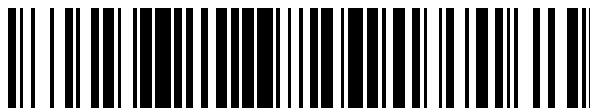


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 386 131**

21 Número de solicitud: 201101135

51 Int. Cl.:

C12Q 1/70

(2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

08.09.2010

43 Fecha de publicación de la solicitud:

09.08.2012

Fecha de la concesión:

24.04.2013

45 Fecha de publicación de la concesión:

08.05.2013

62 Número y fecha presentación solicitud principal:

P 201001157 08.09.2010

73 Titular/es:

**INSTITUTO VALENCIANO DE INVESTIGACIONES
AGRARIAS (IVIA) (100.0%)
CRTA. MONCADA-NAQUERA, KM. 4,500
46113 MONCADA (Valencia) ES y
FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA
(FUNDECITRUS)**

72 Inventor/es:

**BERTOLINI , Edson;
CAMBRA ALVAREZ, Mariano;
SERRA ALFONSO, Pedro;
LOPEZ GONZALEZ, Maria Milagros;
LOPES , Silvio;
DURAN-VILA, Nuria;
AYRES , Juliano y
BOVÉ , Joseph**

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PALMERO, Fe

54 Título: **PROCEDIMIENTO DIRECTO DE DETECCION ESPECIFICA DEL VIROIDE PEACH LATENT MOSAIC VIROID MEDIANTE DIANAS INMOVILIZADAS Y RT-PCR A TIEMPO REAL Y KIT PARA SU DETECCION.**

57 Resumen:

Se detalla un procedimiento de preparación, conservación y análisis de muestras de material vegetal para diagnóstico y detección mediante amplificación molecular basada en RT-PCR a tiempo real. El procedimiento se ha aplicado a detección de Peach latent mosaic viroid. Las muestras son inmovilizadas en soportes de papel o nylon, mediante impresión de tejidos o de sus secciones o absorbidas en papel o nylon cuando se trata de muestras líquidas. Las muestras inmovilizadas, pueden ser conservadas a temperatura ambiente. El protocolo de análisis comienza por la extracción de dianas del soporte con agua destilada, octoxinol o tampón glicina y posterior análisis por RT-PCR a tiempo real. Se detallan las secuencias de nucleótidos de iniciadores de amplificación molecular y sonda TaqMan, en que se basa el kit de detección.

ES 2 386 131 B1

PROCEDIMIENTO DIRECTO DE DETECCIÓN ESPECÍFICA DEL VIROIDE
***Peach latent mosaic viroid* MEDIANTE DIANAS INMOVILIZADAS Y RT-PCR A**
TIEMPO REAL Y KIT PARA SU DETECCIÓN

5

DESCRIPCIÓN

CAMPO DE LA INVENCION

10

La invención se relaciona en general con la detección de material genético (secuencias de ácidos nucleicos) mediante el empleo de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real, y en particular con la preparación previa de las muestras y su conservación, antes de realizar RT-PCR cuantitativa a tiempo real. El procedimiento

15 comprende la inmovilización directa, conservación y extracción de las dianas de interés para su amplificación molecular por RT-PCR a tiempo real. La invención, por tanto, se relaciona con: 1) un procedimiento de preparación directa de muestras mediante inmovilización en membranas de papel o nylon por impresión o escachado de material vegetal, 2) un procedimiento para analizar extractos brutos de muestras de material vegetal

20 o RNA purificado, inmovilizado en soportes sólidos, 3) un método de conservación de las membranas conteniendo muestras de cualquier tipo, 4) un sistema de extracción de dianas sin purificación de ácidos nucleicos y 5) unas secuencias de nucleótidos de iniciadores y sondas TaqMan específicas, para el diagnóstico y detección universal de *Peach latent mosaic viroid* (PLMVd), de cualquier origen o huésped, mediante un kit basado en todo lo

25 anterior.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La patente ES 2 110 916 de 25 de mayo de 1996, de la cual fue solicitante el

30 Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) e inventores Mariano Cambra

Álvarez, Antonio Olmos Castelló y Miguel Ángel Dasi Rodríguez, describe un procedimiento de preparación de dianas para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional. Esta patente ha sido mantenida por IVIA hasta la fecha. En la actualidad, se han realizado nuevas aplicaciones y modificado el procedimiento inicialmente descrito en la patente y posteriormente por Olmos *et al.*, 1996 (Nucleic Acids Res. 24, 2192-2193), para simplificarlo y poderlo aplicar a agentes patógenos no ensayados todavía y muy problemáticos en su detección, como bacterias Gram negativas no cultivables *in vitro* (limitadas al floema o al xilema de plantas y a artrópodos) y a viroides (agentes patógenos o replicones infecciosos carentes de proteína de cubierta).

