo con las reivindicaciones 7-9, **caracterizado** porque contiene todos los tubos con los ingredientes necesarios para llevar a cabo el método de las reivindicaciones 1-6.

FIGURAS

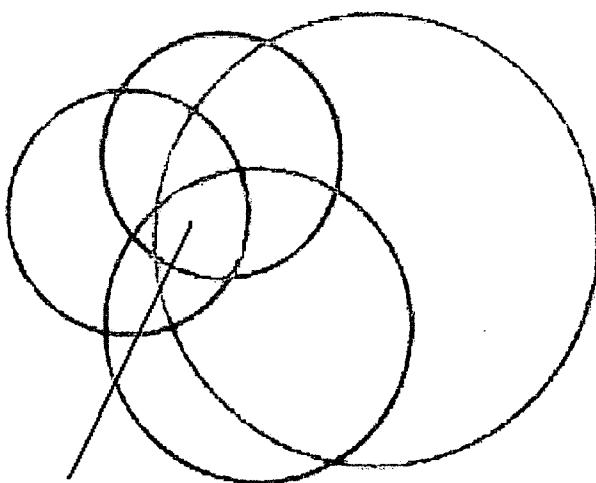
FIGURA 1

A **Mycoplasma genitalium**
468 genes



Haemophilus influenzae
1703 genes

B



C

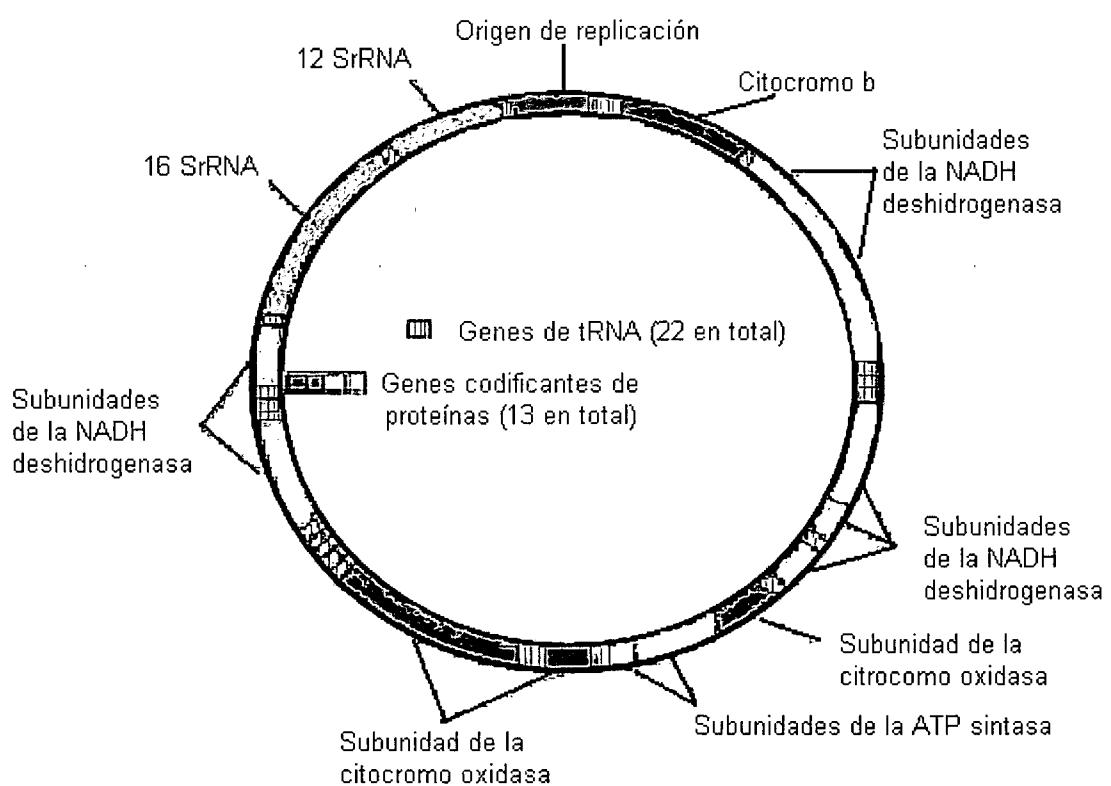


FIGURA 2

A

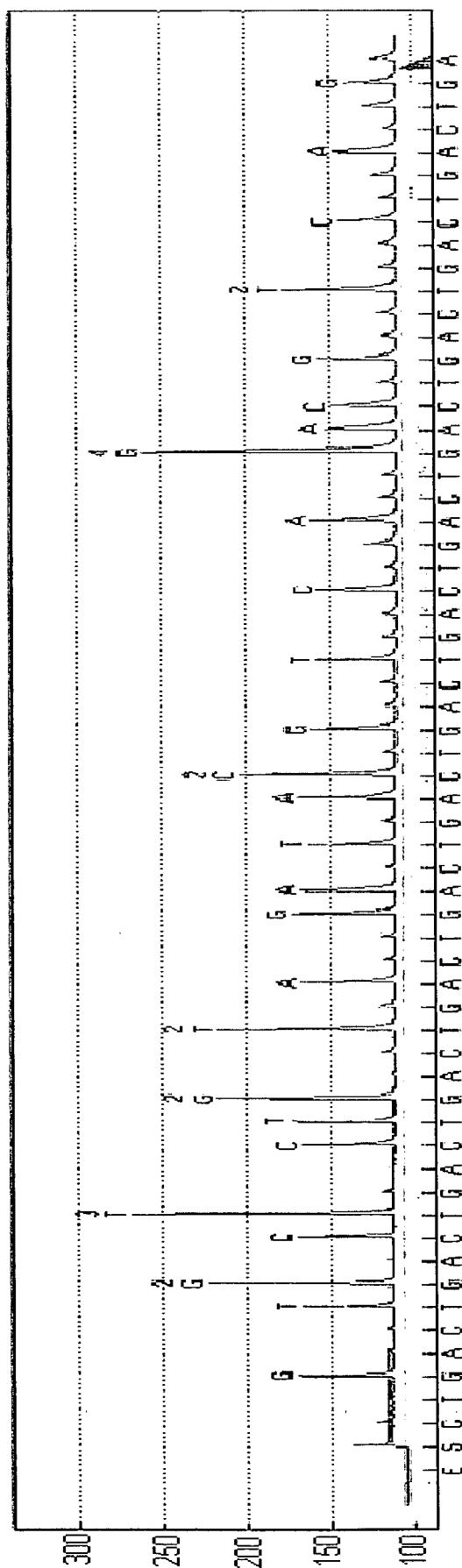
Sample ID: 1.as9

PSQ run: 090225_2 ENTITY ID: Cyclic_60_CTGA

Sequence library: LTP-S93 (2008-10-27, 4:01:44 PM)
Query sequence: GTGGCTTCTGGTTAGATACCGTCAGGGACGTTAG

Result: AB012212 1 1517 1517bp rna **Enterococcus faecalis**
Quality: Good

Score: 100



B

Hit 1: AB012212 1 1517 1517 bp rna Enterococcus faecalis

Score:	100	Query	1	CTGGCTTTCTGGTTGATGACGGTACGGTTCAG 37 SEQ. ID. No. 7
Identities:	37/37 (100%)			
Gaps:	0/37 (0%)	Library	1004	CTGGCTTTCTGGTTGATGACGGTACGGTTCAG 1047
E-value:	5.47e-029			

Hit 2: Z73313 1 1524 1524 bp rna Carnobacterium inhibens

Score:	86	Query	1	CTGGCTTTCTGGTTGATGACGGTACGGTTCAG 37 SEQ. ID. No. 7
Identities:	34/37 (92%)			
Gaps:	0/37 (0%)	Library	1011	CTGGCTTTCTGGTTGATGACGGTACGGTTCAG 1047
E-value:	6.89e-021			

C

Hit 3: AEF425608 1 1465 1465bp rna *Carnobacterium viridans*

Score:	86	Query	1	GTGGCTTTCGGTTCGGTACCGCTGAGGACGTCAG	37	SEQ. ID. No. 7
Identities:	34/37 (92%)					
Gaps:	0/37 (0%)	Library	994	GTGGCTTTCGGTTCGGTACCGCTGAGGACGAG	1013	
E-value:	6.89e-021					

