

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

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(10) Número de publicación internacional
WO 2017/194808 A1

(43) Fecha de publicación internacional
16 de noviembre de 2017 (16.11.2017) **WIPO | PCT**

(51) Clasificación internacional de patentes:
C12Q 1/68 (2006.01)

SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2017/070293

(84) Estados designados (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, 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, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(22) Fecha de presentación internacional:
10 de mayo de 2017 (10.05.2017)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P201630606 11 de mayo de 2016 (11.05.2016) ES

Publicada:

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

(71) Solicitante: **UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA** [ES/ES]; Edificio Emprendia - Campus Vida, 15782 Santiago de Compostela, La Coruña (ES).

(72) Inventores: **FERNÁNDEZ ÁLVAREZ, Clara**; Área de Valorización, Transferencia e Emprendemento-Edificio Emprendia- Campus Vida- Universidade de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, La Coruña (ES). **FERNÁNDEZ GONZÁLEZ, Santiago**; Área de Valorización, Transferencia e Emprendemento- Edificio Emprendia- Campus Vida- Universidade de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, La Coruña (ES). **SANTOS RODRÍGUEZ, Ysabel**; Área de Valorización, Transferencia e Emprendemento- Edificio Emprendia- Campus Vida- Universidade de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, La Coruña (ES).

(81) Estados designados (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible*): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW,

(54) Title: METHOD FOR DETECTING, QUANTIFYING AND/OR IDENTIFYING *AEROMONAS SALMONICIDASPP. SALMONICIDA*

(54) Título: PROCEDIMIENTO PARA LA DETECCIÓN, CUANTIFICACIÓN Y/O IDENTIFICACIÓN DE *AEROMONAS SALMONICIDASPP. SALMONICIDA*

(57) Abstract: The present invention relates to a method for detecting, quantifying and/or identifying *Aeromonas salmonicida* spp. *salmonicida* in a real-time PCR assay. The method comprises: performing a real-time PCR assay on samples of pure or mixed bacterial cultures, on DNA isolated from pure or mixed bacterial cultures or on fish tissues, using a pair of primers specific for *Aeromonas salmonicida* spp. *salmonicida*; and detecting, quantifying and identifying the amplified nucleotide sequences. The invention also relates to a kit for detecting, quantifying and identifying *Aeromonas salmonicida* spp. *salmonicida*, which comprises said primers, fragments of control DNA, deoxyribonucleotide triphosphates, a reaction buffer and an instruction manual.

(57) Resumen: La presente invención es un procedimiento para detectar, cuantificar y/o identificar *Aeromonas salmonicida* spp. *salmonicida* en un ensayo de PCR en tiempo real. El procedimiento comprende realizar un ensayo de PCR en tiempo real en muestras de cultivos bacterianos, puros o mixtos, o en ADN aislado de cultivos bacterianos, puros o mixtos o en tejidos de peces, usando una pareja de cebadores específicos para *Aeromonas salmonicida* spp. *salmonicida* y detectar, cuantificar e identificar las secuencias nucleotídicas amplificadas. La invención también proporciona un kit para detectar, cuantificar e identificar *Aeromonas salmonicida* spp. *salmonicida* que comprende los cebadores mencionados anteriormente, fragmentos de ADN control, desoxinucleótidos trifosfato, tampón de reacción y manual de instrucciones.



WO 2017/194808 A1

DESCRIPCIÓN

PROCEDIMIENTO PARA LA DETECCIÓN, CUANTIFICACIÓN Y/O IDENTIFICACIÓN DE
AEROMONAS SALMONICIDA SPP. SALMONICIDA

SECTOR TÉCNICO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere a procedimiento y kit para su utilización en la detección específica de *Aeromonas salmonicida spp. salmonicida* en cultivos bacterianos, puros y mixtos, y en muestras de tejidos de peces, mediante un procedimiento de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real con un fluorocromo. El procedimiento es de aplicación en el
10 sector de la acuicultura para el control de infecciones en peces salmónidos y no salmónidos, así como para la detección del patógeno en poblaciones naturales.

ESTADO DE LA TÉCNICA

15 La furunculosis clásica es una enfermedad bacteriana causada por una bacteria Gram-negativa denominada *Aeromonas salmonicida spp. salmonicida* o también conocida como *A. salmonicida* típica. La enfermedad presenta una amplia distribución geográfica y afecta a peces salmónidos y no salmónidos de agua dulce y marina, tanto en poblaciones naturales como en
20 granjas de producción (Austin y Austin, 2007). La furunculosis es una enfermedad sistémica con manifestaciones aguda, crónica y subclínica, que causa grandes pérdidas económicas en el sector de la acuicultura a nivel mundial (Austin y Austin, 2007). Sin embargo, se han descrito otras subespecies de *A. salmonicida*, como *Aeromonas salmonicida spp. achromogenes*, *Aeromonas salmonicida spp. masoucida* y *Aeromonas salmonicida spp. smithia* que también son capaces de afectar a una gran variedad de especies de peces, produciendo furunculosis
25 atípica. Los signos clínicos de las furunculosis causadas por las subespecies típicas y atípicas de *A. salmonicida* en los peces afectados son muy similares, dificultando el diagnóstico presuntivo basado en la clínica.

Debido a esto, el diagnóstico de la enfermedad se basa habitualmente en el aislamiento del
30 agente patógeno, a partir de tejidos de los peces enfermos, y su identificación mediante métodos microbiológicos convencionales que implican el aislamiento del agente patógeno y su identificación mediante pruebas morfológicas, fisiológicas y bioquímicas, empleando métodos clásicos o sistemas multiprueba de caracterización (Santos *et al.*, 1993. Aquaculture. 116: 111-120). Los estudios fenotípicos, serológicos y moleculares han demostrado que *Aeromonas salmonicida spp. salmonicida* constituye un grupo homogéneo, a diferencia de las restantes
35 subespecies conocidas como *Aeromonas salmonicida* atípicas (*A. salmonicida spp. achromogenes*, *A. salmonicida spp. masoucida*). Sin embargo, estos métodos presentan

limitaciones importantes como son: i) lento crecimiento de la bacteria y ii) dificultad para distinguir entre las subespecies de *Aeromonas salmonicida* en base a caracteres fenotípicos.