El procedimiento de inmovilización de dianas en soportes sólidos (membranas), su extracción y análisis mediante PCR o RT-PCR a tiempo real, sólo se ha aplicado a la detección de virus en material vegetal y en artrópodos (Olmos *et al.*, 2005. J. Virol. Methods 128, 151-155; Cambra *et al.*, 2006. *In: Virus Diseases and Crop Biosecurity*, Ed. NATO-Security through Science. Series C. Springer. 81-88pp.; Osman y Rowhani, 2006. J. Virol. Methods 133, 130-136; Olmos *et al.*, 2007. *In: Biotechnology and plant diseases management*. CABI Press, British Columbia. 227-249pp.; Bertolini *et al.*, 2008. Eur. J. Plant Pathol. 120, 177-188; López *et al.*, 2009. Curr. Issues Mol. Biol. 11, 13-46; Capote *et al.* 2009. Int. Microbiol. 12, 1-6; Bertolini *et al.*, 2010. Eur. J. Plant Pathol. 128, 283-287. El procedimiento no ha sido descrito a viroides, ya que estos organismos fitopatógenos presentan concentraciones estacionales mínimas en la planta y distribución o repartición irregular en los tejidos del hospedador. La detección fiable de estos organismos, muchos de ellos clasificados como de cuarentena, hace necesario el desarrollo de técnicas y protocolos extremadamente sensibles y específicos para su detección y diagnóstico y que puedan ser empleados en gran escala de una forma sencilla. Además, la invención permite la conservación y el uso de controles inmovilizados sin riesgos de escapes.

Los viroides son moléculas de RNA monocatenario, covalentemente cerradas, sin capacidad codificante, pero capaces de replicarse de forma autónoma utilizando la maquinaria transcripcional de las células a las que parasitan. Estos constituyen la forma más extrema de parasitismo en el mundo vegetal. Los viroides son los entes biológicos más simples descritos hasta el momento (Flores y Duran, 1996. *In: Patología vegetal*. Tomo I. SEF-Phytoma España. 149-183). Poseen propiedades estructurales, funcionales y

evolutivas propias. El tamaño de los viroides oscila entre 246 y 399 nucleótidos, correspondientes respectivamente al viroide del “Cadang-cadang” (*Coconut cadang-cadang viroid*, CCCVd) del cocotero y al viroide del moteado clorótico del crisantemo (*Chrysanthemum chlorotic mottle viroid*, CChMVd) (Flores *et al.*, 2003. In: Viroids. CSIRO Publishing, Collingwood. 224-227).

PLMVd pertenece al género *Pelamoviroid* dentro de la familia *Avsunviroidae* (Flores *et al.*, 2000. Viroids. In: Virus Taxonomy, 7th report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press. San Diego, CA). Produce enfermedades económicamente importantes ya que afecta la calidad de fruto provocando decoloraciones y malformaciones en frutos de melocotonero. El viroide está presente en la mayoría de países productores de frutales de hueso. Una detallada descripción de sus síntomas y características moleculares ha sido publicada por Flores *et al.*, 1990. (Research in Virology 141, 109-118) y Cambra *et al.*, 20008. (Viruses and Viroids of Peach Trees. In: The Peach, Botany, Productions and uses. CAB International, London).

