

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

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
3 de diciembre de 2009 (03.12.2009)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2009/145603 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
C12Q 1/68 (2006.01) *C12P 19/34* (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/MX2009/000047

(22) Fecha de presentación internacional:
22 de mayo de 2009 (22.05.2009)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
1520-2008 26 de mayo de 2008 (26.05.2008) CL

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US): **UNIVERSIDAD DE CONCEPCION** [CL/CL]; Barrio Universitario, Edificio Empredec S/N, UPI, Concepción, Santiago (CL).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): **GARCÍA CANCINO, Apolinaria** [CL/CL]; Barrio Universitario, Edificio Empredec S/N, UPI, Concepción, Santiago

(CL). **GONZALEZ CORREA, Carlos** [CL/CL]; Barrio Universitario, Edificio Empredec S/N, UPI, Concepción, Santiago (CL). **TRABAL FERNÁNDEZ, Natalia** [UY/MX]; Sinaloa 173, casa 4, entre Abasolo y Topete, Col. El Manglito, C.P. 23060, La Paz, Baja California Sur (MX).

(74) Mandatario: **PARDAVELL JUÁREZ, Maria Angélica**; San Francisco No. 310, Col. Del Valle, C.P. 03100, Mexico, D. F. (MX).

(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, 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, 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.

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: TJN MOLECULAR KIT FOR DIAGNOSING VIRULENT STRAINS OF *HELICOBACTER PYLORI*

(54) Título: KIT MOLECULAR DE DIAGNOSTICO DE CEPAS VIRULENTAS DE *HELICOBACTER PYLORI*

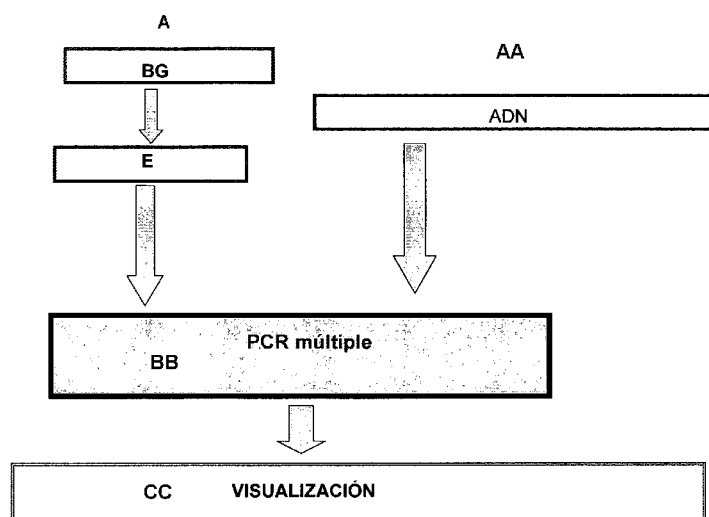


Figura 1

AA DNA
BB multiple PCR
CC DISPLAY

(57) Abstract: A kit in the form of a product and a method able to detect simultaneously four genes of *Helicobacter pylori* (rDNA16S Hpy), i.e. one identification gene and three virulence genes (cagA, vacAml, dupA), is disclosed. Moreover, the kit envisages the association of primers which determine the quality of extraction of the DNA (Eub gene).

(57) Resumen: Se divulga un kit como producto y un procedimiento capaz de detectar simultáneamente cuatro genes de *Helicobacter pylori* (ADNr16S Hpy), uno de identificación y tres genes de virulencia (cagA, vacAml, dupA). Además, el Kit contempla la asociación de cebadores que determinan la calidad de la extracción del ADN (gen Eub).

WO 2009/145603 A1



(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, 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))*

UN KIT MOLECULAR DE DIAGNÓSTICO DE CEPAS VIRULENTAS DE
HELICOBACTER PYLORI.

Estado del Arte

5

La infección por *Helicobacter pylori* constituye un problema importante para la salud pública, ya que es costoso encontrar medidas de control. Esto avala la necesidad de contar con herramientas que permitan
10 detectar factores de riesgo frente a esta patología. Sin embargo, en la actualidad no se dispone de exámenes microbiológicos comerciales que permitan detectar cepas virulentas.

15 En la actualidad, no se dispone de herramientas de laboratorio que permitan la detección eficaz de *H. pylori*, consecuentemente los tratamientos de erradicación de esta bacteria se basan sólo en un método cualitativo, no existen tratamientos, ni
20 terapias para determinar la virulencia de *H. pylori*.

Los métodos existentes sólo indican la presencia o ausencia del microorganismo, pero no revelan

propiedades o características de la cepa infectante. Otro aspecto importante, es que en forma muy esporádica se realizan estudios endoscópicos en población, de modo que existen escasos datos de infección en este grupo
5 etario.

A nivel mundial se ha informado que las terapias de erradicación fracasan entre un 20 y 80% de los casos por diferentes razones, entre ellas, la emergencia de
10 cepas resistentes a los agentes antibacterianos y la ausencia de estudios de susceptibilidad previos a la elección del tratamiento. No obstante, la situación descrita implica un alto costo en salud para el paciente y para el sistema de salud. Debido a que no se
15 disponen de antecedentes claros respecto del potencial patogénico de la cepa infectante, se entorpece la recuperación del paciente.

Clásicamente, se ha identificado esta bacteria a
20 nivel genérico, a través de la reacción de la enzima ureasa, que permite la colonización de la mucosa gástrica, puesto que en presencia de urea, iones

hidrógeno y agua, cataliza la formación de amonio y bicarbonato, que neutraliza los iones hidrógeno que rodean la bacteria y permite su sobrevivencia en el epitelio gástrico (Hazell y col., 1986; Mobley y col., 5 1988; Megraud y col., 1989).

H. pylori posee diversos factores de virulencia, que le permiten colonizar la mucosa gástrica del estómago y liberarse de los mecanismos de defensa del 10 hospedador. Algunos de estos factores son característicos de la especie y otros, de presencia variable. Entre los factores de virulencia clásicos presentes en todas las cepas, se puede mencionar la ureasa, la estructura espiralada, los flagelos y las 15 adhesinas, al igual que la endotoxina (LPS), además la enzima arginasa participa en la evasión de la respuesta inmune. Las adhesinas expresadas por la bacteria reconocen azúcares específicos de la célula epitelial. Las más estudiadas son la hemaglutinina N- 20 acetilneuraminillactosa y la proteína BabA (*blood group antigen binding adhesin*), esta última permite la unión

de la bacteria al grupo de antígenos de Lewis Le^B de la mucosa gástrica.

La colonización por esta bacteria se ve favorecida
5 por la presencia de proteínas específicas, como lipasas (mucinasas) que degradan el moco alterando la hidrofobicidad de la superficie epitelial. Esto posibilita el desplazamiento en la mucosa gástrica, y las proteasas de la bacteria hidrolizan las
10 inmunoglobulinas del hospedador (Smoot, 1997). Por otra parte, la bacteria evita la reacción inmunitaria, debido a la presencia de una proteasa específica de la IgA secretora, además el LPS, tiene bajo poder inmunogénico, lo que inhibe una efectiva reacción
15 inmunitaria por parte del hospedador (Muotiala y col., 1992).

Diversos genes han sido estudiados en un intento de lograr establecer qué cepas de *H. pylori* son más
20 patogénicas, y si existe asociación entre éstas con las manifestaciones clínicas de la infección. Es conocido en el arte, que la virulencia depende de gran número de

genes, la mayoría reside en un islote de patogenicidad (PAI). Los genes más estudiados son *vacA* y *cagA*, *iceA*, *babA2* y *dupA* (Zambon y col., 2003; Faúndez y col., 2002; Censini y col., 1996).

5

Algunos autores han sugerido el análisis de la combinación de estos marcadores; por ejemplo, el análisis de *vacA* y *cagA*, en conjunto. Al respecto, las cepas de *H. pylori* con una secuencia señal de *vacA* del tipo s1, se asocia a una mayor inflamación gástrica y con enfermedad péptica ulcerosa, mientras que los alelos *vacA* que presentan una región media del tipo m1, se relacionan con un daño epitelial más severo (Pan y col., 1999). Otros investigadores proponen que los genotipos *cagA* e *iceA*, serían una buena combinación de marcadores para la identificación de paciente con úlcera péptica (Faúndez y col., 2002).

Un nuevo gen que ha sido involucrado en la patogénesis de *H. pylori*, es el gen que codifica para las proteínas BabA1 y BabA2, las que permiten activar y

desactivar la síntesis en adhesinas (Gerhard y col., 1996).