La identificación de *A. salmonicida* y su detección en tejidos de peces enfermos también puede realizarse utilizando métodos que no requieran el aislamiento del microorganismo en cultivo puro como son la técnica de ELISA (Hiney *et al.*, 1994. Dis. Aquat. Organ. 19: 161-167), PCR convencional (Hiney *et al.*, 1992. Appl. Environ. Microbiol. 58: 1039-1042; Gustafson *et al.*, 1992. Appl. Environ. Microbiol. 58: 3816-3825; Miyata *et al.*, 1996. Aquaculture, 141: 13-24), amplificación isotérmica de ácidos nucleicos (LAMP) (Kulkarni *et al.*, 2009. J Rapid Methods Autom Microbiol. 17: 476-489), PCR múltiple (mPCR) (Altinok *et al.*, 2008. Vet. Microbiol. 131:332-338; Onuk *et al.*, 2010. J Vet Sci. 11(3): 235–241; Kulkarni *et al.*, 2010. Aquac. Res. 41, 1533-1538), mPCR combinada con microarrays (González *et al.*, 2004. J Clin Microbiol., 42:1414-1419). Sin embargo, ninguno de los métodos descritos hasta el momento permiten la diferenciación de *Aeromonas salmonicida* a nivel de subespecies.

La PCR en tiempo real es una técnica sensible que permite la cuantificación de los productos generados en la reacción de PCR, mediante la detección por fluorescencia del producto generado (Higuchi *et al.*, 1993. Biotechnology 11, 1026-1030). Esta técnica ha sido ampliamente utilizada para la detección, cuantificación e identificación de bacterias patógenas Gram-negativas que infectan a peces incluyendo *A. salmonicida* (Balcázar *et al.*, 2007. J. Med. Microbiol., 56: 323–328; Keeling, 2013. J. Fish Dis. 36: 495–503). Pero ninguno de estos procedimientos permite diferenciar entre las subespecies de *A. salmonicida*.

En 1996, Miyata *et al.* describieron una pareja de cebadores utilizando como diana un fragmento de 512 pares de bases (pb), obtenido tras la amplificación aleatoria del genoma (RAPD) de la cepa de referencia ATCC14174 de *A. salmonicida* spp. *salmonicida*, utilizando como cebadores de la reacción secuencias arbitrarias de ADN sintético. El método de PCR convencional descrito por estos investigadores permite la diferenciación de *A. salmonicida* spp. *salmonicida* de las subespecies atípicas *masoucida* y *achromogenes*. Sin embargo, este método es lento, tedioso y costoso al requerir la extracción del ADN a partir de los cultivos bacterianos y el análisis de los productos de amplificación mediante electroforesis. Además, la secuencia diana descrita por Miyata *et al.* (1996) no tiene una función conocida, no está depositada en GenBank y se desconoce si se trata de una secuencia de copia única o múltiple, lo cual dificulta el diseño de otros procedimientos de diagnóstico basados en PCR no convencional.

En 2014, otros autores proponen un método de diagnóstico para *A. salmonicida* spp. *salmonicida* basado en la detección de producto final (CN104357570), mediante amplificación isotérmica de ácidos nucleicos (LAMP), utilizando tres parejas de cebadores. Sin embargo, este método cuenta con una especificidad baja ya que, no es capaz de detectar niveles bajos

de ADN o ADN de baja calidad (Fukuta *et al.*, 2003. Arch. Virol. 148:1713-1720; Kubota *et al.*, 2008. Phytopathology 98:1045-1051). Sumado a esto, la técnica LAMP precisa la confirmación de los resultados mediante métodos espectrofotométricos o de electroforesis, lo que incrementa el coste y tiempo necesario para el diagnóstico.

5 Todo lo expuesto pone de manifiesto la necesidad de desarrollar un procedimiento específico, sensible, rápido y barato para la identificación de *Aeromonas salmonicida spp. salmonicida* en muestras de peces así como, para su diferenciación de las especies que producen la furunculosis atípica. Un procedimiento que comprende la realización de una PCR en tiempo
10 real con un fluorocromo junto a la curva de fusión para la identificación del patógeno de peces *A. salmonicida spp. salmonicida*, sería un procedimiento adecuado para alcanzar este fin.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

15 La presente invención se refiere a un procedimiento y kit para la detección, cuantificación y/o identificación de *Aeromonas salmonicida spp. salmonicida* y, más concretamente, para la detección, cuantificación y/o identificación de ADN específico de *Aeromonas salmonicida spp. salmonicida* o bien, a partir de cultivos bacterianos, puros o mixtos, o bien a partir de muestras de tejidos de peces. La invención se basa en la amplificación y cuantificación de ADN mediante
20 PCR en tiempo real. El procedimiento propuesto comprende la amplificación de un fragmento de 119 pb perteneciente a un gen que codifica una proteína efectora con actividad serina/treonina quinasa del sistema de secreción Tipo III específica de *Aeromonas salmonicida spp. salmonicida*. En dicha amplificación se incluye el fluorocromo SYBR Green que permite la detección de los productos de la amplificación. La lectura continua de la fluorescencia durante
25 el proceso permite identificar al patógeno en base al pico de fluorescencia específico. Este procedimiento no amplifica el ADN de otras subespecies de *Aeromonas salmonicida*, ni el ADN de peces hospedadores, siendo los cebadores diseñados altamente específicos e informativos.

La técnica propuesta es más sensible y específica que los métodos moleculares descritos
30 hasta la fecha y presenta las siguientes ventajas:

- La identificación de *Aeromonas salmonicida spp. salmonicida* a partir de cultivos bacterianos, puros o mixtos, y de tejidos así como, su diferenciación de las subespecies *Aeromonas salmonicida spp. achromogenes* y *Aeromonas salmonicida spp. masoucida*, principales agentes causales de furunculosis atípica.
- 35 - Se reduce el coste y tiempo necesario para el diagnóstico de la furunculosis.
- La detección de los productos de PCR es rápida, fácil y objetiva, permitiendo un fácil y rápido diagnóstico de la infección.