Los métodos de detección de viroides se basan principalmente en técnicas biológicas, bioquímicas, moleculares o en combinación de las mismas. Los viroides no poseen envoltorio proteico, haciendo imposible el uso de métodos inmunológicos utilizados normalmente para la detección de virus. Las pruebas biológicas son únicamente utilizadas para detección de CEVd y otros viroides de los cítricos. Los métodos bioquímicos se basan en la realización de electroforesis secuencial en geles de poliacrilamida (sPAGE) (Semancik y Harper. 1984. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 4429-4433) que permite distinguir los viroides presentes en un aislado por su movilidad electroforética. Para la detección molecular es importante considerar que el material genético de los viroides es RNA de cadena sencilla, circular y fuertemente estructurado. Entre los métodos moleculares de detección de viroides figura la hibridación molecular con sondas radiactivas o marcadas con digoxigenina (Flores. 1988. Proc. 10th Conf. Int. Org. Citrus Virol., IOCV, 192-196; Podleckis *et al.*, 1993. J. Virol. Methods 43, 147-158). Una interesante versión de la hibridación molecular combinada con la realización de impresiones de material vegetal fue descrita por Palacio-Bielsa *et al.* (1999). Eur. J. Plant Pathol. 105, 897-903. En este método se combinan técnicas biológicas de amplificación de la población de viroides en huéspedes apropiados previa a la realización de impresiones de secciones de tejido vegetal en membranas y su posterior hibridación con sondas específicas. También se ha descrito un

sistema de hibridación “northern” con sondas marcadas con digoxigenina que permite detectar viroides en extractos de muestras de campo (Murcia *et al.*, 2009. Mol. Cell Probes 23, 95-102). No obstante, todos estos métodos moleculares o híbridos poseen escasa sensibilidad y frecuentemente son muy laboriosos limitando el número de muestras que pueden ser procesadas por operario y día. La puesta a punto de la RT-PCR y su aplicación a la detección de viroides ha permitido incrementar la sensibilidad, aunque la detección rutinaria mediante esta técnica no se ha popularizado por problemas de inhibiciones que inducen falsos negativos y amplificaciones inespecíficas (Garnsey *et al.*, 2002. Proc. 15th Conf. Int. Org. Citrus Virol., IOCV, 219-229). Además, la RT-PCR convencional posee altos riesgos de contaminación (falsos positivos) (Olmos *et al.*, 2007. In: Molecular diagnostic methods for plant viruses. CABI Press, London. 227-249; López *et al.*, 2009). La aplicación de RT-PCR a tiempo real a la detección de viroides está en su etapa inicial, de hecho únicamente se han publicado tres trabajos, del mismo grupo de investigación, aplicados a PSTVd (Boonham *et al.*, 2004. J. Virol. Methods 116, 139-146; OEPP/EPPO, 2004, y Monger *et al.*, 2010. J. Virol. Methods doi: 10.1016/j.jviromet.2010.07.002). Para el método propuesto se utiliza RNA purificado que complica y encarece el coste de la detección y limita el número de muestras procesables diariamente por un operario.

La presente invención proporciona un procedimiento de preparación de muestras de frutales de hueso para su uso directo, mediante un kit basado en RT-PCR a tiempo real, su conservación por largos periodos antes del análisis o como controles y su análisis directo tras una sencilla extracción de las dianas del viroide PLMVd directamente inmovilizadas en soportes sólidos.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

25

Así pues, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento de preparación de dianas para RT-PCR a tiempo real, su conservación y su extracción para análisis mediante RT-PCR a tiempo real utilizando los iniciadores identificados como PLMVdf, PLMVdr y PLMVdp para detección de PLMVd.

30

El término “diana para RT-PCR” en el sentido utilizado en esta descripción, se refiere a fragmentos de ácidos nucleicos (ARN) desnudos o situados dentro de células de

vegetales.

El procedimiento comprende las siguientes etapas:

- i) Inmovilización de las dianas para RT-PCR a tiempo real de secciones impresas o de escachados de muestras de tejidos de vegetales que las contienen (Figura 1) o de sus extractos brutos;
- ii) Conservación de las dianas inmovilizadas en soportes sólidos conteniendo muestras de cualquier tipo;
- iii) Extracción de las dianas para posterior análisis por RT-PCR a tiempo real;
- iv) Análisis de las muestras mediante RT-PCR utilizando los iniciadores y las sondas específicas identificadas y descritas en esta invención.

