



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



①① Número de publicación: **2 169 966**

②① Número de solicitud: 009901804

⑤① Int. Cl.⁷: C12Q 1/68

①②

PATENTE DE INVENCION

B1

②② Fecha de presentación: **03.08.1999**

④③ Fecha de publicación de la solicitud: **16.07.2002**

Fecha de concesión: **03.10.2003**

④⑤ Fecha de anuncio de la concesión: **01.11.2003**

④⑤ Fecha de publicación del folleto de patente:
01.11.2003

⑦③ Titular/es: **Universidad de Granada
Acera de San Ildefonso, 42
18071 Granada, ES**

⑦② Inventor/es: **Martín Sánchez, Joaquina y
Morillas Márquez, Francisco**

⑦④ Agente: **No consta**

⑤④ Título: **Kit para diagnóstico específico de las leishmaniosis causadas por "Leishmania infantum" por la técnica de PCR-ELISA.**

⑤⑦ Resumen:

Kit para diagnóstico específico de las leishmaniosis causadas por "Leishmania infantum" por la técnica de PCR-ELISA.

"Leishmania infantum" es el único agente etiológico de las leishmaniosis en España y la mayoría de los países mediterráneos europeos. Hay diversas técnicas usadas de forma habitual para el diagnóstico de las leishmaniosis, que sin embargo plantean una serie de problemas fundamentales, tanto en el diagnóstico de la leishmaniosis humana como de la leishmaniosis canina. El objetivo del "Kit para diagnóstico específico de las leishmaniosis causadas por Leishmania infantum por la técnica de PCR-ELISA" es mejorar la sensibilidad y especificidad de las técnicas de diagnóstico de las leishmaniosis usadas actualmente, superando los problemas planteados por éstas. El kit está basado en la utilización, en una PCR, de unos cebadores (9 y 83) que amplifican un fragmento específico de Leishmania infantum y en una ELISA, de una sonda oligonucleótida interna, marcada con biotina, que hibrida también de forma específica con el fragmento amplificado.

ES 2 169 966 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCION

Kit para diagnóstico específico de las leishmaniosis causadas por *Leishmania infantum* por la técnica de PCR-ELISA.

Objeto de la invención

Mejorar la sensibilidad y especificidad de las técnicas de diagnóstico de las leishmaniosis usadas actualmente, proponiendo unos reactivos y procedimientos utilizables en una técnica de PCR-ELISA. Mediante su utilización se consiguen superar las limitaciones presentadas por las técnicas clásicas de diagnóstico de la leishmaniosis canina (problemas cuando los títulos de anticuerpos anti-leishmania detectados por técnicas serológicas son dudosos), leishmaniosis cutánea humana (problemas por el escaso número de parásitos existentes en las lesiones y por la existencia de formas clínicas atípicas; técnicas serológicas no válidas al no haber producción de anticuerpos) y leishmaniosis visceral humana (técnicas serológicas de uso limitado al haber solo producción de anticuerpos con títulos significativos en aproximadamente un 30% de los casos) (Medrano y cols., 1992. AIDS 6, 1499-1503)

Antecedentes

a) Introducción

Las leishmaniosis son producidas por diversas especies del género *Leishmania* que originan en el hombre diferentes formas clínicas de la enfermedad, con diferente pronóstico, siendo por ello importante la identificación de la especie implicada. En los países del Mediterráneo occidental europeo, incluida España, donde la leishmaniosis cursa de forma endémica, la única especie que existe es *L. infantum*. Los elementos implicados en su ciclo biológico son: el perro que actúa como reservorio doméstico, *Phlebotomus perniciosus* y *P. ariasi* (flebotomos) actúan como vectores; existen además otros reservorios salvajes como el zorro y hospedadores accidentales como la rata. El hombre también puede actuar como hospedador y en él *L. infantum* es responsable de dos formas clínicas distintas, la leishmaniosis cutánea y la leishmaniosis visceral. En el perro produce la leishmaniosis canina.