Se ha efectuado una búsqueda en las principales bases de datos y oficinas de patentes del mundo. Los
5 documentos que presentan mayor relación con la presente invención, se discuten a continuación.

Un producto basado en la técnica de microarreglos de MWG Biotech, Inc. destinado a la búsqueda de *H.*
10 *pylori* se encuentra en el mercado. Este producto consta de 1877 oligonucleótidos para reconocer *H. pylori* de la cepa J99 y 26695. De estos, 1307 oligonucleótidos coinciden con ambas cepas, siendo 295 oligonucleótidos específicos de *H. pylori* cepa 26695 y
15 278 oligonucleótidos específicos de *H. pylori* cepa J99. No presenta solicitudes de patentes de invención vinculadas.

La empresa Invitek desarrolló un kit denominado
20 comercialmente INVIGENE®, para la detección del genotipo *cagA* de *H. pylori* en deposiciones, siendo capaz de determinar la presencia de infección activa

de esta bacteria. Este dispositivo no esta relacionado a una solicitud de patente invención. Este dispositivo sólo permite establecer la presencia del microorganismo, no así la virulencia de éste.

5

El producto "MPCR KIT for *H. pylori* detection" y el MP-70080, de la empresa Maxim Biotech, Inc, han sido desarrollados bajo la técnica de PCR múltiple. El Kit está diseñado para la detección rápida de *H.*
10 *pylori* usando PCR múltiple. Los partidores contenidos amplifican los genes *cagA* (358 bp), flagelina (152bp), *urea C* (315bp) y ARNr 16S (110bp). El producto incluye todos los reactivos necesarios para la amplificación, con la excepción de la enzima Taq polimerasa y dNTPs.
15 El kit incluye el buffer de trabajo, el control positivo respectivo, el marcador de peso molecular, agua libre de ADNasas y partidores específicos. Tanto partidores como genes que utiliza este Kit, no son utilizados en nuestra invención.

20

Respecto a las solicitudes de patentes invención vinculadas con la presente invención, podemos

mencionar que existen 64 solicitudes de patentes asociadas a la unidad inventiva. A continuación, se entrega información pormenorizada de las solicitudes y patentes de invención que se encuentran más referidas con el kit para la detección de *H. pylori*:

Invenciones relacionadas con Kit asociados a la detección de Ureasa.

Tabla N° 1. Invenciones relacionadas con kits para detectar *H pylori*

10	N° de patente	Determinancia virulencia	Tejido colectado	Partícula que detecta	Muestras de tejidos	Molécula identificada
	JP2006284567	Si	Sin colectar tejidos	Ig	Orina o saliva	Ureasa/proteína flagelar/VacA/CagA/NapA
15	TW24780913	No	No	Ig monoclonal	Deposición	Catalasa de <i>H. pylori</i>
	KR20000033013	*	*	*	No se determina	Ureasa
	WO9951769	No	No	No	Biopsias	Reacciones químicas
20	AU2002355464	No	Sangre	C13	Muestra de Sangre	Urea marcada con C13, incremento de absorbancia

	KR200300 31243	*	*	Primers VacA, CAG, entre otros	*	VacA, CagA, se utiliza la técnica RT-PCR
5	US200617 1887	No	Sangre o alient o	Urea marcada en forma de ácido	Aliento o sangre	Urea
	EP168585 1	No	Alient o	Urea marcada C13 en forma de ácido	Aliento o sangre	Identificac ión genérica
10	US200613 3999	No	Sangre del dedo o lóbulo de la oreja	C13 marcando urea, se toma un ungüento ácido	Muestra s de sangre	Carbono periférico
	JP200607 5139	Si	*	Secuencias nucleotídi cas específica s	*	cagA gen
15	WO200510 8995	Si	Sangre	Ig	Sangre, suero	HP1, HP2 y HP3
	CN168713 4	NO deter - minad o	No divulg a-do	Ig	No se sabe	HpaA y urease B
	WO200411 1265	No	Biopsi a	Ureasa en la muestra	Biopsia estomac al	Ureasa de H pilory

5	US200504 8077	No	Sangre	Ig	Suero	Proteínas HP1, HP2 and HP3 de H. pylori
	EP115633 1	No	Heces	Reacción con Ig	Deposi- ción	Fosfatasa alcalina y beta galactosida sa y horseradish pesoxidasa.
	CN146598 0	No	No se obtuvo	H pylori	Indeter- minado	Antígenos de membrana celular de H. pylori
10	WO200404 0306	No	Sangre	Ig	Suero	Alguna proteína de membrana de H. pylori
	WO020887 37	No	Heces	Ig	Suero	Catalasa de H. pylori
15	WO030808 40	No se sabe	No se determ i-nó	Ig	Suero	Antígenos de genes polimórfico s relacionado s
	WO020540 84	No	Suero, orina, lagrim as y/o saliva	Ig	Suero	Se reconoce pepsinógeno H. pylori tipo I y gastrina
	WO021454 1	No	Heces o en mues- tras estoma- cales	Ig	Suero	Se reconoce la catalasa de H. pylori
20						

5	WO019288 9	No	Aliento	C marcado	Aliento , aire exhalado	Una proporción del Carbono marcado que se asocia al CO2 exhalado y se realiza un título a través del C fijado por la bacteria
10	JP200211 9280	No	Sangre	H pylori	Sangre, suero	H. pylori a través de una Ig monoclonal
	WO002961 8	Si	Biopsia	Genes vacA o cagA de H. pylori	Del Tracto digestivo	Genes vacA o cagA H. pylori
	US617181 1	No	Aliento	H pylori de manera indirecta.	Aliento	Administrar ácido citrónico con C13 marcado.
15	JP200032 1271	Sólo presencia o ausencia de H pylori	Aire exhalado	Substitución de amonio	Aire exhalado	Reacción de amonio, según la relación de gases exhalados se determina la presencia de H. pylori
20						

5	WO993265 6	No	Mucosa Gástrica	H. pylori	Mucosa Gástrica	Urea, un sistema calorimétrico indirecto para determinar H pylori en el medio
10	DE198476 28	No	Sangre , detecta Ig	Una proteína superficie de H. pylori	Sangre	Proteína de H. pylori
15	US595505 4	No	No se determina claramente	H pylori a través de una cámara gamma, provisto de un detector de ionización	No se determina si es obtenida de heces o de saliva, si un método no invasivo	H pylori a través de un método por Ionización, que detecta en forma diferencial Tecnecio 99
20	WO994989 0	Si, determina la presencia de adhesinas	Puede ser sangre , si es un método inmunológico	H. pylori, una adhesina específica	En las reivindicaciones no se establece el tipo de muestras	Adhesina de H. pylori/CTXA 2B

5	US598118 4	No	H. pylori	ATPasa de H. pylori	No se determi -na como se obtiene H. pylori	ATPasa de H. pylori
	WO985308 2	Si	Muestr a de estóma -go	H. pylori	Muestra de estóma -go, se determi -na cómo se obtiene	Adhesinas IgA
10	WO961296 5	No	Suero en la sangre	H. pylori, un antígeno	Sangre	Un antígeno inmoviliza do en una membrana como soporte
	US584675 1	No	Suero	H pylori	Muestra "biólog i-ca"	H. pylori Serological assays such as ELISA, latex agglutinati on, and rapid EIA

* No hay información

La invención se diferencia de otras iniciativas, porque el kit inventado detecta genes prevalentes asociados a virulencia. Tanto los kits comerciales y otras invenciones relacionadas, en general, detectan la presencia de la enzima ureasa (característica de *Helicobacter* sp.), a través de una prueba positiva

visualizada por el viraje de un indicador de pH, lo que no indica necesariamente que se trate de una cepa de *H. pylori*, mucho menos que sea una cepa potencialmente patógena.

5

Además, la mayoría de los kit existentes no son específicos, pues otras helicobacterias presentes en la biopsia como por ejemplo, la especie *H. helmannii*, también generan una reacción de ureasa positiva, pues
10 ésta es una característica asociada al género *Helicobacter*. Otros kits utilizados se basan en la detección de anticuerpos en suero contra la bacteria.

El resultado de nuestra búsqueda, indica que existen
15 7 solicitudes de patentes de invención más vinculadas, a saber: JP2006284567, KR20030031243, WO2005108995, WO2004111265, WO0029618, WO9949890 y WO9853082. Dentro de estas solicitudes de patente de invención, se destacan las patentes KR20030031243 y WO2005108995,
20 que se relacionan directamente con la presente invención, porque dichas incitativas determinan la toxicidad de *H. pylori* a nivel genético. Sin embargo,

15

en todas estas iniciativas no se asocian a más de 2 genes de virulencia y a lo sumo una secuencia de identificación, o corresponden a técnicas difíciles de implementar.