Hit 4: AF450136.1 1486 bp rna Carnobacterium pleistocenium

Hit 5: M58816 1 1503 1503b0 rna *Carnobacterium divergens*

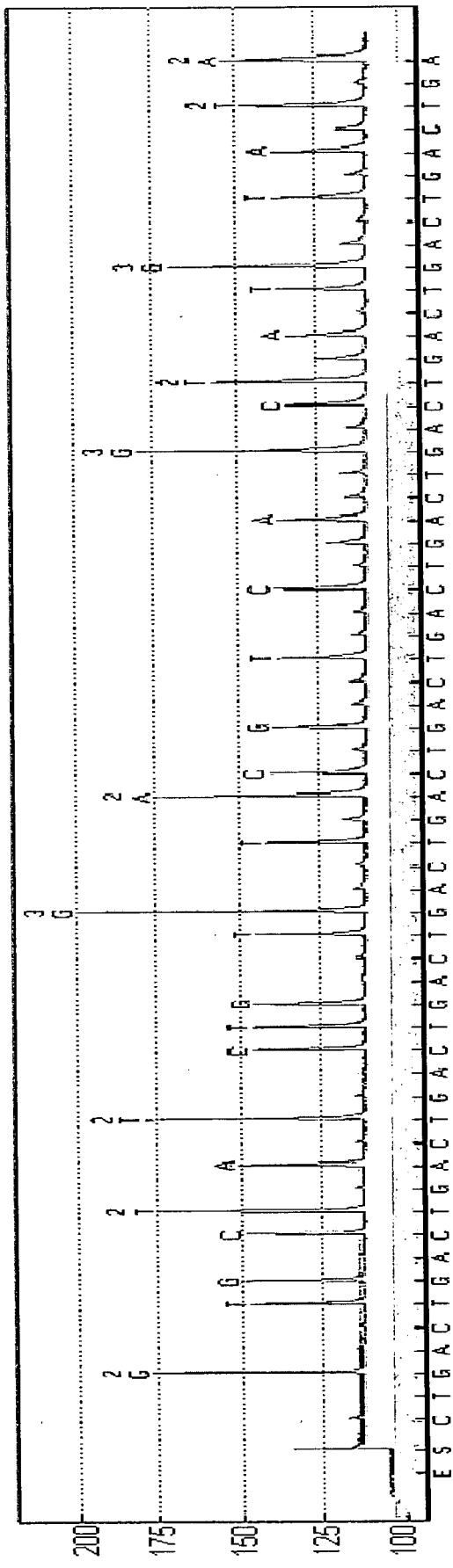
FIGURA 3

A

Sample ID: 3.ass9

Well:	C6
PSQ run:	090225.2
Entry ID:	Cyclic_60_CTGA
Sequence library:	LTP-s93 (2008-10-27, 4:01:44 PM)
Query sequence:	GGTGCTTATTCTGGGTAACGTAGGGCTATGGGTATCAA

Result: AF005185 1 1446 1446bp rna Moraxella (subgen. Branhamella Catlin 1970) catarhali