- No requiere utilizar electroforesis en geles de agarosa, luz ultravioleta, ni el uso de agentes tóxicos para la detección de los productos obtenidos.
 - Gracias al uso de la PCR en tiempo real, donde no se requiere la manipulación de los productos de PCR al final de la amplificación, se disminuye el riesgo de contaminación.
- 5 - Permite la monitorización de la respuesta a los diversos tratamientos así como, la detección temprana de recidivas
- Es susceptible de ser automatizado.

10 Constituye un primer objeto de la presente invención un procedimiento para la detección, cuantificación y/o identificación de *Aeromonas salmonicida spp. salmonicida* en muestras de cultivos bacterianos, puros y mixtos, y en tejidos de peces que comprende las siguientes etapas:

- 15 a) Aislar muestras de:
- i. Cultivo bacteriano, puro o mixto o,
 - ii. ADN de un cultivo bacteriano, puro o mixto, o de tejidos de peces
- b) Realizar un ensayo de PCR en tiempo real sobre las muestras de la etapa a) utilizando una pareja de cebadores específicos para *Aeromonas salmonicida spp. salmonicida*
- 20 identificados por las secuencias SEQ ID NO 1 y SEQ ID NO 2 y un fluorocromo.
- c) Detectar, cuantificar y/o identificar las secuencias nucleotídicas amplificadas como resultado de la PCR en tiempo real.

25 Una realización de esta invención es el procedimiento de la invención, donde se utilizan cebadores que tienen una identidad del 75% respecto a los cebadores identificados por las secuencias SEQ ID NO 1 y SEQ ID NO 2. Una realización preferente es un procedimiento de la invención donde dicha identidad es del 85%. Una realización más preferente es un procedimiento de la invención donde dicha identidad es del 95% y una realización aún más preferente es un procedimiento de la invención donde dicha identidad es del 99%.

30 En la presente solicitud, el porcentaje de identidad en una secuencia determinada se calcula teniendo en cuenta que un 99% de identidad significa que un 99% de residuos de la secuencia completa de los cebadores identificados por las secuencias SEQ ID NO 1 y SEQ ID NO 2 son idénticos a los residuos de la secuencia determinada.

Otra realización de la invención es un kit para detectar, cuantificar y/o identificar *Aeromonas salmonicida* spp. *salmonicida* en un ensayo de PCR en tiempo real, que comprende:

- a) La pareja de cebadores específicos para *Aeromonas salmonicida* spp. *salmonicida* identificados por las secuencias SEQ ID NO 1 y SEQ ID NO 2,
 - 5 b) Un fluorocromo,
 - c) Desoxinucleótidos trifosfato,
 - d) Tampón de reacción,
 - e) Un control positivo,
 - f) Manual de instrucciones que detalla el procedimiento a seguir.
- 10 El control positivo está presente en el kit para permitir determinar el correcto funcionamiento de los componentes del kit.

Una realización preferente es el kit de la invención donde el fluorocromo es SYBR Green.

- Una realización preferente es el kit de la invención donde el control positivo es ADN de *A. salmonicida* spp. *salmonicida* de la cepa de referencia ATCC33658.
- 15

Otra realización preferente es un kit de la invención donde dichos desoxinucleótidos trifosfato son dATP, dCTP, dGTP y dTTP a una concentración final 200 µM.

- Otra realización preferente es un kit de la invención donde dicho tampón de reacción es 50 mM de cloruro de potasio, 10 mM TrisHCl pH 9,0 a temperatura ambiente, 2,5 mM de MgCl₂, 20mM (NH₄)₂SO₄, 2,5 unidades de polimerasa por 25 µL de reacción.
- 20

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- Figura 1.** Curva de disociación de los productos de amplificación obtenidos utilizando suspensiones bacterianas de *A. salmonicida* spp. *salmonicida* que muestra un valor de
- 25 temperatura de fusión de 80,5-81,0°C, específica para el fragmento de 119 pb amplificado.

- Figura 2.** Curvas de disociación obtenidas utilizando ADN extraído a partir de tejidos infectados con suspensiones de *A. salmonicida* spp. *salmonicida* de diferentes concentraciones (2×10^9 hasta 2×10^2 células/mL) que muestra el producto de amplificación característico de la
- 30 subespecie *salmonicida* ($T_m=80,5-81,0^\circ\text{C}$). En el eje de abscisas se indica la temperatura de fusión y en el eje de ordenadas la derivada de las unidades de fluorescencia relativa.

Figura 3. Curvas de disociación obtenidas utilizando suspensiones bacterianas de *A. salmonicida* típica y atípicas que muestra la ausencia del producto de amplificación

característico de la subespecie *salmonicida* ($T_m=80,5-81,0^{\circ}\text{C}$) en las subespecies atípicas (*A. salmonicida* spp. *achromogenes*, y *A. salmonicida* spp. *masoucida*). En el eje de abscisas se indica la temperatura de fusión y en el eje de ordenadas la derivada de las unidades de fluorescencia relativa.

5 **Figura 4.** Recta de calibrado obtenida con el protocolo de PCR cuantitativa descrito utilizando como fuente de ADN suspensiones de *A. salmonicida* spp. *salmonicida* con diferentes concentraciones (2×10^9 hasta 2×10^2 células/mL). Coeficiente de correlación (R^2)=0,992.

10 **Figura 5.** Recta de calibrado obtenida con el protocolo de PCR cuantitativa descrito utilizando ADN obtenido a partir de tejidos infectados con diferentes concentraciones de *A. salmonicida* spp. *salmonicida*. Coeficiente de correlación (R^2)=0,981

MODO DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION

15 La presente invención se ilustra adecuadamente mediante los siguientes ejemplos, los cuales no pretenden ser limitativos de su alcance.

Ejemplo 1. Diseño de cebadores específicos

20 Los cebadores específicos se diseñaron en base a la secuencia de 3735 pb del gen *aopO* de *A. salmonicida* spp. *salmonicida* A449, localizado en el plásmido pAsa5 (GenBank Accession no.DQ386862.1) el cual codifica para una proteína serina/treonina kinasa de tipo III del sistema de secreción ligada a la virulencia (Dacanay *et al.*, 2006). Para el diseño de los cebadores y para testar su especificidad, se utilizaron las herramientas Pick Primer y Primer-BLAST, del
25 Servicio de Información del Centro Nacional de Biotecnología. Para la evaluación de las propiedades de los cebadores y para optimizar las condiciones de la PCR en tiempo real se utilizó IDT SciTools Web Tools (Integrated DNA Technologies, Inc.). Se desarrollaron el cebador directo, *Asal-aopO-FW* y el cebador inverso *Asal-aopO-RV* (Tabla 1).