5

No se han encontrado iniciativas de similares particularidades del invento propuesto y, más importante aún, estas iniciativas con sus peculiaridades se han desarrollado a partir de cepas, 10 cuyas secuencias en sus genes no se vinculan a las secuencias que se desean reivindicar en la presente invención.

Breve descripción de la invención

15

Este kit molecular se diferencia de las iniciativas existentes, tanto por los genes que 20 pesquisa, como en los reactivos que requiere. Las iniciativas existentes tardan más en encontrar las condiciones óptimas para amplificar simultáneamente genes asociados a virulencia, en las contadas iniciativas existentes que los determinan.

Otras invenciones tienen la desventaja que la concentración de ADN de algunas muestras biópsicas no permiten la detección simultánea de varios genes, a
5 diferencia de la presente invención. No se dispone de información de algún kit que detecte variados factores de virulencia, por lo tanto la invención presenta ventajas en el diseño y novedad respecto a los kits existentes. La invención puede generar un patrón
10 genético en *H. pylori* asociado a patologías más severas, aspecto no abordado por ninguna iniciativa anterior.

El kit molecular para la detección simultánea de
15 genes asociados a virulencia y a la especie, permite la pesquisa de cepas de *H. pylori* con mayor capacidad para la colonización e infección humana, y que se asocian con patologías severas derivadas de la infección crónica con *H. pylori*. Este kit permite la detección
20 rápida y eficiente de cepas de *H. pylori* con mayor potencial patogénico.

El producto inventado presentan una clara diferenciación y superioridad respecto a los métodos de diagnóstico existentes, puesto que actualmente, no existen productos comerciales que detecten genes de *H. pylori* de cepas específicas, y lo que es aún más importante, los escasos productos incluyen a lo más sólo un gen asociado a virulencia y otro a especificidad.

10

Descripción de la Invención

La invención se relaciona con un kit para el diagnóstico de la infección por *H. pylori*, el que requiere muestra humanas. Posteriormente, se aplica el kit bajo un protocolo preestablecido.

El kit de esta invención está concebido para la detección genética de *H. pylori*., esta iniciativa determina la existencia de variados genes de virulencia de estos microorganismos, asociándose a secuencias específicas. Además, no existe ninguna iniciativa que vincule variados genes de identificación y virulencia a

la vez para la diagnosis, si bien existen otras tecnologías similares en los objetivos de la detección de este microorganismo, existen pocas tendientes a determinar la existencia de variados genes de virulencia de estos microorganismos.

No existe ninguna iniciativa que vincule genes de identificación y virulencia a la vez para la diagnosis, todos estos asociados a las secuencias específicas que se divulgan en la presente invención.

Una importante ventaja de este kit, es que contiene todos los elementos para su mejor desempeño, tales como Taq polimerasa, dNTPs, buffer de trabajo, control positivo respectivo, marcador de peso molecular, partidores específicos y agua libre de ADNasa. Además, presenta los protocolos necesarios para la extracción del ADN. Éstos son aspectos novedosos de insuperable distinción en esta iniciativa, no considerados en invenciones similares.

En el arte, no existen productos que detecten varios genes de *H. pylori* de virulencia y a la vez reconozcan genes de la especie en *H. pylori*. Es más, en gran número de invenciones se reivindican kits, 5 cuya única aplicación está orientada al reconocimiento de cepas específicas, reconociendo a lo sumo dos genes presentes en la especie. Lo sorprendente e inesperado de esta invención radica en el conjunto de genes seleccionados, además este kit está concebido para ser 10 aplicado en cualquier parte del mundo y en diversos tipos de muestras.

Este kit presenta la particularidad que puede ser utilizado para la detección de cepas cuya distribución 15 es muy amplia, posibilitando extender las aplicaciones de la invención, en donde se pueden determinar los índices de virulencia y el rango de la misma. En la invención se ha trabajado con un grupo de genes de *H. pylori* de gran incidencia, y se ha confeccionado un 20 kit en base a secuencias de cepas representativas de grandes áreas geográficas, por lo que la presente iniciativa es de gran incidencia en diversos grupos

étnicos, respondiendo a una antigua problemática en el diagnóstico de *H. pylori* de alta patogenicidad, que permanecía sin resolver hasta ahora. Con esta tecnología se superan estos inconvenientes generando
5 una solución de amplia aplicabilidad.

Otro aspecto ventajoso de esta tecnología es su altísima confiabilidad, la probabilidad de obtener los resultados consistentes y certeros es ciertamente alta.
10 Si bien estos son atributos propios de cada test o kit con base molecular, en este caso es justo señalar que la rigurosa selección de las secuencias genéticas a replicar son determinantes para obtener resultados precisos, y el hecho que se trabajen con gran número de
15 ellas, otorga superiores ventajas comparativas por sobre los test existentes.

Además, esta iniciativa presenta la ventaja que estos resultados son inesperadamente exactos, debido a
20 la detección por parte de un número de genes, que al ser evaluados en su conjunto ofrecen reveladoras pruebas de virulencia de *H. pylori*, lo que posesiona a

esta tecnología de diagnóstico analítica muy por encima de las invenciones existentes.

Una nueva particularidad otorgada por esta
5 invención es su validez clínica, es decir, la certeza con la cual este kit de ADN diagnóstica, prediciendo el riesgo de una enfermedad en la práctica clínica. La validez clínica de este kit ofrece una prueba favorable, que incluye reactivos que otorgan una
10 inusual sensibilidad. El valor predictivo positivo, que en otras palabras es la probabilidad que las personas con pruebas positivas para este test desarrollen una patología relacionada, y el valor predictivo negativo asociado a esta herramienta, que es la probabilidad que
15 las personas con resultados negativos no manifiesten la enfermedad, es un aspecto que considera este kit, el cual no ha sido considerado en invenciones similares, otorgando una favorable supremacía. El kit puede detectar la presencia de una cepa de *H. pylori* y
20 sorprendentemente cuáles son los genes de virulencia con que cuenta la bacteria. Con todas estas ventajas se desarrolló un kit molecular en base a la detección

simultánea de genes asociados a virulencia en *H. pylori*: *cagA*, *vacAml*, y *dupA*, los que permiten la pesquisa de cepas con mayor capacidad patogénica.

5 El procedimiento para la detección de este organismo es sobre muestras de pacientes, en donde se encuentre este microorganismo o parte de su material genético. Preferentemente, se pueden utilizar biopsias del tracto intestinal, heces fecales, sangre, suero,
10 aliento, entre otros, donde se detecta en forma rápida y efectiva las cepas de *H. pylori* con mayor potencial patogénico. Con esta nueva herramienta, el facultativo podrá tomar decisiones en el manejo terapéutico del paciente infectado por *H. pylori*.

15

El diagnóstico microbiológico tradicional y molecular de *H. pylori*, generalmente, presenta la desventaja que se debe capacitar al personal en procedimientos diagnósticos de endosonografía, endoscopía e
20 histopatología, con este kit se superan estas dificultades técnicas por el manejo y fácil uso que presenta. Con la introducción del kit diagnóstico en la

rutina clínica se contribuye a un ahorro en salud, pues permite detectar en forma precoz la infección por cepas patogénicas, especialmente en el grupo infantil, lo que evitará la progresión de la infección a lesiones
5 mayores.

Otro aspecto abordado por esta invención, y que la mayoría de kits existentes no han solucionado, es determinar la virulencia de cepas. La mayoría de
10 invenciones vinculadas están concebidas para una acción clínica y no una acción preventiva. Con esta invención, se soluciona un problema permanente en el arte, que corresponde a la detección de cepas virulentas. Sobretudo, este kit permite detectar cepas virulentas,
15 aún cuando el individuo no cuenta con sintomatología clínica vinculada al padecimiento de la patología, la que está directamente correlacionada con el microorganismo virulento.

20 Esta invención es susceptible de ser implementada en cualquier laboratorio de diagnóstico clínico y sólo se requiere de un entrenamiento básico del personal y

equipamiento sencillo. Este kit constituye una alternativa real al cultivo tradicional en los laboratorios de diagnóstico microbiológico, con la ventaja de ahorro de tiempo y material. Aporta mayor
5 información para el clínico, que las tecnologías que actualmente están disponibles en el mercado, pues permite la pesquisa en forma rápida de cepas de *H. pylori* con un potencial patogénico mayor.