B

Hit 4: AF005184 1 1445 1445bp rna Moraxella equi

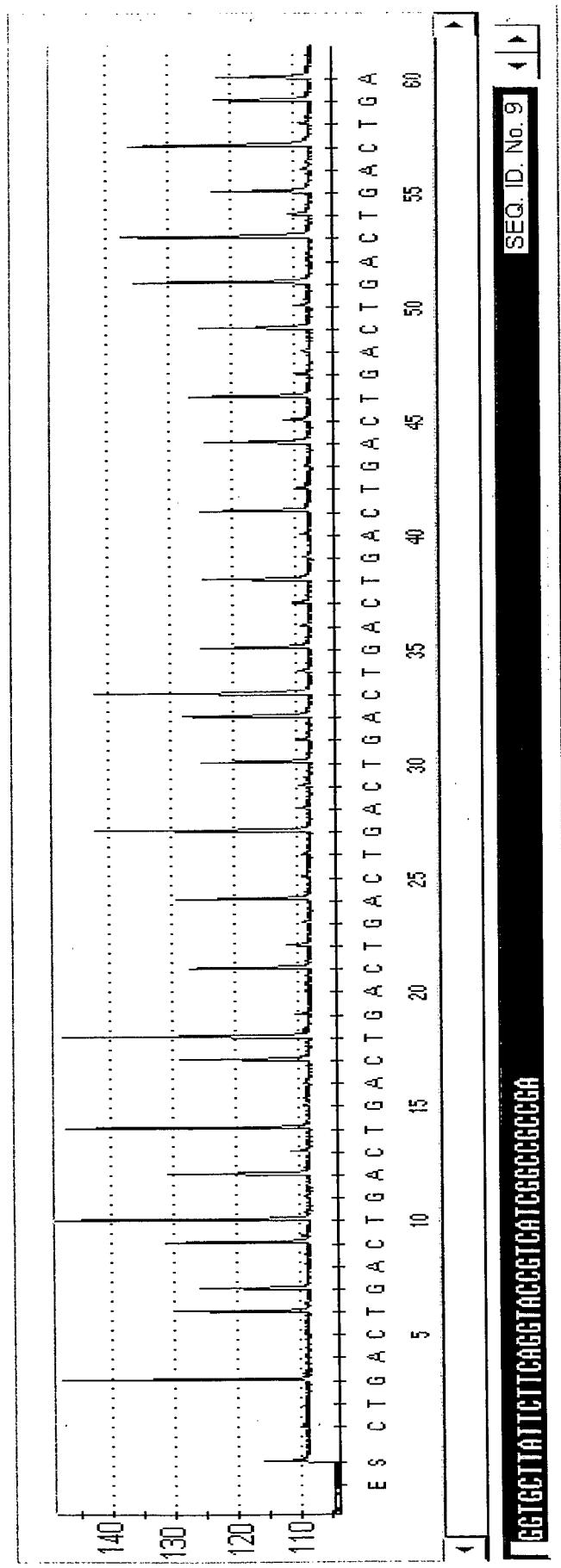
Score:	95.9	Query	1	GGTGGTATTTCTGGGTAAACGTCAGGGCTTATGGGTATTA	42 SEQ. ID. No. 8
Identities:	41/42 (98%)				
Gaps:	0/42 (0%)	Library	988	GGTGGTATTTCTGGGTAAACGTCAGGGCTTATGGGTATTA	1029
E-value:	2.32e-034				

Hit 5: DQ156148 1 1489 1489bp rna Moraxella caprae

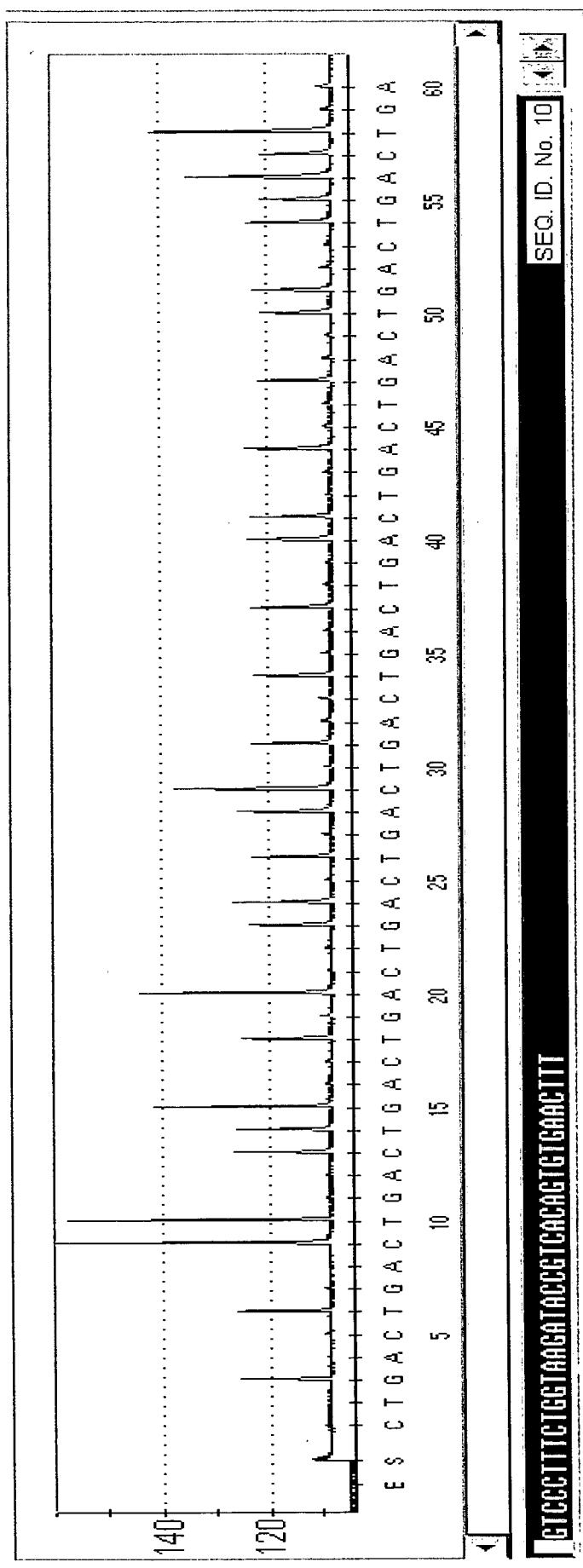
Score:	95.9	Query	1	GGTGGTATTTCTGGGTAAACGTCAGGGCTTATGGGTATTA	42 SEQ. ID. No. 8
Identities:	41/42 (98%)				
Gaps:	0/42 (0%)	Library	965	GGTGGTATTTCTGGGTAAACGTCAGGGCTTATGGGTATTA	1056
E-value:	2.32e-034				