30 La especificidad de los cebadores se evaluó usando la herramienta BLAST para alineamiento frente a otras secuencias recogidas en la base de datos GenBank. Estos cebadores franquean un fragmento interno de 119 pb del gen *aopO*.

Tabla 1. Secuencias de los cebadores específicos diseñados para *A. salmonicida* spp. *salmonicida*.

Cebador (oligonucleótido)	Secuencia 5'→3'
<i>Asal-aopO-FW</i> Caracterizado por SEQ ID NO:1	AGCTCATCCAATGTTTCGGTATT
<i>Asal-aopO-RV</i> Caracterizado por SEQ ID NO:2	AAGTTCATCGTGCTGTTCCA

Ejemplo 2. Ensayos de patogenicidad

- 5 La infección bacteriana se realizó a través de una inyección intraperitoneal a juveniles de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) (10,0 ±0,1 gramos) con una suspensión bacteriana de *A. salmonicida* SK181/12, SK164/12, MT416 y TO96 7.1, siguiendo la metodología previamente descrita (Santos et al., 1991. J Appl Ichthyol 7, 160-167). En resumen, los peces fueron anestesiados por inmersión en tricaina metano sulfonato (MS-222, Sigma) (60mgL⁻¹, Neiffer & Stamper, 2009) y se les inyectó intraperitonealmente 0,1 mL de suspensión bacteriana que contenía entre 10⁶ y 10⁹ células/mL (10 peces por dosis). Durante el experimento, los peces fueron mantenidos en un tanque de 100 litros con agua dulce aireada. Los peces moribundos fueron sacrificados mediante una sobredosis de anestésicos y se extrajeron en condiciones asépticas muestras de sangre, bazo y riñón para su análisis mediante métodos basados en cultivo y caracterización bacteriana y análisis de PCR en tiempo real con SYBR Green.

Ejemplo 3. Aislamiento de ADN a partir de cultivos bacterianos y/o tejidos de peces

- A partir de cultivos puros y mixtos de los microorganismos problema, se prepararon suspensiones bacterianas en agua estéril libre de nucleasas ajustadas a una concentración final aproximada de entre 3 x 10⁹ y 3 x 10¹² células/mL (tubo 7 de la escala MacFarland). El número de unidades formadoras de colonias (UFC) se determinó mediante el método de recuento en placa, usando medio agar Soja Tríplica suplementado con 1% de NaCl (TSA-1) y se contaron las colonias de bacterias producidas.

El ADN de cultivos bacterianos, puros y mixtos, se obtuvo usando InstaGene Matrix (BioRad).

- 25 A partir de peces sanos (sacrificados por sobredosis de anestésico), se obtuvieron tejidos (riñón, bazo y sangre), se homogenizaron con solución salina a una concentración final del

25% peso/volumen, se inocularon con un volumen igual de suspensiones bacterianas de la cepa de referencia de *Aeromonas salmonicida* spp. *salmonicida* ATCC33658 conteniendo entre $1,5 \times 10^9$ y $1,5 \times 10^2$ células/mL y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente. El número de unidades formadoras de colonias (UFC) se determinó mediante el método de recuento en placa. Se prepararon también homogenizados de tejidos no inoculados para utilizarlos como control negativo. Los homogenizados se utilizaron en la reacción de PCR con o sin extracción previa de ADN.

A partir de tejidos obtenidos a partir de peces infectados experimentalmente con *A. salmonicida* spp. *salmonicida* (cepas SK181/12, SK164/12, MT416 y TO96 7.1), se prepararon homogenizados en solución salina como se describió en el párrafo anterior. Los homogenizados obtenidos se utilizaron en la reacción de amplificación directamente o previa extracción del ADN.

Además, para la validación y comparación del procedimiento, tejidos de 40 truchas arcoíris cultivadas ($10\text{g} \pm 1\text{g}$) y 40 rodaballos ($45\text{g} \pm 5\text{g}$) con y sin síntomas clínicos de furunculosis y 20 rodaballos con síntomas de tenacibaculosis fueron procesados como se describió anteriormente antes de ser utilizados en los ensayos de PCR en tiempo real y métodos microbiológicos.

El ADN se obtuvo a partir de los homogenizados de tejidos utilizando Dynabeads® DNA Direct™ Universal (Dyna).

El ADN obtenido a partir de cultivos bacterianos y de homogenizados de tejidos se almacenaron a -20°C hasta su uso.

Ejemplo 4. Amplificación de fragmentos de ADN a partir de cultivos puros y mixtos.

En la amplificación se utilizó la siguiente mezcla de reacción: $12,5 \mu\text{L}$ de Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2x), no ROX, (Thermo Scientific), $1 \mu\text{L}$ de cada cebador (SEC ID NO 1 y SEC ID NO 2) (400 nmoles), $5 \mu\text{L}$ de la suspensión bacteriana problema o $2 \mu\text{L}$ de ADN bacteriano purificado. Se completó el volumen de la reacción con agua destilada estéril hasta los $25 \mu\text{L}$.

La mezcla de reacción se sometió a amplificación en un termociclador MiniOpticon para PCR en tiempo real, con el software de detección CFX Manager™ (BioRad), en las siguientes condiciones: un paso inicial de incubación a 95°C durante 15 min, seguido de 35 ciclos consistentes en una desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, y una hibridación a 62°C durante 30 segundos. El análisis de las curvas de fusión de los productos amplificados se llevó a cabo mediante el aumento gradual de la temperatura desde 60°C a 100°C en intervalos de $0,5^\circ\text{C}$ durante 10 segundos y lectura continua de la fluorescencia para determinar la T_m del producto de amplificación específico para *A. salmonicida* spp. *salmonicida*. En todas las

muestras positivas para *Aeromonas salmonicida* spp. *salmonicida* se detectó un pico de amplificación con una temperatura de fusión de 80,5-81,0°C (Figura 1). Estos resultados indican que la técnica de PCR y los cebadores descritos en la presente invención, permiten un diagnóstico sensible, rápido y económico de la furunculosis típica.