10 El hecho de conocer si se está frente a una cepa más patogénica permite tomar medidas oportunas para prevenir la aparición de enfermedades severas y recuperar la salud, lo que contribuye a mejorar la calidad de vida de la población con patología
15 gastroduodenal asociada a *H. pylori*.

Otra ventaja de este kit es la posibilidad de ser adecuado para su uso en equipos de PCR en tiempo real, lo que garantiza mayor sensibilidad pues detecta
20 cantidades tan pequeñas como 3pg de DNA, incluso si es diluido el DNA hasta niveles límites. Además, esta

técnica acorta considerablemente el tiempo de obtención del resultado.

Otras ventajas operativas de la invención es que se
5 realiza por PCR múltiple, en la única invención
relacionada existente que emplea PCR múltiple se
requiere la adición de algunos reactivos frescos, en
cambio la invención propuesta sólo adiciona agua
destilada libre de nucleasas, o puede presentar ambas
10 formas. Además, los genes de virulencia que detecta el
kit de la presente invención son genes de alta
incidencia.

El examen molecular propuesto se realiza acortando
15 el tiempo de obtención del resultado, pues el cultivo
tradicional necesita al menos de una semana. Por lo
tanto, esta técnica se ve como la mejor alternativa
actual para realizar el diagnóstico de *H. pylori*
patógena. La invención presenta ventajas a corto,
20 mediano y largo plazo, así se puede incrementar la
calidad de vida de las personas favoreciendo su salud y
disminuyendo el avance de la infección crónica de *H.*

pylori a patologías gastroduodenales más severas, con importante impacto asociado al diagnóstico y tratamiento de las patologías causadas por *H. pylori*.

5 El desarrollo de un kit molecular en base a la detección simultánea de genes asociados a virulencia en *H. pylori* (*cagA*, *vacA*_{ml}, y *dupA*), prevalentes en la población que permiten la pesquisa de cepas con mayor capacidad para la colonización, infección crónica y
10 desarrollo de lesiones de la mucosa gástrica humana no ha sido reivindicado anteriormente.

Con la presente invención ahora se puede determinar la prevalencia de las cepas de *H. pylori*
15 presentes en diversas muestras, preferentemente en biopsias gástricas con diversas patologías gastroduodenales, o sin sintomatología vinculada a este microorganismo. Además, en esta invención se determinan concentraciones ínfimas de ADN (1ng/μl), que son
20 suficientes para la detección de genes de *H. pylori*. La iniciativa propuesta determina las condiciones óptimas para amplificar simultáneamente dos o más genes

asociados a virulencia en cepas de *H. pylori* presentes en muestras de heces, fluidos o biopsias gástricas.

Hasta ahora, el facultativo no dispone de apoyo
5 del laboratorio bacteriológico para la toma de decisión sobre cuándo iniciar un tratamiento de erradicación de *H. pylori* y cuál sería la terapia más recomendable para aumentar las probabilidades de obtener éxito en la erradicación. El clínico utiliza el test de la ureasa
10 para la detección de la bacteria, por ejemplo, a partir de la muestra gástrica, no obstante una reacción positiva sólo indica presencia de *Helicobacter sp.*, no es especie específica y mucho menos señala su potencial patogénico.

15

La ausencia de métodos eficaces y asequibles para la identificación de poblaciones de alto riesgo y de marcadores biológicos útiles para el diagnóstico precoz, son consideraciones válidas en la solución de
20 este problema, contemplados en la solución divulgada en este documento.

El empleo de PCR múltiple permite la detección rápida y eficiente de cepas de *H. pylori* con mayor potencial patogénico a partir de muestras.

5 Descripción detallada de la Invención

 Específicamente, la invención contempla un proceso y un producto que permite, en varios pasos de análisis, identificar un microorganismo presente en
10 una muestra, además de determinar la virulencia de la cepa específica.

El esquema de procesamiento es el siguiente:

 Una vez obtenida la muestra se procede a extraer
15 el ADN, según las recomendaciones especificadas en el kit, que asegura un buen resultado en calidad y cantidad de ADN extraído. El ADN total a partir de biopsias gástricas, cultivos puros, fluidos corporales o heces se basa en términos generales, en el
20 tratamiento de la muestra con proteinasa K seguido por precipitación alcohólica (con etanol-cloroformo o isopropanol).

La genotipificación de las cepas de *H. pylori* por PCR múltiple consiste en la amplificación de varios genes a la vez, para ello se utilizan esferas de PCR
5 liofilizadas, que contienen todos los reactivos necesarios para la amplificación (dNTPs, Taq polimerasa, partidores específicos, buffer de reacción, $MgCl_2$), que deben ser reconstituidos con la cantidad adecuada de agua a un volumen final en un
10 rango comprendido entre 15 - 30 μ L. El rango de temperatura de hibridación requerido es de 40 a 55 °C y se utiliza entre 30 y 45 ciclos de PCR. Como condición inicial, se usan esferas PCR listas para partir (Amersham Biosciences®) y en un rango de 0,1 a
15 10 ng/ μ L de ADN (previamente extraído).

Finalmente, se realiza la amplificación en un termociclador con control térmico programable, de acuerdo con el siguiente programa:

- el procedimiento implica una denaturación inicial en un rango de temperatura entre 80 a 98 °C, por un periodo de tiempo entre 1 y 15 minutos,
- luego una denaturación suave, en el mismo rango de temperatura, por un periodo comprendido entre 0,1 a 3min,
- posteriormente, la hibridación se realiza en un rango de temperatura entre 45 a 60 °C por un periodo de tiempo de 1 - 70seg,
- la etapa de extensión inicial se realiza a una temperatura comprendida entre 65 - 75 °C por un periodo de tiempo de 1 a 60 segundos,
- la etapa de extensión final se lleva a cabo al mismo rango de temperaturas que la extensión inicial, pero el periodo de tiempo comprende de 3 a 10 min.

El kit contiene controles negativos que pueden ser utilizados durante todas las etapas, particularmente durante la amplificación (ADN genoma Humano). Además cuenta con controles positivos (ADN

cepa *H. pylori* ATCC 43504), los que son una secuencia de ADN como templado, estos controles son corridos en paralelo. Los productos de esta amplificación se analizan por electroforesis en gel de agarosa al 3% (p/v) y teñidos con bromuro de etidio (0,5 µg/µL, o syber green, figura N° 2). Los controles positivos que se utilizan son el patrón de amplificación por PCR múltiple para los genes *cagA* y *vacAm1* del ADN genómico, derivado de cepas control de *H. pylori* ATCC43504. Los fragmentos amplificados se analizan por electroforesis en geles de agarosa al 3%, seguido de tinción con bromuro de etidio y visualización con transiluminador UV.

En caso que el contenido de ADN sea escaso para amplificar todos los genes deseados, la invención subsana este problema utilizando las muestras del duplicado del cultivo, aspecto que se ha pensado en este particular protocolo, no obstante en la invención se demuestra que pequeñas cantidades de ADN (1ng/µL) sirven para amplificar varios genes simultáneamente o en forma separada sin dificultad.

La invención comprende un kit como producto listo para usar, que es capaz de detectar simultáneamente 5 genes: uno de identificación de *Helicobacter pylori*,
5 tres genes de virulencia; *vacA*, *cagA* y *dupA* y un par de cebadores, que determinan la calidad de la extracción de ADN (gen 16-23S universal Eubacteria).

La invención también incluye un kit y un
10 procedimiento que contempla reactivos y etapas, de este modo se incluyen los siguientes elementos:

- I. Etapa de extracción de ADN desde muestras. Es opcional, según el tipo de muestra a trabajar.
- 15 II. Reactivos y etapa de amplificación PCR múltiple.
Toda muestra ya procesada y cuyo resultado termine en ADN puro, es sometida a esta etapa.

El kit cuenta con un reactivo de amplificación,
20 para efectuar la técnica de PCR múltiple y los controles positivos y negativos.

Reactivos de PCR

Buffer de reacción, que es Tris-HCl, pH rango entre 8,5 y 9,5, KCl en un rango de concentraciones entre 480 y 560 mM y $MgCl_2$ en un rango de concentraciones entre 10 y 20 mM, enzima termoestable Taq polimerasa en un rango de 400 a 6000U, $MgCl^{2+}$, dNTPs (2'-deoxynucleoside 5'-triphosphate, conteniendo 4 dinucleótidos dATP, dCTP, dGTP, dTTP, en un rango de concentraciones entre 15 y 30mM), y cebadores específicos (ver tabla N °2).