FIGURA 4

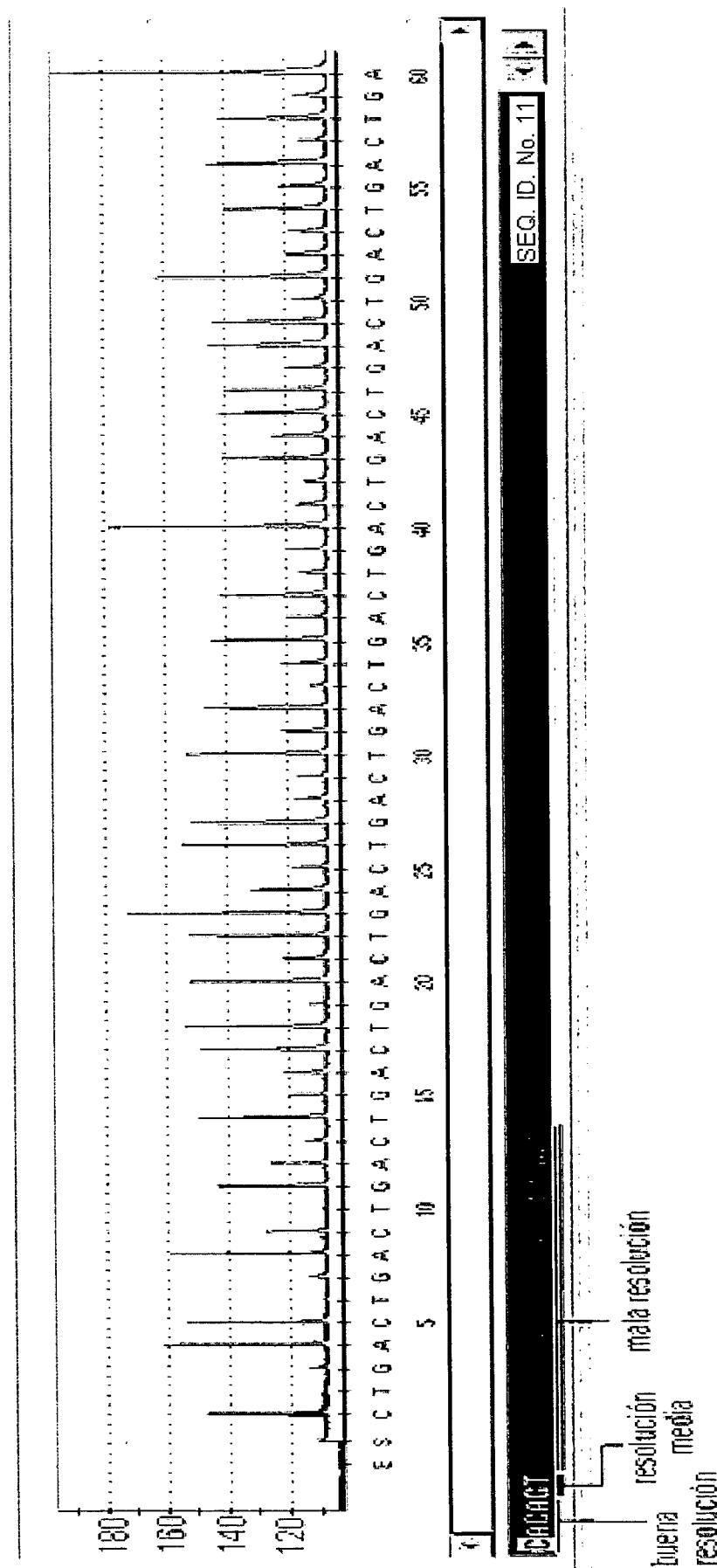
A



B



C



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 2009/000507

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

see extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC,WPI,REGISTRY,HCAPLUS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2004023209 A1 (PYROSEQUENCING AB) 05.02.2004, the whole document. Citado in the application	1-10
A	WO 02072002 A1 (BIOTOOLS BIOTECHNOLOGICAL & MEDICAL LABORATORIES S.A.) 26.06.2003, the whole document. Citado in the application	1-10
A	WO 9503401 A1 (HYSEQ INC) 02.02.1995, the whole document	1-10
A	WO 0204122 A2 (DIAGNOSTICS REAL WORLD LTD) 17.01.2002, the whole document	1-10
A	WO 0034444 A2 (GENSEQ INC.) 15.06.2000, the whole document	1-10
A	EP 0726310 A2 (GEN-PROBE INC.) 14.08.1996, the whole document	1-10

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier document but published on or after the international filing date		
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&"	document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 April 2010 (20.04.2010)

Date of mailing of the international search report

(04/05/2010)

Name and mailing address of the ISA/
O.E.P.M.

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.
Facsimile No. +34 91 3495304

Authorized officer

M. Hernández Cuéllar

Telephone No. +34 91 349 84 09

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 2009/000507

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 9513396 A2 (U GENE RES BV) 18.05.1995, the whole document	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/ES 2009/000507

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2004023209 A	05.02.2004	CA 2363938 A	28.05.2003