Hay diversas técnicas bastante específicas y sensibles para el diagnóstico de las leishmaniosis, sin embargo se plantean tres problemas principales: 1. En el diagnóstico de la leishmaniosis canina, 2. En el diagnóstico de la leishmaniosis cutánea humana, y 3. En el diagnóstico de la leishmaniosis visceral en individuos inmunodeprimidos.

Leishmaniosis canina

Son numerosos los trabajos de investigación realizados sobre la leishmaniosis canina (LCA) en los últimos años en los países mediterráneos europeos. Las técnicas de diagnóstico utilizadas, tanto en investigación como por parte de los escasos laboratorios de análisis que ofrecen este servicio, suelen ser técnicas serológicas, en investigación generalmente la inmunofluorescencia indirecta, aunque también existen el enzoinmunoensayo (ELISA), pruebas de aglutinación directa (DAT) y Western blot (Mengistu y cols., 1990. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 84, 359-362; Meredith y cols., 1995. J. Clin. Microbiol., 1742-

1745; Aguilera Martínez y cols., 1992. Veterinaria Militar, 48, 248-251; Fernández-Pérez y cols., 1999. J. Vet. Diagn. Invest, 11, 170-173); existen además algunos kits comerciales de tipo colorimétrico más utilizados en los laboratorios de análisis y clínicas veterinarias por su más fácil utilización.

La inmensa mayoría de las encuestas realizadas por grupos de investigación muestran la alta seroprevalencia de la LCA, con valores medios entre 5 y 8% que alcanzan cotas superiores al 20% en algunas localizaciones, debiendo destacar dos aspectos: a) existencia de un alto porcentaje de perros positivos (serología con título de anticuerpos mayor al umbral) que no presentan signos, o éstos son muy inespecíficos, de enfermedad. b) existencia de un alto porcentaje de perros que presentan serología positiva pero con títulos de anticuerpos por debajo del umbral, por lo que no pueden ser diagnosticados como positivos a LCA (el título umbral en la técnica de IFI es 160). En el primer grupo la gran mayoría terminan desarrollando la enfermedad, sin embargo en el segundo grupo no siempre ocurre esto, produciéndose un alto porcentaje de remisión serológica en los mismos (Acedo y cols., 1997, Vet. Parasitol., 75: 1-8). Los títulos "dudosos" pueden ser debidos a tres causas. 1. Periodo prepatente. 2. Periodo de remisión. 3. Reacción cruzada (Fisa y cols., 1992, Clínica Veterinaria Pequeños Animales, 12: 33-38).

En la práctica diaria de las clínicas veterinarias y de los laboratorios de análisis surgen cuestiones fundamentales, a las que estas técnicas de diagnóstico actualmente utilizadas no pueden responder: a) "Mi perro, con título "dudoso" ¿está o no infectado por *Leishmania infantum*?" b) "Mi perro, que ha estado recibiendo tratamiento específico y ha descendido el título de anticuerpos, ¿está curado de la LCA?"

Leishmaniosis humana

La leishmaniosis humana es conocida en España desde principios de siglo, habiéndose observado que: a) aparecen dos formas clínicas, la cutánea (LCH), también llamada botón de oriente, y la visceral (LVH) o kala-azar. b) *L. infantum* es la especie responsable de ambas formas clínicas, y la única existente en España; la variabilidad isoenzimática (técnica de electroforesis de isoenzimas) de esta especie es muy marcada, especialmente en el sur de España (Martín Sánchez y cols., 1995, Syst. Parasitol. 30: 233-238; Martín Sánchez y cols., 1996, Syst. Parasitol. 33: 177-182), y solo comparable a la detectada en Sicilia (Gramiccia y cols., 1995, FEMS Microbiol. Letters, 128: 33-38). c) Ambas formas clínicas cursan de forma endémica, es decir se produce anualmente un escaso pero constante número de casos, generalmente en comarcas bastante concretas (Albero y cols., 1979. Actas Dermo-Sif. 70, 475-484; Alcalde Alonso y cols., 1989a. Actas Dermo-Sif., 80, 251-254; Alcalde Alonso y cols., 1989b. Actas Dermo-Sif., 80, 255-258; Martín Luengo y Quiles Mora, 1982. Rev. San. Hig. Pub., 56, 699-726). d) los niños han sido los más afectados (Alcalde Alonso y cols., 1989c. Actas Dermo-Sif. 80, 267-272; Muñoz Hoyos y cols., 1983. Ann. Esp. Pediatr. 18, 189-195). e) el