5

Ejemplo 5. Amplificación de fragmentos de ADN a partir de tejidos de peces.

En la amplificación se utilizó la siguiente mezcla de reacción: 12,5 µL de Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2x) (Thermo Scientific), 1 µL de cada cebador (SEC ID NO: 1 y SEC ID NO: 2) (concentración final de 400 nm) y 2-5 µL de ADN extraído. Se completó el volumen de la
10 reacción con agua destilada estéril hasta los 25µL.

La mezcla de reacción se sometió a amplificación en un termociclador MiniOpticon para PCR en tiempo real, con el software de detección CFX Manager™ (BioRad), en las siguientes condiciones: un primer paso de incubación a 95°C durante 5 min, seguido de 35 ciclos
15 consistentes en una desnaturalización a 95°C durante 1 minuto, hibridación a 62°C durante 30 segundos. El análisis de las curvas de fusión de los productos amplificados se llevó a cabo mediante el aumento gradual de la temperatura desde 65°C a 95°C en intervalos de 0,5°C durante 10 segundos y lectura continua de la fluorescencia para determinar la T_m del producto de amplificación específico para *Aeromonas salmonicida* spp. *salmonicida*. En todas las
20 muestras de tejido analizadas, la presencia de un pico de amplificación con una T_m de 80,5-81,0°C (Figura 2), indicó la presencia de *Aeromonas salmonicida* spp. *salmonicida* en el tejido del pez infectado. La bacteria se detectó en todas las muestras de peces que mostraron síntomas clínicos de furunculosis. No se obtuvo amplificación con muestras de ADN de tejidos de peces sanos o infectados con otras especies bacterianas. Estos resultados indican que la
25 técnica de PCR cuantitativa y los cebadores descritos en la presente invención pueden ser empleados como un método de diagnóstico utilizando los tejidos de peces enfermos como fuente de ADN.

Ejemplo 6. Especificidad y sensibilidad de la PCR en tiempo real con SYBR Green.

La especificidad del ensayo de la PCR en tiempo real y la existencia de amplificaciones cruzadas fueron evaluadas utilizando una muestra de ADN de *Aeromonas salmonicida* spp. *salmonicida* (40 cepas) y varias bacterias no diana incluyendo subespecies atípicas de *Aeromonas salmonicida* (*Aeromonas salmonicida* spp. *achromogenes* (n=3), *Aeromonas salmonicida* spp. *masoucida* (n=1) y *Aeromonas salmonicida* ssp. *pectinolytica* (n=2)) y otras
35 especies de *Aeromonas* como *Aeromonas sobria* (n=2), *Aeromonas caviae* (n=2), *Aeromonas bestiarum* (n=1), *Aeromonas hydrophila* (n=2), *Aeromonas media* (n=1), *Aeromonas allosaccharophila* (n=1), *Aeromonas popoffii* (n=1), *Aeromonas simiae* (n=1), *Aeromonas trota* (n=1), *Aeromonas eucrenophila* (n=1), *Aeromonas veronii* (n=1), *Aeromonas molluscorum*

(n=1), *Aeromonas jandjeii* (n=1), *Aeromonas encheleia* (n=1), y *Aeromonas piscicola* (n=2). Además, se incluyeron otras bacterias representativas de especies patógenas de peces no relacionadas pertenecientes a los géneros *Tenacibaculum* (n=4), *Flavobacterium* (n=2), *Yersinia* (n=1), *Vibrio* (n=5), *Listonella* (n=2), *Edwardsiella* (n=2), *Streptococcus* (n=2),
5 *Vagococcus* (n=1), *Lactococcus* (n=2) y *Renibacterium* (n=1) que afectan a peces de agua dulce y salada.

En las PCR en tiempo real realizadas se detectó el gen *aopO* en todas las cepas de *Aeromonas salmonicida* spp. *salmonicida*, cuando se utilizaron las suspensiones bacterianas directamente o el ADN extraído a partir de ellas. La curva de fusión mostró un único pico con
10 un valor T_m medio de entre 80,5 y 81,0°C. No se obtuvo amplificación cuando se utilizaron las suspensiones bacterianas o el ADN extraído de subespecies atípicas (*Aeromonas salmonicida* spp. *achromogenes*, *Aeromonas salmonicida* spp. *masoucida*) (Figura 3) o de otras especies bacterianas no relacionadas taxonómicamente.

15 Para el ensayo de sensibilidad, tanto las suspensiones bacterianas (con y sin previa extracción de ADN) como el ADN de tejidos de peces infectados, fueron utilizados para generar una curva estándar usada para la cuantificación de las muestras desconocidas. Se preparó un gráfico representando los valores Ct frente al log₁₀ de ADN o concentración bacteriana. La eficiencia de los ensayos de la PCR en tiempo real se calculó con la pendiente de la recta de acuerdo
20 con la ecuación $E=10^{(-1/m)}-1$. La linealidad de la curva de calibración se expresó como coeficiente de correlación (R²). Las Figura 4 y 5 muestran las rectas de calibrado obtenidas utilizando ADN bacteriano o ADN obtenido a partir de tejidos, respectivamente.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la detectar, cuantificar y/o identificar *Aeromonas salmonicida* spp. *salmonicida* en un único ensayo de PCR en tiempo real que comprende:
 - a. Aislar muestras de:
 - 5 i. Cultivo bacteriano, puro o mixto, o,
 - ii. ADN de un cultivo bacteriano, puro o mixto, o de tejidos de peces
 - b. Realizar dicho ensayo de PCR en tiempo real sobre las muestras de la etapa a) utilizando una pareja de cebadores específicos para *Aeromonas salmonicida* spp. *salmonicida* identificados por las secuencias SEQ ID NO 1 y SEQ ID NO 2.
 - 10 c. Detectar las secuencias nucleotídicas amplificadas como resultado de dicha PCR en tiempo real.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, donde se utilizan cebadores que tienen una identidad del 75% respecto a los cebadores identificados por las secuencias SEQ ID NO 1 y SEQ ID NO 2.
- 15 3. Procedimiento según la reivindicación 2, donde dicha identidad es del 85%.
4. Procedimiento según la reivindicación 2, donde dicha identidad es del 95%.
5. Procedimiento según la reivindicación 2, donde dicha identidad es del 99%.
6. Procedimiento según la reivindicación 1 a 5 en el que la temperatura de fusión del producto de amplificación obtenido mediante la PCR en tiempo real está comprendida
20 entre 80,5°C y 81,0°C
7. Kit para la detección, cuantificación y/o identificación de *Aeromonas salmonicida* spp. *salmonicida* en un único ensayo de PCR en tiempo real, que comprende:
 - a. Los cebadores específicos identificados por las secuencias SEQ ID NO 1 y SEQ ID NO 2.
 - 25 b. Un fluorocromo
 - c. Control positivo
 - d. Desoxinucleótidos trifosfato,
 - e. Tampón de reacción
 - f. Manual de instrucciones que detalla el procedimiento a seguir.