Para efectuar la inmovilización o fijación de las dianas para RT-PCR a tiempo real a partir de muestras vegetales o artrópodos que las contienen: secciones o la zona de escisión tras arrancado manual de órganos de vegetales (hojas enteras enrolladas, pedicelo de hojas, pedúnculo de frutos, frutos, partes de flores, brotes, tallos, corteza de raíces) se ponen en contacto con un soporte apropiado, bajo condiciones adecuadas y durante un período de tiempo suficiente como para que la diana para RT-PCR a tiempo real quede retenida sobre dicho soporte. El soporte adecuado para llevar a cabo esta etapa puede ser una membrana de nylon o de cualquier tipo de papel convencional, preferentemente Whatman 3MM por su alta capacidad de absorción de líquidos y su bajo coste. En este caso concreto, se ha utilizado membranas de nylon para la detección de PLMVd aunque se puede utilizar cualquier otro papel convencional o membranas de nitrocelulosa o de éster de nitrocelulosa. Las muestras pueden ser sólidas, por ejemplo, secciones frescas de tejidos de vegetales o tejidos de vegetales directamente escachados, o muestras líquidas, como por ejemplo, extractos de vegetales o ácidos nucleicos previamente purificados. Cuando la muestra es sólida, por ejemplo, una sección fresca de tejido de vegetal, su inmovilización en el soporte se realiza por impresión o escachado, es decir, presionando la muestra firmemente sobre el soporte durante un corto período de tiempo (unos segundos). En el caso de muestras líquidas, unos 5 microlitros del extracto bruto o de la solución purificada de ácidos nucleicos, se depositan directamente en el soporte quedando así retenidas por absorción. La operación de fijación de muestras se puede realizar directamente en membranas en condiciones de campo o laboratorio o en secciones de unos 5 mm² previamente introducidas en tubos tipo Eppendorf o en pocillos de microplacas de 96

pocillos tipo ELISA. Esta última modalidad es la más apropiada para extractos y muestras líquidas por facilitar su depósito directamente en el contenedor en el que se realizará la extracción de las dianas.

Las dianas retenidas en el soporte sólido, impresionadas, escachadas o absorbidas (membrana o trozos de la misma contenidos en tubos Eppendorf o placas ELISA) pueden ser procesadas directamente o bien pueden ser conservadas en condiciones de poca humedad y preferentemente en la oscuridad durante un período de tiempo de al menos dos años, sin que se produzca una pérdida de sensibilidad en la detección por RT-PCR a tiempo real. Para ello, las membranas conteniendo las dianas se introducen en un sobre de papel para garantizar la obscuridad, se conservan a temperatura ambiente o a 4°C en un contenedor hermético con desecante tipo silicagel o cloruro de calcio. Otra modalidad consiste en introducir el sobre conteniendo las membranas con las muestras inmovilizadas en una bolsa de plástico apta para realizar vacío y efectuarlo mediante un simple aparato de vacío alimentario.

La conservación de tubos Eppendorf o placas ELISA con secciones de membranas impresas o absorbidas con líquidos se realiza cerrando los tubos y/o sellando las placas y manteniendo las muestras inmovilizadas en obscuridad y a temperatura ambiente en un lugar de ambiente seco.

Para la extracción de las dianas previamente fijadas en el soporte, para análisis por RT-PCR a tiempo real, se introducen secciones recortadas del soporte conteniendo las dianas en contenedores adecuados, tubos Eppendorf por ejemplo. En este caso y en el caso de haber dispensado líquido en secciones de membranas ya introducidas en tubos o microplacas ELISA, se realizará el siguiente tratamiento: 1) Dispensar 100 microlitros de agua destilada o tampón glicina 0.1 M o bien del detergente no iónico octoxinol (Tritón X-100 Merck) para cubrir la sección de soporte contenida en el tubo o pocillo de microplaca, 2) Calentar a 100° C durante 10 minutos en un termobloque o al baño María. Esta operación se puede obviar en análisis de rutina, 3) Realizar agitación durante 5 segundos para asegurar el contacto del agente extractor de las dianas caliente, y 4) Realizar un pulso de centrifugación (unas 6.000 rpm en unos 5 segundos).

A continuación, con las dianas solubilizadas se procede a realizar la amplificación por RT-PCR a tiempo real de la manera que se detalla para cada uno de los

agentes fitopatógenos descritos en los ejemplos.

Mediante el procedimiento desarrollado en esta invención se evita, en primer lugar, la necesidad de preparar extractos de material vegetal y purificar ácidos nucleicos, y en segundo lugar, con este procedimiento se logra una inmovilización eficiente y duradera de las dianas para su posterior análisis por RT-PCR a tiempo real. Además, el protocolo diseñado permite la realización sencilla y rutinaria de numerosos análisis de forma rápida y con la alta precisión de la técnica molecular utilizada.