diagnóstico siempre ha presentado no pocas dudas, y al quererse confirmar los datos clínicos en el laboratorio suelen surgir una serie de problemas derivados del escaso número de parásitos normalmente existente en las muestras, principalmente en las procedentes de lesiones cutáneas, así como de la necesidad de utilizar métodos invasivos para la toma de muestras, tales como la biopsia de piel (en la LCH) y la punción de médula ósea (en la LVH). La demostración de los amastigotes de *Leishmania* en las muestras de tejidos, o su aislamiento en cultivo consumen bastante tiempo y requieren de personal experimentado. f) en los últimos años se han producido y observado importantes cambios, como la detección de casos de leishmaniosis cutánea con presentación clínica netamente diferente a la del clásico botón de Oriente (Delgado y cols., 1984, Laboratorio, 77: 189-201; Sánchez Vizcaíno y cols., 1993, Actas Dermo-Sifilográficas, 84: 165-67) y la existencia de un alto porcentaje de individuos HIV+ coinfectados por *L. infantum* (5-17%), individuos a los que por su condición normalmente inmunodeprimida no se les puede aplicar técnicas serológicas para el diagnóstico debido a ausencia o escasez de producción de anticuerpos (Medrano y cols., 1992, AIDS, 6, 1499-1503; Alvar y cols., 1996, Clin. Dermatol., 14, 541-546). g) Se ha observado que aproximadamente un 50% de los frotis sanguíneos (sangre periférica) teñidos con giemsa, de pacientes coinfectados por *Leishmania* y el, HIV, muestran macrófagos parasitados por este protozoo; sin embargo, debido a la baja parasitemia su eficiencia como método diagnóstico no ha sido evaluada. La realización de una leucoconcentración seguida de cultivo proporciona un 67% de resultados positivos (Alvar y cols., 1996, Clin. Dermatol., 14, 541-546; López-Vélez y cols., 1995, J. Clin. Microbiol., 33, 937-939).

En los últimos años se está produciendo el desarrollo de varias técnicas de biología molecular, especialmente la Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR, que están siendo utilizadas para mejorar el diagnóstico de determinadas enfermedades infecciosas (SIDA, tuberculosis, mycoplasmosis...) con la ventaja de su mayor sensibilidad y especificidad, derivadas del mismo fundamento de la técnica y del hecho de tratarse de técnicas de diagnóstico directo. Por otro lado, la combinación de la técnica de PCR con una ELISA para detección del producto amplificado por la primera permite incrementar la sensibilidad y especificidad de la misma, demostrándose como una de las mejores técnicas de diagnóstico existentes en el momento actual.

Mediante el diseño y desarrollo de unos cebadores que permitan, en una PCR, la amplificación específica de *L. infantum*, y de una sonda oligonucleotida, igualmente específica, para la posterior detección del producto amplificado con una ELISA, se consigue: 1. La realización de un diagnóstico directo de la leishmaniosis canina, aplicable especialmente en aquellos casos en los que las técnicas serológicas resultan insatisfactorias y proporcionan resultados dudosos, así como en la evaluación de la efectividad del tratamiento recibido. 2. El diagnóstico de casos de leishmaniosis cutánea humana, incluidas las formas

clínicas atípicas, usando como muestra el material exudado o el procedente de raspado, sin necesidad de realizar una biopsia. 3. El diagnóstico de los casos de coinfección HIV-*L. infantum* a partir de muestras de sangre, sin necesidad de practicar una punción de médula ósea. Todo ello con una sensibilidad que permite detectar el ADN equivalente a menos de un parásito y con la especificidad que proporcionan unos cebadores que solo amplifican el ADN de *L. infantum* seguido de una hibridación con una sonda oligonucleotida especialmente diseñada para hibridar con el fragmento amplificado.

b. Estado de la técnica

La Reacción en Cadena de la Polimerasa / Enzimo Inmuno Análisis (PCR/ELISA) es una técnica mediante la que el ADN es amplificado por la PCR con el fin de producir grandes cantidades de un producto de ADN específico que va a ser luego detectado por el método ELISA, también de forma específica. Las cualidades de la técnica de PCR/ELISA son bien conocidas por los iniciados en el tema. El proceso de la PCR está cubierto por patentes cuyos propietarios son Hoffman-La Roche, Inc., pudiendo conseguirse información sobre las licencias de "Perkin-Elmer Corporation" o bien de "Roche Molecular Systems, Inc".