8. Kit según la reivindicación 7, donde el fluorocromo se selecciona de la lista que consiste en: FAM, DABCYL, CY-3, JOE, VIC, CY-5, TAMRA, SYBR Green, ROX, Rojo de Texas.
9. Kit según la reivindicación 8, donde el fluorocromo es SYBR Green.
10. Kit según la reivindicación 7 a 9 donde los desoxinucleotidos trifosfato son dATP, dCTP, dGTP y dTTP en una concentración final de 200 μ M.
11. Kit según una de las reivindicaciones 7 a 10, donde dicho tampón de reacción es 50 mM de cloruro de potasio, 10 mM TrisHCl pH 9,0 a temperatura ambiente, 2,5 mM de $MgCl_2$, 20mM $(NH_4)_2SO_4$, 2,5 unidades de polimerasa por 25 μ L de reacción).
12. Kit según una de las reivindicaciones 7 a 11, donde el control positivo es ADN de *A. salmonicida spp. salmonicida* de la cepa de referencia ATCC33658.

DIBUJOS

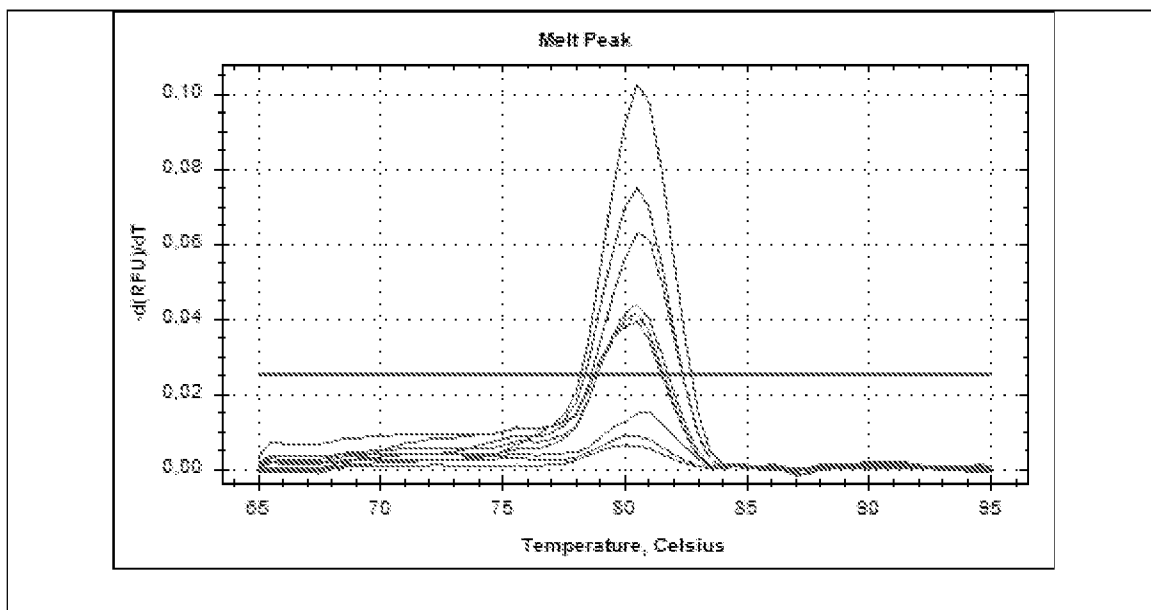


Figura 1

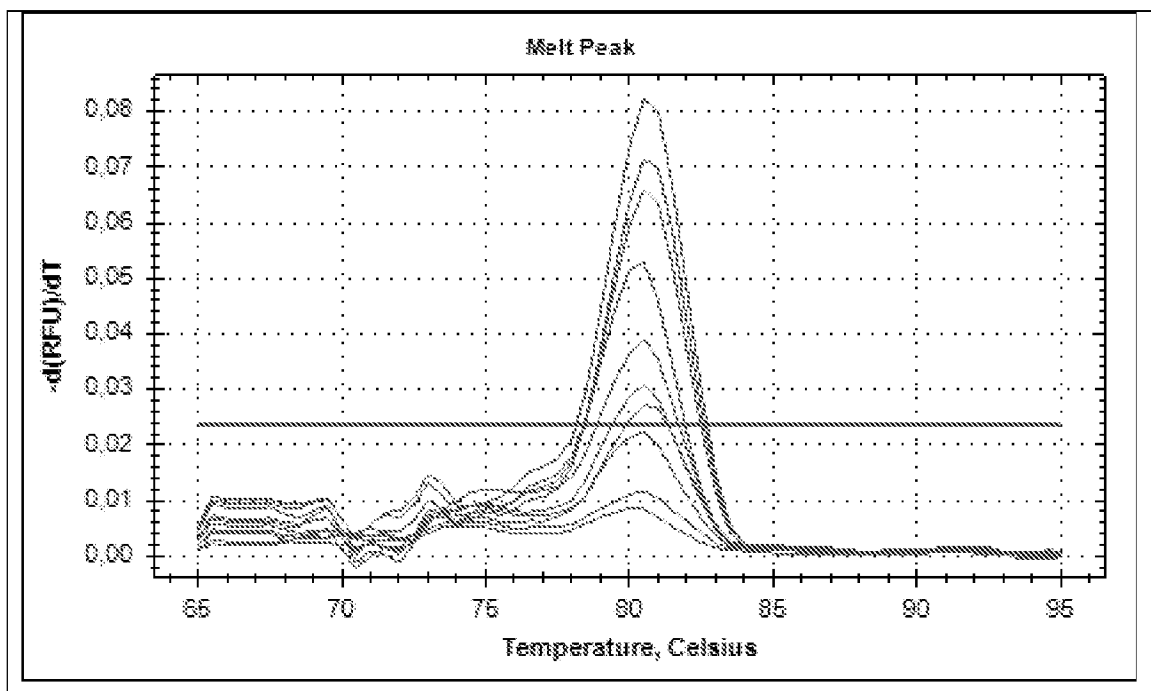


Figura 2

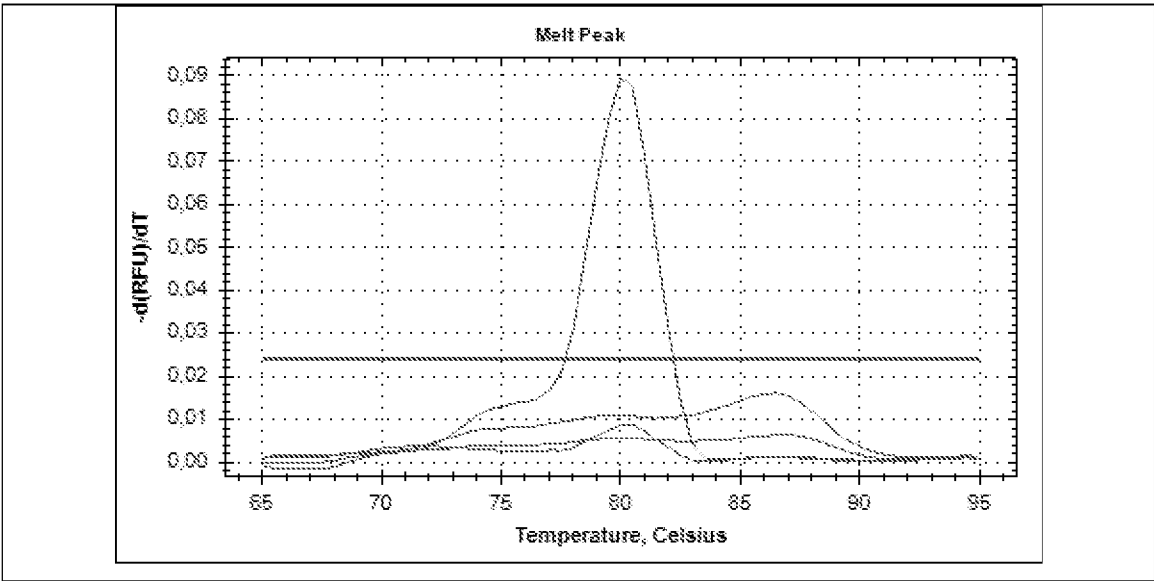


Figura 3

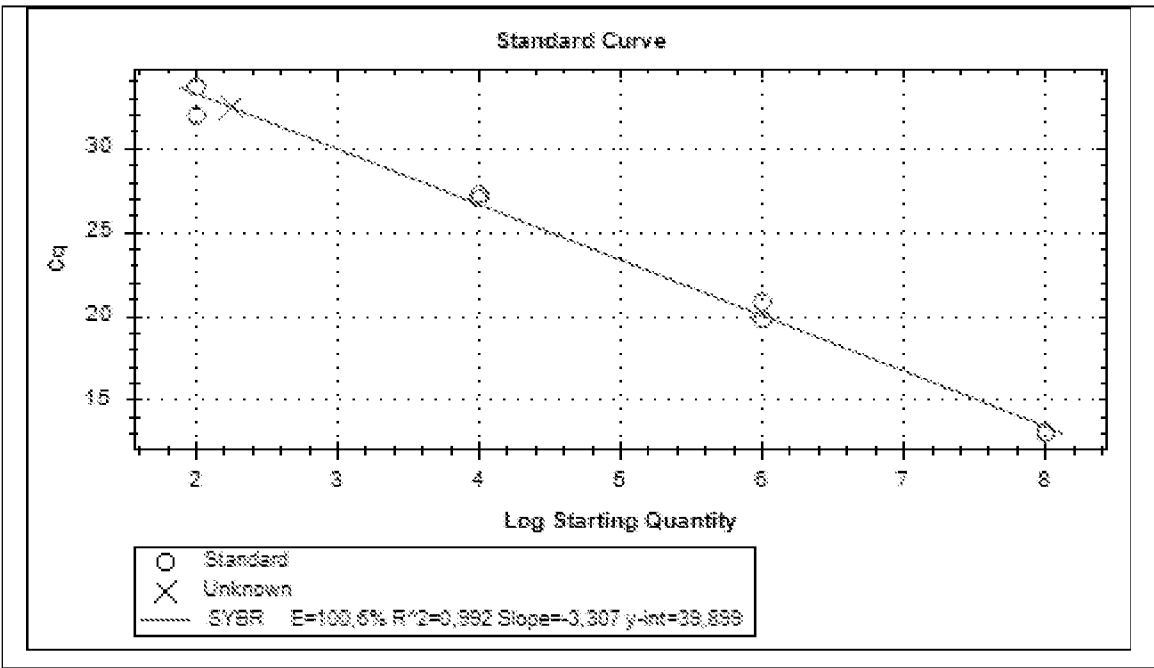


Figura 4

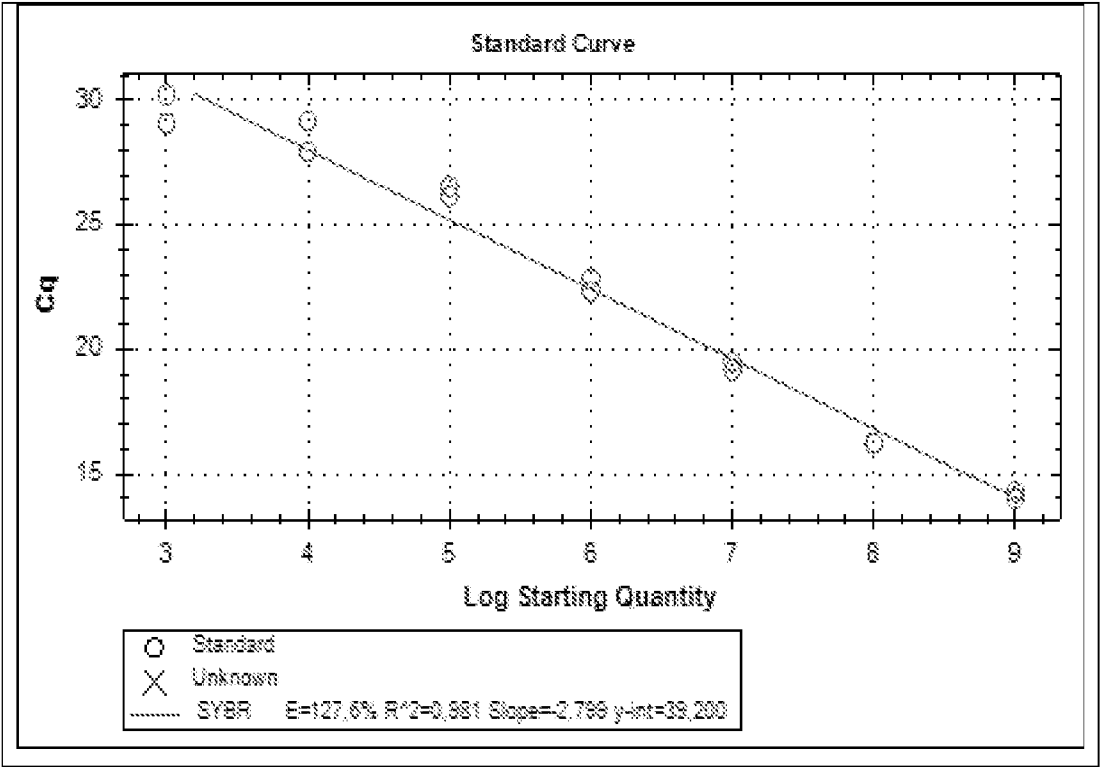


Figura 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2017/070293

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q1/68 (2006.01)

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q

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

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

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, EBI, USPTO PATENT DATABASE, GOOGLE PATENTS.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 104357570 A (FW FISHERIES RES CT CAFS) 18/02/2015, abstract from DataBase WPI. Retrieved from EPOQUE the 13/07/2016; AN: 2015-22901A.	1-12
A	WO 9311263 A1 (GANNON, BERNARD, FRANCIS, XAVIER [IE/IE]) 10/06/1993, page 2, line 4 – page 4, line 21.	1-12
A	JPH 03280882 A (FUJISAWA PHARMACEUTICAL CO) 11/12/1991, abstract from DataBase WPI. Retrieved from EPOQUE the 13/07/2016; AN: 1992-035928.	1-12

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"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)	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