Todos estos reactivos pueden encontrarse bajo dos formas en el kit: deshidratados, estériles y liofilizados o bien, líquido y estéril. Opcionalmente, el kit puede portar H_2O de calidad para ensayos de biología molecular. El kit también porta controles de ADN positivos y negativos, obtenidos a partir de cultivos puros de cepas de *H. pylori* de colección ATCC43504 y de genoma humano, respectivamente.

Tabla N° 2. Listado de secuencias de los cebadores utilizados para la detección de genes de virulencia y reconocimiento de *Helicobacter pylori*.

5	Gen detectado	Secuencia	Tamaño amplicón
	16 ADNr H. pylori	Identificación H. pylori:	
		Sentido 5' CTG GAG AGA CTA AGC	109 pb
		CCT CCA 3'	
		Antisentido 5' CAT TAC TGA CGC	
		TGA TTG 3'	
10		Genes de virulencia:	
	<i>cagA</i>	Sentido 5' TCA GA AAT TTG GGG	375 pb
		ATC AGC 3'	aprox
		Antisentido 5' GGG GAA CTG GTT	
		CTT GAT TG 3'	
15		Opcionalmente:	360-380pb
		Sentido: 5' ACG ATA GGG ATA	
		ACA GGC AAG C 3'	
		Antisentido: 5' GAT CCG TTC	
		GGAT TTG ATT CCC 3'	
		Opcionalmente:	380pb
		Sentido: 5'	
		TCAGAAATTTGGGGATCAGC 3'	
		Antisentido: 5'	
		ACATGGGGAACTGGTTCTTG 3'	
20			

35

	<i>vacAm alelo1</i>	Sentido 5' ATT TGG TCC GAG GTG 250 pb GGA AAG T 3'
		Antisentido 5' GCT AGG CGC TCT TTG AAT TGC T 3'
5		Opcionalmente: 205 pb Sentido: 5' GCA ATG CAG CAG CTA TGA TG 3'
		Antisentido: 5' GCG CTC TTT GAA TTG CTC TT 3'
10		Opcionalmente: 209 Sentido: 5' GCA ATG CAG CAG CTA TGA TG 3'
		Antisentido: 5' TAG GCG CTC TTT GAA TTG CT 3'
	<i>dupA</i>	Sentido 5' ACA AGG ACG ATT GAG 515 pb CGA TGG GAA 3'
15		Antisentido 5' TGG CTA GTT TGA GGT CTT AGG CGT 3'
	Determinación calidad de ADN:	
	<i>16S ADNr Eub</i>	Sentido 5' GCA CAA GCG GTG GAG 415 pb CAT GTG G 3'
		Antisentido 5' GCC CGG GAA CGT ATT CAC CG 3'

20

III. Etapa de visualización de los genes detectados e interpretación de datos

Esta etapa incluye la realización de un gel de agarosa al 3%, el que puede encontrarse opcionalmente
5 contenido en el kit, además del marcador de peso molecular específico.

La visualización de la muestra se efectúa mediante un reactivo que produce la tinción diferencial del ADN,
10 por ejemplo, bromuro de Etidio y posterior exposición a luz ultravioleta. El kit incluye y señala el método de tinción de ADN, puede incluir otros métodos de tinción de ADN con Bromuro de Etidio, o alternativos como read green, cyber green o similares, ya que el método de
15 tinción no es limitante para esta invención. Además, el kit cuenta con un sencillo manual de uso.

Ejemplos de Aplicación

Procedimiento

20 El kit es capaz de detectar simultáneamente al menos cuatro genes, uno de identificación de *Helicobacter pylori* y tres de virulencia *vacA*₁, *cagA* y

dupA. Además, el kit contempla la asociación de
cebadores que determinan la calidad de la extracción de
ADN. El kit cuenta con protocolos necesarios para la
correcta extracción de ADN desde muestras y/o cultivos
5 puros de *H. pylori*.

El kit está provisto de los reactivos necesarios
para la realización de PCR múltiple, con la utilización
de esferas liofilizadas estériles o líquidos estériles,
10 además del marcador de peso molecular y, opcionalmente,
se puede incluir en el kit agarosa para realizar el gel
y los reveladores para visualización de los genes, por
ejemplo, bromuro de Etidio, syber green.

15 El procedimiento general se observa en la figura N
°1, que muestra un esquema general de uso del kit de la
invención, en donde las variables son:

- Línea A: es el procedimiento a seguir cuando se
20 cuenta con muestra que debe ser extraído el DNA, a
modo de ejemplo, BG es Biopsia Gástrica,
- E: etapa de extracción del ADN,

- Línea B: es la aplicación del mismo procedimiento a seguir cuando se cuenta con aislamiento de la cepa de *H. pylori* pura,
- 5 ▪ ADN: es el ADN extraído desde muestras que contienen de *H. pylori*,
- PCR múltiple: consiste en la etapa en que se someten las muestras a PCR múltiple. Esta etapa es común para aquellas muestras que han sido originadas a través de aislamiento de ADN desde
- 10 muestras de biopsia gástrica, deposición o bien aquellas muestras en que se obtiene el ADN de la bacteria directamente aislada. Esta etapa tiene como objetivo la identificación y la detección de genes de virulencia de *H. pylori*,
- 15 ▪ Visualización: última etapa del proceso donde se ponen en evidencia los resultados mediante electroforesis en gel de agarosa, posterior tinción e interpretación de los resultados.

Ejemplo N°1: Aplicación del Kit en muestras de biopsias
20 **gástricas**

Este no es un ejemplo limitante de la tecnología, sino una aplicación puntual de kit desarrollado.

Muestras:

Se analizaron 56 biopsias provenientes del antro y cuerpo del estómago de 26 pacientes que consultaron por molestias gastroduodenales. Como controles positivos se utilizó una muestra proveniente de cepas *H. pylori* ATCC 43504, ATCC 25695 y 96.978 y una muestra control negativo correspondiente al ADN de genoma humano.

1.- Primera etapa de Extracción de ADN y subetapas:

Se realizó la extracción de ADN utilizando los reactivos detallados a continuación y disponibles en el kit propuesto: buffer de lisis (TrisHCl 10mM, EDTA 1mM, SDS 10%); Proteinasa K (20mg/mL); solución CTAB/NaCl; Cloroformo: alcohol isoamílico (24:1); fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1); Etanol y buffer TE. Se sometieron a ensayo 50 de las biopsias analizadas, otras muestras se agruparon como controles, a éstas se les realizó extracción de ADN por el método de Mazurier y col, (1992) a partir de los aislados puros del cultivo para *H. pylori*. Como control negativo se utilizó ADN genoma humano.

2.-Segunda etapa de amplificación de *H. pylori* por PCR Múltiple:

En el caso de la genotipificación de la
5 invención, la amplificación del ADN de las cepas de *H. pylori* se realizó por PCR múltiple, para ello se utilizaron esferas PCR liofilizadas (Lyophilised Pure Taq ready-to-go PCR Beads, Amersham, Pharmacia Biotech), que contienen buffer PCR 10X (Tris-HCl 100
10 mM, pH 8,3, KCl 500 mM y MgCl₂ 15 mM), Taq polimerasa a una concentración de 2,5U/μL, dNTPS (2'-deoxynucleoside 5'-triphosphate, conteniendo 4 dinucleótidos dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 10mM), MgCl₂ (100 mM) y cebadores específicos (10pmol/L), para
15 amplificar los genes de identificación 16S ADNr *H. pylori*, de calidad de ADNr16S EUB y de genes de virulencia vacA_{m1}, dupA y cagA. Todos estos reactivos fueron reconstituidos con agua libre de nucleasas en un volumen final de 15μL, a la mezcla se le
20 adicionaron 5μL de ADN previamente extraído. Las temperaturas de hibridación oscilaron entre 50 y 74 °C y se utilizaron 39 ciclos de amplificación.

3.- Tercera etapa de visualización de los productos de amplificación e interpretación de los datos:

Los resultados fueron analizados en gel de agarosa 3%, 70 voltios/seg por un tiempo de 45 min y comparados con un marcador de peso molecular, que consiste en ADN del fago lambda digerido con enzimas de digestión HindIII, que proporciona un perfil de 12 bandas de 100 pb cada una. Se tiñó con bromuro de etidio (0,5 µg/mL) y se visualizó mediante exposición con luz UV, finalmente se fotografió. Los resultados obtenidos se observan en la figura N °2.