Existen al menos 18 patentes registradas (esp@cenet, patentes mundiales) que responden a la pregunta "PCR and ELISA" en el "title or abstract", algunas de ellas se refieren a la detección de agentes infecciosos como el papilloma virus, HIV o *Listeria* (US5888724, WO9823771, DE 4318450). No existe ninguna invención para detección por PCR-ELISA de *Leishmania*. No existe tampoco ninguna patente registrada que responda a la pregunta "PCR and LEISHMANIA".

En lo que se refiere a publicaciones en revistas especializadas, la técnica de PCR ha despertado, desde su desarrollo en 1987, un gran interés entre los investigadores, y ha sido ampliamente utilizada en biomedicina. Sin duda, entre sus más importantes aplicaciones está su uso en el diagnóstico de enfermedades infecciosas, al que beneficia de su gran sensibilidad y especificidad. También las parasitosis, como enfermedades infecciosas, se han visto involucradas en estas investigaciones, de forma que abundan los artículos que hacen referencia, con mayor o menor acierto, a la descripción, puesta a punto, o utilización de una técnica de PCR para detección específica de algún parásito. A continuación se citan algunos ejemplos.

**Barker, R.H., Banchongaksorn, T., Courval, J.M., Suwonikerd, W., Rimwungtra-
goon K., and Wirth, D.F. 1992.** *A simple method to detect Plasmodium falciparum directly from blood samples using the polymerase chain reaction.* Am. J. Trop. Med. Hyg., 46 (4), 416-426.

Gale, K.R., Dimmock, C.M., Gartside, M., and Leatch, G. 1996. *Anaplasma marginase: Detection of carrier cattle by PCR-ELISA.* Int. J. Parasitol., 26, 1103-1109.

Khoo, A., Furuta, T., Abdullah, N.R., Bah, N. A., Kojima, S., and Wah, M.J. 1996. *Nested polymerase chain reaction for detection*

of *Plasmodium falciparum* infection in Malaysia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 90, 40-41.

Morgan, U.M., O'Brien, P.A and Thompson, A. 1996. The development of diagnostic PCR primers for *Cryptosporidium* using RAPD-PCR. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 77, 103-108.

Tahar, R., Ringwald, P. and Basco L.K. 1997. Diagnosis of *Plasmodium malariae* infection by the polymerase chain reaction. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 91, 410-411.

Los artículos que hacen referencia a la detección por PCR de *Leishmania* son también numerosos, algunos de ellos hacen uso de una PCR-ELISA. Las secuencias blanco utilizadas son muy variadas, así como las especificidades. Algunos ejemplos son los siguientes:

Adhya, S., Chatterjee, M., Hassan, M.Q., Mukherjee, S., and Sen, S. 1995. Detection of *Leishmania* in the blood of early kala-azar patients with the aid of the polymerase chain reaction. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 89, 622-624.

Andresen, K., Gaafar, A., El-Hassan, A.M., Ismail, A., Dafalla, M. Theander, T.G., and Kharazmi, A. 1996. Evaluation of the polymerase chain reaction in the diagnosis of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major*: a comparison with direct microscopy of smears and sections from lesions. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 90, 133-135.

Ashford, D.A., Bozza, M., Freire, M., Miranda, J.C., Sherlock, I., Eulalio, C., Lopes, U., Fernandes, O., Degraeve, W., Barker, R.H., Badaro, R., and David, J.R. 1995. Comparison of the polymerase chain reaction and serology for the detection of canine visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 53, 251-255.

Eisenberger, C.L. and Jaffe, C.L. 1999. *Leishmania: Identification of Old World species using a permissively primed intergenic polymorphic-polymerase chain reaction.* *Exp. Parasitol.*, 91, 70-77.