06/06/2017

Date of mailing of the international search report
(07/06/2017)

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer
M. García Grávalos

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Facsimile No.: 91 349 53 04

Telephone No. 91 3493404

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2017/070293

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed:
☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

Information on patent family members

PCT/ES2017/070293

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
CN104357570 A	18.02.2015	CN104357570B B	28.09.2016
-----	-----	-----	-----
WO9311263 A1	10.06.1993	NO942081 A	03.06.1994
		EP0618982 A1	12.10.1994
		EP0618982 B1	13.03.1996
-----	-----	-----	-----
JPH03280882 A	11.12.1991	JP2903611B B2	07.06.1999
-----	-----	-----	-----

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ES2017/070293

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD **C12Q1/68** (2006.01)

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

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)
C12Q

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

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)
INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, EBI, USPTO PATENT DATABASE, GOOGLE PATENTS.

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	CN 104357570 A (FW FISHERIES RES CT CAFS) 18/02/2015, resumen de la base de datos WPI. Recuperado de EPOQUE el 13/07/2016; AN: 2015-22901A.	1-12
A	WO 9311263 A1 (GANNON, BERNARD, FRANCIS, XAVIER [IE/IE]) 10/06/1993, página 2, línea 4 – página 4, línea 21.	1-12
A	JPH 03280882 A (FUJISAWA PHARMACEUTICAL CO) 11/12/1991, resumen de la base de datos WPI. Recuperado de EPOQUE el 13/07/2016; AN: 1992-035928.	1-12

☐ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos ☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"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.