DESCRIPCIÓN DEL DIBUJO

10

Para complementar la descripción que se está realizando y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características del invento, se acompaña como parte integrante de dicha descripción, un dibujo en donde con carácter ilustrativo y no limitativo, se ha representado lo siguiente:

15

La figura 1.- Muestra impresiones de secciones de brotes de material vegetal ligeramente superpuestos (de 1 a 5 en la parte superior y de 6 a 10 en la parte inferior) en membrana de papel Whatman 3MM.

REIVINDICACIONES

1^a.- Procedimiento directo de detección específica de *Peach latent mosaic viroid* mediante dianas inmovilizadas y RT-PCR a tiempo real, caracterizado porque comprende las etapas de: i) Inmovilización de las dianas para RT-PCR a tiempo real de muestras vegetales, en un soporte sólido, y ii) Extracción de las dianas para RT-PCR a tiempo real con agua destilada o un agente capaz de solubilizar dichas dianas.

2^a.- Procedimiento directo de detección específica de *Peach latent mosaic viroid* mediante dianas inmovilizadas y RT-PCR a tiempo real, según reivindicación 1^a, caracterizado porque en la conservación de las dianas inmovilizadas permite largos periodos de almacenamiento y su envío por correo para posterior análisis por RT-PCR a tiempo real.

3^a.- Procedimiento directo de detección específica de *Peach latent mosaic viroid* mediante dianas inmovilizadas y RT-PCR a tiempo real, según reivindicación 1^a, caracterizado porque se emplea para analizar sistemáticamente por RT-PCR a tiempo real, dianas inmovilizadas y conservadas en tubos Eppendorf o en pocillos de placas ELISA.

4^a.- Procedimiento directo de detección específica de *Peach latent mosaic viroid* mediante dianas inmovilizadas y RT-PCR a tiempo real, según reivindicación 1^a, caracterizado porque utiliza como iniciador directo para la amplificación por RT-PCR a tiempo real del viroide PLMVd la secuencia (SEQ ID N° 1) de 22 nucleótidos (posición 141-163) de la secuencia de *Peach latent mosaic viroid* (GenBank n° GI291165198), denominada PLMVdf.

5^a.- Procedimiento directo de detección específica de *Peach latent mosaic viroid* mediante dianas inmovilizadas y RT-PCR a tiempo real, según reivindicación 1^a, caracterizado porque utiliza como iniciador reverso para la amplificación por RT-PCR a tiempo real del viroide PLMVd la secuencia (SEQ ID N° 2) de 18 nucleótidos (complementaria a la posición 199- 216) de la secuencia de *Peach latent mosaic viroid* (GenBank n° GI291165198), denominada PLMVdr.

6^a.- Procedimiento directo de detección específica de *Peach latent mosaic viroid* mediante dianas inmovilizadas y RT-PCR a tiempo real, según reivindicación 1^a, caracterizado porque utiliza como sonda en la amplificación por RT-PCR a tiempo real del viroide PLMVd la secuencia (SEQ ID N° 3) de 20 nucleótidos (posición 173-192) de la secuencia de *Peach Latent mosaic viroid* (GenBank n° GI291165198), denominada PLMVdp.

7^a.- Procedimiento directo de detección específica de *Peach latent mosaic viroid* mediante dianas inmovilizadas y RT-PCR a tiempo real, según reivindicaciones anteriores, caracterizado por el uso de dichas secuencias para la fabricación de un kit completo de diagnóstico, detección, identificación o caracterización de PLMVd u otros del género *Avsunviroidae*.