Como se pudo observar en la figura N°2, se obtuvo amplificación positiva simultánea para los genes a detectar por el kit, en todos los casos ensayados. En los casos en que el diagnóstico histopatológico del paciente es más grave, se detectan al menos dos de los genes involucrados detectados por el kit de la invención. Se concluyó, tras aplicar este kit, que los pacientes que presentan alguna patología gastroduodenal, son aquellos que presentan los genes de

virulencia en sus muestras gastroduodenales, en otras muestras del mismo ensayo que evidencian la ausencia de estos genes no muestran esta patología.

Ejemplo N° 2: Comparación de la invención con un kit
5 comercial

Se efectuó una comparación de nuestra tecnología con el kit comercial alternativo MPCR Kit *H. pylori*; Cat N°. MP-700081. Este último presenta diferencias significativas a partir de los resultados, como las que
10 se manifiestan a continuación:

1) No contiene reactivos o procedimientos necesarios para realizar la extracción de ADN desde biopsias gástricas y/o cultivo de *H. pylori*.

15

2) No proporciona los reactivos Taq polimerasa y dNTPS, por lo que el interesado en usar dicho kit debe disponerlos de antemano. Además, los reactivos que incluye vienen en formato líquido y estéril, sensibles
20 a la pérdida de actividad por cambios en la temperatura (deben almacenarse y transportarse a -20 °C). Nuestra invención incluye dos tipos de formato a elección,

esferas liofilizadas estériles (completamente estables, manutención y traslado a temperatura ambiente) o líquido estéril.

5 3) El kit MPCR Kit *H. pylori*; Cat N°. MP-700081 detecta el gen *ureA*, que según lo reportado en la literatura internacional no es exclusivo de *H. pylori*, por lo que sólo detecta un gen de virulencia (*cagA*), mientras que la invención propuesta por nosotros
10 incluye al menos tres genes de virulencia.

4) A diferencia de la invención no proporciona un control negativo.

15 5) Nuestra tecnología proporciona la posibilidad de contar con los reactivos y procedimiento a seguir para la visualización e interpretación de los resultados.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento y kit para detectar la virulencia de una cepa de *H. pylori* CARACTERIZADO porque consta de la siguientes etapas:

- (a) etapa de extracción de ADN,
- (b) etapa de amplificación de secuencias por PCR múltiple, a través de la utilización de los partidores esquematizados en tabla N° 1,
- (c) etapa de visualización e interpretación de los datos.

2. Un procedimiento y kit para detectar la virulencia de una cepa de *H. pylori* según reivindicación N° 1, CARACTERIZADO porque la etapa de extracción de ADN se compone de las siguientes fases:

- i. fase de lisis celular,
- ii. fase de preparación de los componentes celulares y ADN,

iii. fase de elusión celular y recuperación del ADN.

3. Un procedimiento y un kit para detectar la virulencia de una cepa de *H. pylori* según reivindicaciones N° 1 y N° 2, CARACTERIZADO porque en la etapa de extracción de ADN, específicamente en la fase de lisis celular, es utilizado un tampón, proteinasa K y solución CTAB/NaCl.

10

4. Un procedimiento y un kit para detectar la virulencia de una cepa de *H. pylori* según reivindicaciones N° 1 y N° 2, CARACTERIZADO porque en la etapa de extracción de ADN, específicamente, en la fase de preparación del ADN se realiza con una mezcla de cloroformo, alcohol izoamílico, o bien una mezcla de fenol, cloroformo y alcohol izoamílico.

5. Un procedimiento y un kit para detectar la virulencia de una cepa de *H. pylori* según reivindicaciones N° 1 y N° 2, CARACTERIZADO porque en la etapa de extracción de ADN, específicamente, en la

20

fase de recuperación del ADN , se realiza la amplificación de las secuencias de interés a través de los siguientes partidores:

- 5 a. Gen de Identificación *H. pylori*, 16 ADNr *H. pylori*:

Sentido 5' CTG GAG AGA CTA AGC CCT CCA 3'

Antisentido 5' CAT TAC TGA CGC TGA TTG 3',

- 10 b. Genes de Virulencia:

cagA: Sentido 5' TCA GA AAT TTG GGG ATC AGC 3';

Antisentido: 5' GGG GAA CTG GTT CTT GAT TG 3`

vacAm alelo1: Sentido 5'ATT TGG TCC GAG GTG GGA
AAG T 3`,

- 15 Antisentido 5'GCT AGG CGC TCT TTG AAT TGC T 3`

Gen dupA: Sentido5' ACA AGG ACG ATT GAG CGA TGG
GAA 3`

Antisentido 5' TGG CTA GTT TGA GGT CTT AGG CGT
3',

20

- c. Gen Determinación calidad de ADN 16S ADNr
Eub:

47

Sentido 5' GCA CAA GCG GTG GAG CAT GTG G 3',

Antisentido 5' GCC CGG GAA CGT ATT CAC CG 3'.

6. Un procedimiento y un kit para detectar la
5 virulencia de una cepa de *H. pylori* según
reivindicación N° 1, CARACTERIZADO porque este
procedimiento utiliza controles de extracción de ADN
positivo y negativo.

10 7. Un procedimiento y un kit para detectar la
virulencia de una cepa de *H. pylori* según
reivindicación N° 1, CARACTERIZADO porque el control de
extracción de ADN positivo es *H. pylori* ATCC43504 y el
control negativo de extracción es genoma humano.

15

8. Un procedimiento y un kit para detectar la
virulencia de una cepa de *H. pylori* según
reivindicación N° 1, CARACTERIZADO porque para la etapa
de visualización se debe utilizar un gel de agarosa en
20 un rango de concentraciones entre 1,2 y 4%.

9. Un kit para detectar la presencia y la virulencia de una cepa de *H. pylori* en distintos tipos de muestras según reivindicación N° 1, CARACTERIZADO porque contiene los reactivos de amplificación y los
5 partidores adecuados, además de los controles, opcionalmente:

- a. reactivo de detección e interpretación de los datos,
- 10 b. reactivo de lisis celular,
- c. reactivo de precipitación.

10. Un kit para detectar la presencia y la virulencia de una cepa de *H. pylori* en distintos tipos
15 de muestras según reivindicación N °9, CARACTERIZADO porque el reactivo de amplificación contiene los siguientes elementos:

- a. reactivos de PCR múltiple con los partidores
20 específicos para *H. pylori*,
- b. controles de amplificación de las secuencias de interés.

11. Un kit para detectar la presencia y la virulencia de una cepa de *H. pylori* en distintos tipos de muestras según reivindicación N° 9, CARACTERIZADO porque el reactivo de amplificación, específicamente, los reactivos utilizados para PCR múltiple son:

- a. buffer de reacción;
- b. enzima termoestable, Taq polimerasa;
- 10 c. nucleotidos;
- d. cebadores específicos Gen de Identificación *H. pylori*, 16 ADN *H. pylori*: Sentido 5' CTG GAG AGA CTA AGC CCT CCA 3'; Antisentido 5' CAT TAC TGA CGC TGA TTG 3';
- 15 e. genes de virulencia:
 - i. *cagA*: Sentido 5' TCA GA AAT TTG GGG ATC AGC 3';
Antisentido 5' GGG GAA CTG GTT CTT GAT TG 3';
 - 20 ii. *vacAm alelo1*: Sentido 5' ATT TGG TCC GAG GTG GGA AAG T 3'; Antisentido 5' G°CT AGG CGC TCT TTG AAT TGC T 3;

50

iii. Gen *dupA*: Sentido 5' ACA AGG ACG ATT
GAG CGA TGG GAA 3'; Antisentido 5' TGG
CTA GTT TGA GGT CTT AGG CGT 3';

Opcionalmente:

5

cagA: Sentido: 5' ACG ATA GGG ATA ACA GGC AAG
C 3'; Antisentido: 5' GAT CCG TTC GGAT TTG ATT
CCC 3';

cagA: Sentido: 5' TCAGAAATTTGGGGATCAGC 3';

10

Antisentido: 5' ACATGGGGAACTGGTTCTTG 3'.

Opcionalmente:

vacAm1: Sentido: 5' GCA ATG CAG CAG CTA TGA
TG 3'; Antisentido: 5' GCG CTC TTT GAA TTG
CTC TT 3';

15

iv. *vacAm1*: Sentido: 5' GCA ATG CAG CAG
CTA TGA TG 3'; Antisentido: 5' TAG GCG
CTC TTT GAA TTG CT 3';

f. gen determinación calidad de ADN 16S ADNr

20

Eub; Sentido 5' GCA CAA GCG GTG GAG CAT GTG G
3'; Antisentido 5' GCC CGG GAA CGT ATT CAC CG
3'.