06/06/2017

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
07 de junio de 2017 (07/06/2017)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado
M. García Grávalos
Nº de teléfono 91 3493404

Recuadro I Secuencia(s) de nucleótidos y/o de aminoácidos (continuación del punto 1.c de la primera hoja)

1. Con respecto a **las listas de secuencias de nucleótidos y/o de aminoácidos** divulgadas en la solicitud internacional y necesarias para la invención reivindicada, la búsqueda se ha llevado a cabo sobre la base de una lista de secuencias:
 - a. ☒ que forma parte de la solicitud internacional tal y como se presentó:
 - ☒ en formato de archivo de texto según Anexo C/ST.25.
 - ☐ en formato papel o en formato de archivo de imagen.
 - b. ☐ presentada junto con la solicitud internacional de acuerdo a la Regla 13.ter.1a) del PCT exclusivamente a los fines de la búsqueda, en formato de archivo de texto según Anexo C/ST.25.
 - c. ☐ Presentada con posterioridad a la fecha de presentación únicamente a los fines de la búsqueda internacional:
 - ☐ en formato de archivo de texto según Anexo C/ST.25 (Regla 13ter.1a)).
 - ☐ en formato papel o en formato de archivo de imagen (Regla 13ter.1b) e Instrucciones Administrativas, sección 713).
2. ☐ Además, en caso de que se haya presentado más de una versión o copia de una lista de secuencias se ha entregado la declaración requerida de que la información contenida en las copias subsiguientes o adicionales es idéntica a la que formaba parte de la solicitud tal y como se presentó o no va más allá de lo presentado inicialmente.
3. Comentarios adicionales:

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº

PCT/ES2017/070293

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
CN104357570 A	18.02.2015	CN104357570B B	28.09.2016
-----	-----	-----	-----
WO9311263 A1	10.06.1993	NO942081 A	03.06.1994
		EP0618982 A1	12.10.1994
		EP0618982 B1	13.03.1996
-----	-----	-----	-----
JPH03280882 A	11.12.1991	JP2903611B B2	07.06.1999
-----	-----	-----	-----