El-Hassan, A.M., Zijlstra, E.E., Meredith, S.E.O., Ghalib, H.W., and Ismail, A. 1993. Identification of *Leishmania donovani* using a polymerase chain reaction in patient and animal material obtained from an area of endemic kala-azar in the Sudan. *Acta Tropica*, 44, 187-190.

Fu, G., Perona-Wright, G., and Barker, D.C. 1998. *Leishmania braziliensis*: Characterisation of a complex specific subtelomeric repeat sequence and its use in the detection of parasites. *Exp. Parasitol.*, 90, 236-243.

Guevara, P., Rojas, E., Gonzalez, N., Scorza, J. V., Añez, N., Valera, M., and Ramirez, J.L. 1994. Presence of *Leishmania braziliensis* in blood samples from cured patients or at different stages of immunotherapy. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 385-389.

Katakura, K., Kawazu, S., Naya, T., Nakagura, K., Ito, M., Aikawa, M., Qu, J.Q., Guan, L. R., Zuo, X. P., Chai, J.J., Chang, K.P., and Matsumoto, Y. 1998. Diagnosis of kala-azar by nested-PCR based on amplification of the *Leishmania mini-exon* gene. *J. Clin. Microbiol.*, 36, 2173-2177.

Laskay, T., Mikó, T.L., Negresse, Y., Solbach, W., Rollingshoff, M., and Frommel, D. 1995. Detection of cutaneous *Leishmania* infection in paraffin embedded skin biopsies using the polymerase chain reaction. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 89, 273-275.

López, M., Inga, R., Cangalaya, M., Echevarria, J., Llanos-Cuentas, A., Orrego, C., and Arevalo, J. 1993. Diagnosis of *Leishmania* using the polymerase chain reaction: A simplified procedure for field work. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 49, 348-356.

Mathis, A., and Deplazes, P. 1995. PCR and in vitro cultivation for detection of *Leishmania* spp in diagnostic samples from humans and dogs. *J. Clin. Microbiol.*, 1145-1149.

Noyes, H.A., Reyburn, H., Bailey, J.W. and Smith, D. 1998. A nested-PCR based schizodeme method for identifying *Leishmania* kinetoplast minicircle classes directly from clinical samples and its application to the study of the epidemiology of *Leishmania tropica* in Pakistan. *J. Clin. Microbiol.*, 36, 2877-2881.

Osman, O.F., Kager, P.A., Zijlstra, E.E., El-Hassan, A.M., and Oskam, L. 1997. Use of PCR on lymph-node sample as test of cure of visceral leishmaniasis. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 91, 845-850.

Osman, O.F., Oskam, L., Kroon, N.C., Schoone, G.J., Khalil, E.T., El-Hassan, A.M., Zijlstra, E.E., and Kager, P.A. 1998. Use of PCR for diagnosis of post-kala-azar dermal leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.*, 36, 1621-1624.

Osman, O.F., Oskam, L., Zijlstra, E.E., El-Hassan, A.M., el-Naeim, D.A., and Kager, P.A. 1998. Use of the polymerase chain reaction to assess the success of visceral leishmaniasis treatment. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 92, 397-400.

Piarroux, R., Gambarelli, F., Dumon, H., Fontes, M., Dunan, S., Mary, C., Toga, B., and Quilici M. 1994. Comparison of PCR with direct examination of bone marrow aspiration, myeloculture and serology for diagnosis of visceral leishmaniasis in immunocompromised patients. *J. Clin. Microbiol.*, 746-749.

Qiao, Z., Miles, M.A., and Wilson, S.M. 1995. Detection of parasites of the *Leishmania donovani* - complex by a polymerase chain reaction - solution hybridization enzyme - linked immunoassay (PCR-SHELA). *Parasitology*, 110, 269-275.

Ravel, S., Cuny, G., Reynes, J., and Veas, F. 1995. A highly sensitive and rapid procedure for direct PCR detection of *Leishmania infantum* within human peripheral blood mononuclear cells. *Acta Tropica*, 59, 187-196.