12. Un kit para detectar la presencia y la virulencia de una cepa de *H. pylori* en distintos tipos de muestras según reivindicación N° 9, CARACTERIZADO porque el buffer de reacción del reactivo de amplificación está constituido por Tris-HCl 100 mM, pH rango entre 8,5 y 9,5, KCl en un rango de concentraciones entre 480 y 560 mM y MgCl₂, en un rango de concentraciones entre 10 y 20 mM.

10

13. Un kit para detectar la presencia y la virulencia de una cepa de *H. pylori* en distintos tipos de muestras según reivindicación N° 9, CARACTERIZADO porque la Taq polimerasa utilizada para la amplificación de secuencia, tiene un rango de concentración entre 400 a 6000U.

14. Un kit para detectar la presencia y la virulencia de una cepa de *H. pylori* en distintos tipos de muestras según reivindicación N° 9, CARACTERIZADO porque el rango de concentraciones de los dinucleótidos es entre 15 y 30mM.

20

15. Un kit para detectar la presencia y la virulencia de una cepa de *H. pylori* en distintos tipos de muestras según reivindicación N° 9, CARACTERIZADO porque los cebadores utilizados responden a las siguientes particularidades:

a. Gen de Identificación *H. pylori*, 16 ADNr *H.*

pylori: Sentido 5' CTG GAG AGA CTA AGC CCT
10 CCA 3'; Antisentido 5' CAT TAC TGA CGC TGA
TTG 3';

b. Genes de Virulencia:

i. *cagA* Sentido 5' TCA GA AAT TTG GGG ATC
AGC 3'; Antisentido 5' GGG GAA CTG GTT
15 CTT GAT TG 3';

ii. *vacAm alelo1* Sentido 5' ATT TGG TCC GAG
GTG GGA AAG T 3';
Antisentido 5' GCT AGG CGC TCT TTG AAT TGC
T 3';

20 iii. Gen *dupA*, Sentido 5' ACA AGG ACG ATT GAG
CGA TGG GAA 3';

53

Antisentido 5' TGG CTA GTT TGA GGT CTT
AGG CGT 3';

c. Gen determinación calidad de ADN 16S ADNr
Eub; Sentido 5' GCA CAA GCG GTG GAG CAT GTG G
5 3'; Antisentido 5' GCC CGG GAA CGT ATT CAC CG
3'.

16. Un kit para detectar la presencia y la
virulencia de una cepa de *H. pylori* en distintos tipos
10 de muestras según reivindicación N° 9, CARACTERIZADO
porque los cebadores utilizados presentan una
concentración entre 1 y 20 pmol/l.

17. Un kit para detectar la presencia y la
15 virulencia de una cepa de *H. pylori* en distintos tipos
de muestras según reivindicación N° 9, CARACTERIZADO
porque todos los reactivos del kit pueden encontrarse
bajo dos formas físicas:

20 a. deshidratados, estériles y liofilizados, o
b. líquidos y estériles.

18. Un kit para detectar la presencia y la virulencia de una cepa de *H. pylori* en distintos tipos de muestras según reivindicación N° 9, CARACTERIZADO porque los controles de amplificación de las secuencias
5 de interés son:

- a. control positivo: ADN de cepa de *H. pylori* ATCC43504,
- b. control negativo: ADN humano.

10

19. Un kit para detectar la presencia y la virulencia de una cepa de *H. pylori* en distintos tipos de muestras según reivindicación N° 9, CARACTERIZADO porque los partidores se estandarizan previamente:

15

- a. gen de identificación *H. pylori*, 16 ADNr *H. pylori*: Sentido 5' CTG GAG AGA CTA AGC CCT CCA 3'; Antisentido 5' CAT TAC TGA CGC TGA TTG 3';

20

- b. genes de virulencia:

55

- i. *cagA* Sentido 5' TCA GA AAT TTG GGG ATC
AGC 3'; Antisentido 5' GGG GAA CTG GTT
CTT GAT TG 3';
- ii. *vacAm alelo1* Sentido 5' ATT TGG TCC GAG
5 GTG GGA AAG T 3';
Antisentido 5' GCT AGG CGC TCT TTG AAT TGC
T 3';
- iii. Gen *dupA*, Sentido 5' ACA AGG ACG ATT GAG
CGA TGG GAA 3';
- 10 Antisentido 5' TGG CTA GTT TGA GGT CTT
AGG CGT 3';
- c. gen determinación calidad de ADN 16S ADNr
Eub; Sentido 5' GCA CAA GCG GTG GAG CAT GTG G
3', Antisentido 5' GCC CGG GAA CGT ATT CAC CG
15 3'.

20. Un kit para detectar la presencia y la
virulencia de una cepa de *H. pylori* en distintos tipos
de muestras según reivindicación N° 9, CARACTERIZADO
20 porque los genes de virulencia, de identificación de la
especie y de calidad de extracción del ADN son
amplificados al unísono.

21. Un kit para detectar la presencia y la virulencia de una cepa de *H. pylori* en distintos tipos de muestras según reivindicación N° 9, CARACTERIZADO porque la amplificación se realiza con un volumen de 25 μ l, un rango de temperaturas entre 58 y 65 °C; un rango de ciclos entre 35 y 45, utilizando soporte esferas de amplificación.

22. Un kit para detectar la presencia y la virulencia de una cepa de *H. pylori* en distintos tipos de muestras según reivindicación N° 9, CARACTERIZADO porque el kit puede ser utilizado a partir de una concentración de 1ng de ADN.

23. Un kit para detectar la presencia y la virulencia de una cepa de *H. pylori* en distintos tipos de muestras según reivindicación N° 9, CARACTERIZADO porque este kit consta de partidores que permiten determinar la calidad del ADN extraído.

24. Un kit para detectar la presencia y la virulencia de una cepa de *H. pylori* en distintos tipos de muestras según reivindicación N° 9, CARACTERIZADO porque el kit determina la presencia y virulencia de 5 diferentes cepas de *H. pylori*, en diversas muestras, en grupo que comprende muestras de fluidos corporales, tejidos o heces.

25. Un kit para detectar la presencia y la 10 virulencia de una cepa de *H. pylori* en distintos tipos de muestras según reivindicación N° 9, CARACTERIZADO porque el kit permite identificar los genes de virulencia *cagA*, *vacAm alelo1*, y *Gen dupA*.

15 26. Un kit para detectar la presencia y la virulencia de una cepa de *H. pylori* en distintos tipos de muestras según reivindicación N° 9, CARACTERIZADO porque el kit permite identificar a *H. pylori* a través del gen *16SADNr*.

20

27. Un kit para detectar la presencia y la virulencia de una cepa de *H. pylori* en distintos tipos

de muestras según reivindicación N° 9, CARACTERIZADO porque el kit permite la determinación de la calidad de ADN, a través de la visualización del gen 16S ADNr Eub.

- 5 28. Un kit para detectar la presencia y la virulencia de una cepa de *H. pylori* en distintos tipos de muestras según reivindicación N° 9, CARACTERIZADO porque el kit puede incluir agua ultrapura carente de nucleasas.

10

29. Un kit para detectar la presencia y la virulencia de una cepa de *H. pylori* en distintos tipos de muestras según reivindicación N°9, CARACTERIZADO porque el kit contiene un manual de uso.