EP 0726310 AB	14.08.1996	EP 19960101903 WO 9624664 A CA 2210584 A AU 4916796 A US 5556771 A US 5614387 A JP 10503383 T JP 3282819 B US 5834254 A AU 699590 B AT 244759 T ES 2202387 T DE 69628959 T	09.02.1996 15.08.1996 15.08.1996 27.08.1996 17.09.1996 25.03.1997 31.03.1998 20.05.2002 10.11.1998 10.12.1998 15.07.2003 01.04.2004 13.05.2004
WO 02072002 A	19.09.2002	CA 2408857 A ES 2180416 AB US 2003119042 A EP 1374827 A EP 20020714205 BR 0204479 A JP 2004519242 T AU 2002246125 B IL 152757 A	19.09.2002 01.02.2003 26.06.2003 02.01.2004 11.03.2002 17.02.2004 02.07.2004 07.02.2008 11.02.2009
WO 9513396 A	18.05.1995	NL 9301957 A	01.06.1995 01.06.1995 01.06.1995
WO 9503401 A	02.02.1995	AU 7551094 A CN 1143977 A EP 0787183 A EP 19940925689 JP 9508003 T US 6107031 A US 6291186 B	20.02.1995 26.02.1997 06.08.1997 25.07.1994 19.08.1997 22.08.2000 18.09.2001
WO 0204122 AB	17.01.2002	WO 0204671 A AU 6929201 A AU 6928501 A EP 1325151 A EP 20010947639 CN 1452664 A CN 100355905 C US 2004072176 A JP 2004512499 T AU 2001269285 B TW 286159 B CN 101230393 A	17.01.2002 21.01.2002 21.01.2002 09.07.2003 06.07.2001 29.10.2003 19.12.2007 15.04.2004 22.04.2004 16.08.2007 01.09.2007 30.07.2008

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/ ES 2009/000507

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0034444 A	15.06.2000	CA 2351890 A AU 2172400 A US 6225289 B EP 1137758 AB EP 19990966096 US 2002019041 A US 6514943 B JP 2002531119 T AU 771112 B AU 771112 C AT 387492 T ES 2299275 T DK 1137758 T DE 69938255 T	15.06.2000 26.06.2000 01.05.2001 04.10.2001 10.12.1999 14.02.2002 04.02.2003 24.09.2002 11.03.2004 11.11.2004 15.03.2008 16.05.2008 09.06.2008 12.02.2009