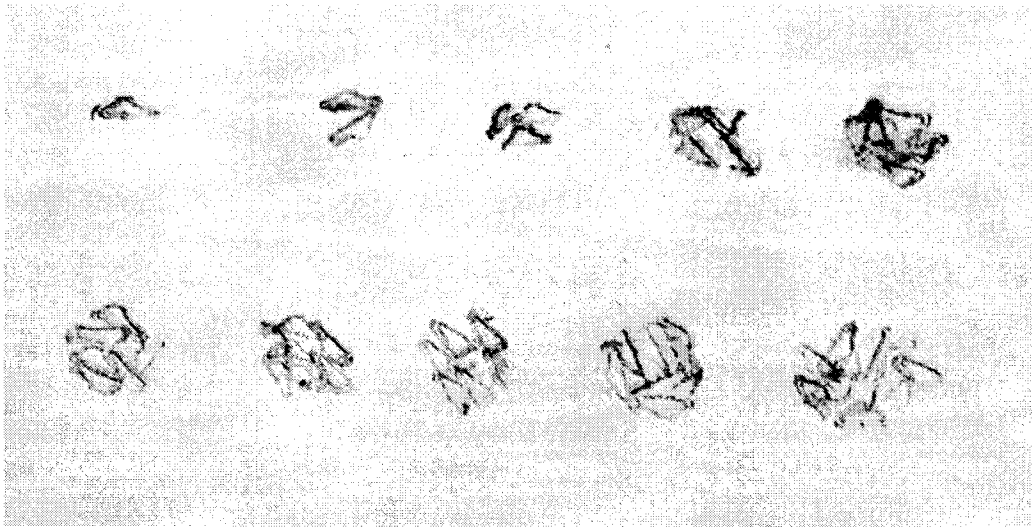


Figura 1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias

<120> Procedimiento directo de detección específica del viroide Peach latent mosaic viroid mediante dianas inmovilizadas y RT-PCR a tiempo real y kit para su detección

<160> 3

<170> BiSSAP 1.0

<210> 1

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<222> 1..22

<223> /mol_type="DNA"
/note="Forward Primer PLMVdf"
/organism="Artificial Sequence"

<400> 1

tgaggtagg tgggactttt cc

22

<210> 2

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<222> 1..18

<223> /mol_type="DNA"
/note="Reverse Primer PLMVd R"
/organism="Artificial Sequence"

<400> 2

acggcgttac ctggatac

18

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<222> 1..20

<223> /mol_type="DNA"
/note="Probe PLMVd P"
/organism="Artificial Sequence"

<400> 3

caagcggttg gttccgaggg

20



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201101135

②② Fecha de presentación de la solicitud: 08.09.2010

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **C12Q1/70** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	ES 2110916 A1 (IVIA) 16-02-1998, ejemplos 1 y 2; reivindicaciones 1-4.	1-3
X	OSMAN, F. et al., 'Application of a spotting sample preparation technique for the detection of pathogens in woody plants by RT-PCR and real-time PCR (TaqMan)', JOURNAL OF VIROLOGICAL METHODS, 2006, Vol.133, No. 2, páginas 130-136, ISSN: 0166-0934, Materiales y Métodos.	1-3
X	AMBROS, S. et al., 'Rapid generation of genetic heterogeneity in progenies from individual cDNA clones of peach latent mosaic viroid in its natural host', JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, 1999, Vol. 80, No. 8, páginas 2239-2252, ISSN: 0022-1317, Métodos.	4-7
X	MALFITANO, M. et al., 'Peach latent mosaic viroid variants inducing peach calico (extreme chlorosis) contain a characteristic insertion that is responsible for this symptomatology', VIROLOGY, 2003, Vol. 313, No. 2, páginas 492-501. ISSN: 0042-6822, Materiales y Métodos.	4-7

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
26.07.2012

Examinador
J. L. Vizán Arroyo

Página
1/6



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201101135

②② Fecha de presentación de la solicitud: 08.09.2010

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **C12Q1/70** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	MANDIC, B. et al., 'Incidence and genetic diversity of Peach latent mosaic viroid and Hop stunt viroid in stone fruits in Serbia', EUROPEAN JOURNAL OF PLANT PATHOLOGY, 2008, Vol. 120, No. 2, páginas167-176, ISSN: 0929-1873(print), ISSN: 1573-8469(electronic), Materiales y Métodos.	4-7

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
26.07.2012

Examinador
J. L. Vizán Arroyo

Página
2/6

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

C12Q

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

INVENES, EPODOC, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, EBI

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 26.07.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 4-7	SI
	Reivindicaciones 1-3	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 4-7	NO

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

Base de la Opinión.-

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

1. Documentos considerados.-

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	ES 2110916 A1 (IVIA)	16.02.1998
D02	OSMAN, F. et al., <i>J. Virol. Methods.</i> , (2006), 133 (2): 130-6.	2006
D03	AMBROS, S. et al., <i>J. Gen. Virol.</i> , (1999), 80 (8): 2239-52.	1999
D04	MALFITANO, M. et al., <i>Virology</i> , (2003), 313 (2): 492-501.	2003
D05	MANDIC, B. et al., <i>Eur. J. Plant Pathol.</i> , (2008), 120 (2):167-76.	2008

En D1-D2 se describen métodos de preparación de dianas inmovilizadas para una reacción PCR.