15

1/2

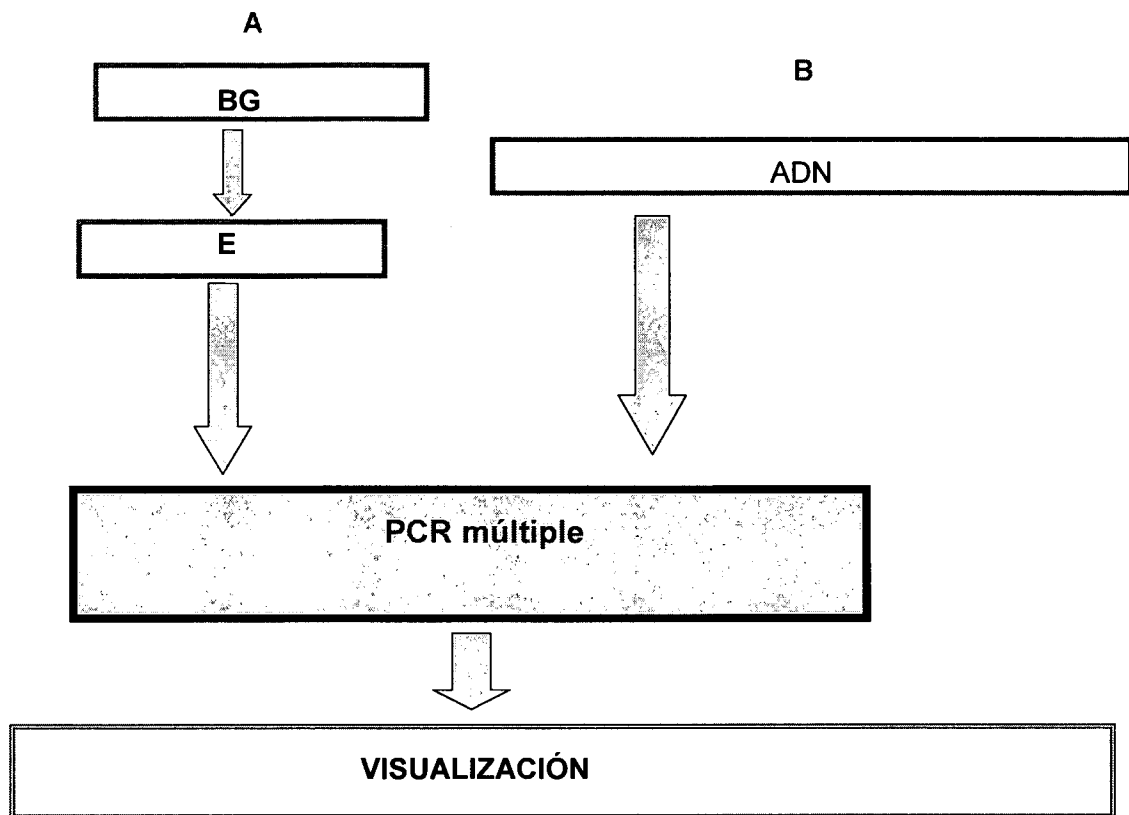


Figura 1

2/2

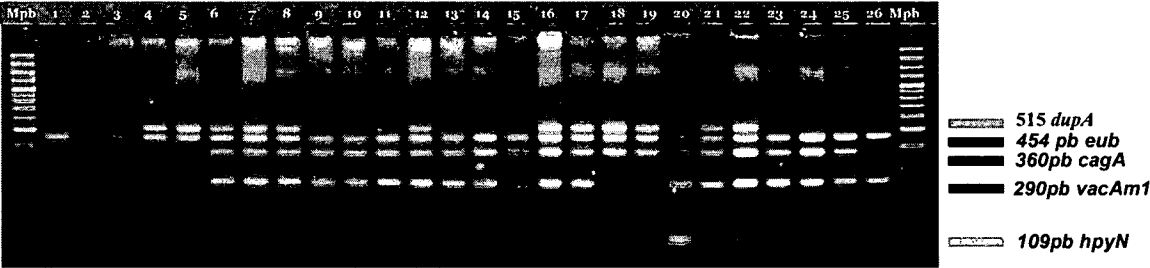


Figura 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ MX 2009/000047

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, C12P

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)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, EBI

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 20060003350 A1 (TSANG et al). 05.01.2006, page 1, paragraphs 0007 - page 2, paragraph 0056; claims 1-26.	1-28
Y	JAYASINGHE HS et al. Prevalence of Duodenal Ulcer-Promoting Gene (dupA) of Helicobacter pylori in Patients with Duodenal Ulcer in North Indian Population. Helicobacter. 2007, Vol. 12, pages 591-597, the whole document.	1-28
A	CHATTOPADHYAY S et al. Multiplex PCR Assay for Rapid Detection and Genotyping of Helicobacter pylori Directly from Biopsy Specimens. Journal of Clinical Microbiology. 2004, Vol. 42(6), pages 2821- 2824, the whole document.	1-28

☒ 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.

“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)

“O” document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“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

“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

“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

“&”

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

07.September.2009 (07.09.2009)

Date of mailing of the international search report

(08/09/2009)

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^a D. García Grávalos

Telephone No. +34 91 349 34 04

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/MX 2009/000047

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LU H et al. Duodenal Ulcer Promoting Gene of Helicobacter pylori. Gastroenterology. 2005, Vol. 128, pages 833-848, the whole document.	1-28
A	WO 0029618 A1 (UNIVERSITY OF VIRGINIA PATENT FOUNDATION). 25.05.2000, page 1, line 10 - page 3, line 29.	1-28

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ MX 2009/000047

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 29
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 29 relates to a kit to detect the presence and virulence of an *Helicobacter pylori* strain, and the technical feature describing the kit relates to an instruction manual. However, an instruction manual is not considered to be a technical feature, since it defines the product in terms of information describing the use of the kit.

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/ MX 2009/000047

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2006003350 A	05.01.2006	US 2005244836 A US 7381547 B	03.11.2005 03.06.2008
WO 0029618 A	25.05.2000	AU 1716500 A	05.06.2000

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ MX 2009/000047

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/68 (2006.01)

C12P 19/34 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°
PCT/ MX 2009/000047

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, C12P

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)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, EBI

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
Y	US 20060003350 A1 (TSANG et al). 05.01.2006, página 1, párrafos 0007- página 2, párrafo 0056; reivindicaciones 1-26.	1-28
Y	JAYASINGHE HS et al. Prevalence of Duodenal Ulcer-Promoting Gene (dupA) of Helicobacter pylori in Patients with Duodenal Ulcer in North Indian Population. Helicobacter. 2007, Vol. 12, páginas 591-597, todo el documento.	1-28
A	CHATTOPADHYAY S et al. Multiplex PCR Assay for Rapid Detection and Genotyping of Helicobacter pylori Directly from Biopsy Specimens. Journal of Clinical Microbiology. 2004, Vol. 42(6), páginas 2821- 2824, todo el documento.	1-28

☒ 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:	"I"	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.	"X"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"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.
"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).	"&"	documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.		
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.		

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.

07. Septiembre. 2009 (07.09.2009)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

08 de Septiembre de 2009 (08/09/2009)

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

O.E.P.M.

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.

N° de fax 34 91 3495304

Funcionario autorizado

M° D. García Grávalos

N° de teléfono +34 91 349 34 04

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/MX 2009/000047

C (continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
A	LU H et al. Duodenal Ulcer Promoting Gene of Helicobacter pylori. Gastroenterology. 2005, Vol. 128, páginas 833-848, todo el documento.	1-28
A	WO 0029618 A1 (UNIVERSITY OF VIRGINIA PATENT FOUNDATION). 25.05.2000, página 1, línea 10 - página 3, línea 29.	1-28

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°
PCT/ MX 2009/000047

Recuadro II Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (continuación del punto 2 de la primera hoja)

Este informe de búsqueda internacional no se ha realizado en relación a ciertas reivindicaciones según el Artículo 17.2.a) por los siguientes motivos:

1. ☒ Las reivindicaciones N°s: 29
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:
La reivindicación 29 se refiere a un kit para detectar la presencia y la virulencia de una cepa de *Helicobacter pylori*, donde la característica técnica que describe al kit se refiere a un manual de uso. Dicho manual de uso no es considerado como una característica técnica, ya que define al producto en función a un elemento informativo sobre la descripción de el empleo del kit.
2. ☐ Las reivindicaciones N°s:
se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:
3. ☐ Las reivindicaciones N°s:
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la Regla 6.4.a).

Recuadro III Observaciones cuando falta unidad de invención (continuación del punto 3 de la primera hoja)

La Administración encargada de la búsqueda internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

1. ☐ Dado que todas las tasas adicionales requeridas han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.
2. ☐ Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda podrían serlo sin realizar un esfuerzo que justifique tasas adicionales, esta Administración no requirió el pago de tasas adicionales.
3. ☐ Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones N°s:
4. ☐ Ninguna de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda de tipo internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones N°s:

Indicación en cuanto a la protesta

- ☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante y, en su caso, el pago de una tasa de protesta.
- ☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no se pagó en el plazo establecido para ello.
- ☐ El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional N°

PCT/MX 2009/000047

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
US 2006003350 A	05.01.2006	US 2005244836 A US 7381547 B	03.11.2005 03.06.2008
WO 0029618 A	25.05.2000	AU 1716500 A	05.06.2000

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ MX 2009/000047

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12Q 1/68 (2006.01)

C12P 19/34 (2006.01)