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 2009/000507

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

CI2Q 1/68 (2006.01)

CI2N 9/96 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ ES 2009/000507

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver hoja adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

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

C12Q

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

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

EPODOC,WPI,REGISTRY,HCAPLUS

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
A	US 2004023209 A1 (PYROSEQUENCING AB) 05.02.2004, todo el documento. Citado en la solicitud	1-10
A	WO 02072002 A2 (BIOTOOLS BIOTECHNOLOGICAL & MEDICAL LABORATORIES S.A.) 19.09.02, todo el documento. Citado en la solicitud	1-10
A	WO 9503401 A1 (HYSEQ INC) 02.02.1995, todo el documento	1-10
A	WO 0204122 A2 (DIAGNOSTICS REAL WORLD LTD) 17.01.2002, todo el documento	1-10
A	WO 0034444 A2 (GENSEQ INC.) 15.06.2000, todo el documento	1-10
A	EP 0726310 A2 (GEN-PROBE INC.) 14.08.1996, todo el documento	1-10

En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos

Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T"	documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.		
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.		
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"X"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	"Y"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	"&"	documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.

20 Abril 2010 (20.04.2010)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

04-MAYO-2010 (04/05/2010)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional

O.E.P.M.

Funcionario autorizado

M. Hernández Cuéllar

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.

Nº de fax 34 91 3495304

Nº de teléfono +34 91 349 84 09

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ES 2009/000507

C (continuación).		DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
A	WO 9513396 A2 (U GENE RES BV) 18.05.1995, todo el documento	1-10

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional N°

PCT/ES 2009/000507

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
US 2004023209 A	05.02.2004	CA 2363938 A	28.05.2003
EP 0726310 AB	14.08.1996	EP 19960101903 WO 9624664 A CA 2210584 A AU 4916796 A US 5556771 A US 5614387 A JP 10503383 T JP 3282819 B US 5834254 A AU 699590 B AT 244759 T ES 2202387 T DE 69628959 T	09.02.1996 15.08.1996 15.08.1996 27.08.1996 17.09.1996 25.03.1997 31.03.1998 20.05.2002 10.11.1998 10.12.1998 15.07.2003 01.04.2004 13.05.2004
WO 02072002 A	19.09.2002	CA 2408857 A ES 2180416 AB US 2003119042 A EP 1374827 A EP 20020714205 BR 0204479 A JP 2004519242 T AU 2002246125 B IL 152757 A	19.09.2002 01.02.2003 26.06.2003 02.01.2004 11.03.2002 17.02.2004 02.07.2004 07.02.2008 11.02.2009
WO 9513396 A	18.05.1995	NL 9301957 A	01.06.1995 01.06.1995 01.06.1995
WO 9503401 A	02.02.1995	AU 7551094 A CN 1143977 A EP 0787183 A EP 19940925689 JP 9508003 T US 6107031 A US 6291186 B	20.02.1995 26.02.1997 06.08.1997 25.07.1994 19.08.1997 22.08.2000 18.09.2001
WO 0204122 AB	17.01.2002	WO 0204671 A AU 6929201 A AU 6928501 A EP 1325151 A EP 20010947639 CN 1452664 A CN 100355905 C US 2004072176 A JP 2004512499 T AU 2001269285 B TW 286159 B CN 101230393 A	17.01.2002 21.01.2002 21.01.2002 09.07.2003 06.07.2001 29.10.2003 19.12.2007 15.04.2004 22.04.2004 16.08.2007 01.09.2007 30.07.2008

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional N°

PCT/ES 2009/000507

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
WO 0034444 A	15.06.2000	CA 2351890 A AU 2172400 A US 6225289 B EP 1137758 AB EP 19990966096 US 2002019041 A US 6514943 B JP 2002531119 T AU 771112 B AU 771112 C AT 387492 T ES 2299275 T DK 1137758 T DE 69938255 T	15.06.2000 26.06.2000 01.05.2001 04.10.2001 10.12.1999 14.02.2002 04.02.2003 24.09.2002 11.03.2004 11.11.2004 15.03.2008 16.05.2008 09.06.2008 12.02.2009

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ ES 2009/000507

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

CI2Q 1/68 (2006.01)

CI2N 9/96 (2006.01)