En D3-D5 se describen procedimientos de detección del viroide PLMVd ('Peach Latent Mosaic Viroid').

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**1. NOVEDAD (Art. 4.1. y Art. 6.1. de la Ley de Patentes).****1.1. Reivindicación independiente 1.**

1.1.1. El objeto de la reivindicación 1 consiste en un método para la detección del viroide PLMVd que comprende una reacción RT-PCR a tiempo real caracterizada por la inmovilización de las dianas objeto de la amplificación en un soporte sólido y su posterior extracción con agua destilada o un agente capaz de solubilizarlas. En los documentos D1 y D2 del estado de la técnica se describen procedimientos de preparación de dianas para PCR caracterizados porque dichas dianas son inicialmente inmovilizadas en un soporte sólido y posteriormente extraídas para su amplificación enzimática (cf. D1: ejemplos 1 y 2; reivindicaciones 1-4. D2: Materiales y Métodos). Por consiguiente, el objeto de protección de la reivindicación independiente 1 y el de las reivindicaciones dependientes 2 y 3 se considera que no es nuevo sobre la base de los documentos D1-D2.

1.2. La presente solicitud no satisface el criterio establecido en el Art. 4.1. de la Ley de Patentes, pues el objeto de las reivindicaciones 1-3 no es nuevo de acuerdo con el Art. 6.1. de la Ley de Patentes.

2. ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 4.1. y Art. 8.1. de la Ley de Patentes).**2.1. Reivindicación independiente 1 en combinación con las reivindicaciones 4 a 7.**

2.1.1. Los documentos D1, D3-D6 constituyen el estado de la técnica más próximo. En D1 se divulga un procedimiento de preparación de dianas para PCR. En D3-D6 se describen procedimientos de detección y cuantificación de PLMVd que consisten básicamente en una reacción RT-PCR caracterizada por el uso de cebadores específicos RF-43 y RF-44 cuyas secuencias son complementarias respectivamente a las posiciones 208-178 y 199-225 de la secuencia de PLMVd (cf. D1: Reivindicaciones 1-4. D3: Métodos, Figura 1. D4: Materiales y Métodos, Figura 3. D5: Materiales y Métodos, Figura 2).

2.1.2. El problema técnico a resolver por el objeto de la reivindicación independiente 1 puede ser considerado, por consiguiente, como la provisión de un nuevo procedimiento de detección del viroide PLMVd.

2.1.3. La solución propuesta es el procedimiento de la reivindicación 1 en combinación con las reivindicaciones 4 a 7 que consiste básicamente en una reacción RT-PCR a tiempo real caracterizada por el uso de los cebadores PLMVd-f (SEQ ID No 1) y PLMVd-r (SEQ ID No 2) cuyas secuencias son complementarias con las posiciones 141-163 y 199-216 de la secuencia del viroide PLMVd (cf. Reivindicaciones 4 y 5). Por consiguiente, la diferencia entre el procedimiento de la invención y los descritos en D3-D6 radica básicamente en los cebadores empleados en cada caso para la amplificación de la secuencia de PLMVd. Las secuencias de los cebadores utilizados tanto en la invención como en D3-D6 son complementarias a una región altamente conservada en las secuencias de las diferentes variantes identificadas del viroide PLMVd. (cf. D3: Figura 3). En concreto, el cebador PLMVd-r (SEQ ID No 2) de la invención comparte la secuencia del cebador RF-44 descrito en D3. Puesto que en la solicitud no se especifica el supuesto efecto sorprendente e inesperado derivado del uso de los cebadores PLMVd-f (SEQ ID No 1) y PLMVd-r (SEQ ID No 2) (SEQ ID No 1), y más concretamente del uso de PLMVd-f frente a RF-43 descrito en D3-D5 que se traduciría en una mejora del procedimiento de detección de la invención frente a los divulgados en D3-D5, se considera que la solución propuesta por el objeto de la reivindicación 1 en combinación con las reivindicaciones 4 a 7 al problema técnico planteado es una alternativa no inventiva a la solución existente en el estado de la técnica que no requeriría de la aplicación de conocimientos técnicos inventivos por parte del experto en la materia.

- 2.2. La presente invención no satisface el criterio establecido en el Art. 4.1. de la Ley de Patentes porque el objeto de la invención, definido en las reivindicaciones 1, 4-7, no implica actividad inventiva de acuerdo con el Art. 8.1. de la Ley de Patente.