Schubach, A., Haddad, F., Oliveira-Neto, M.P., Degraeve, W., Pirmez, C., Grimaldi, G. Jr. and Fernandez O. 1998. Detection of *Leishmania* DNA by polymerase chain reaction in scars of treated human patients. *J. Infect. Dis.*, 178, 911-914.

Uezato, H., Hagiwara, K., Hosokawa, A., Maruno, M., Nonaka, S., Oshiro, M., Nakashima, Y., Furuya, M., and Hashiguchi, Y. 1998. Comparative studies of the detection rates of *Leishmania* parasites from formalin, ethanol-

fixed, frozen human skin specimens by polymerase chain reaction and southern blotting. J. Dermatol., 25, 623-631.

Explicación de la invención

Esta invención proporciona un método de detección de *Leishmania infantum* en muestras procedentes de hombre y perro en las que se sospeche, o quiera descartar, una infección por este protozoo parásito.

Comprende: 1) una pareja de cebadores oligonucleótidos de cadena sencilla, capaces de hibridar específicamente con el ADN de *L. infantum*. 2) unas condiciones de amplificación del fragmento de doble cadena, flanqueado por los cebadores. 3) Una sonda oligonucleótida de cadena sencilla, marcada con biotina, que hibrida específicamente con el fragmento de ADN amplificado. 4) unas condiciones de temperatura de hibridación que proporcionan una astringencia adecuada. 5) unos valores de densidad óptica (DO) indicativos de la presencia de *L. infantum* en la muestra.

Esta invención puede ser utilizada con cualquier tipo de muestra humana o canina en la que se sospeche la presencia del parásito, siendo posible la utilización de sangre periférica cuando se sospeche o quiera descartar una leishmaniosis visceral humana o una leishmaniosis canina, y de muestras de raspados o líquidos exudados en posibles casos de leishmaniosis cutánea humana.

El método está basado en la amplificación mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y la detección por un ensayo inmunoenzimático (ELISA), usando una pareja de cebadores y una sonda oligonucleótida que amplifican y detectan específicamente a *L. infantum*.

La sensibilidad del método permite la utilización de 500-2.000 μ l de sangre periférica, o del material raspado o exudado de una lesión cutánea, como muestras, sin necesidad de practicar métodos más invasivos de toma de las mismas, como suponen la punción de médula ósea o la biopsia, muestras que también pueden ser utilizadas con este método.

La muestra es tratada para recuperación del ADN genómico, lo cual se puede hacer por cualquiera de los numerosos métodos conocidos. Si la muestra consiste en 1000-2000 μ l de sangre se recomienda realizar una leucoconcentración.

Los oligonucleótidos, usados como cebadores en la PCR o como sonda en la ELISA, han sido sintetizados químicamente, usando un sintetizador automático, y purificados por HPSF. La sonda ha sido marcada con biotina en posición 5'. La secuencia blanco es un fragmento del ADN del kinetoplasto de *L. infantum* (nº de acceso S493901).

Se han probado diferentes concentraciones de $MgCl_2$, de dNTP y de cebadores, así como diferentes marcas comerciales de Taq polimerasa y sus diferentes tampones, siendo las concentraciones óptimas: 1,5 mM de $MgCl_2$, 200 μ M de dNTP y 25 pmoles de cada cebador. Las distintas Taq polimerasas utilizadas han proporcionado resultados equivalentes. Finalmente, y para minimizar los gastos, el volumen de reacción utilizado es de 25 μ l.

Se han probado distintas temperaturas de

“annealing”, cada vez más próximas a la T_m (thermal melting point) de los cebadores, hasta finalmente fijar la temperatura óptima en 60°C. Se han optimizado los tiempos procediendo a reducirlos el máximo posible.

La detección del producto amplificado por la PCR ha sido realizada, en un primer momento, por electroforesis en gel de agarosa al 2-3%, comprobándose que frecuentemente se trataba de productos múltiples, con pesos moleculares de 75, 124, 200, 504 y valores mayores. El producto de 75 y/o 124 han sido amplificados en todos los casos en los que *L. infantum* estaba presente; estos dos fragmentos han sido secuenciados con un método semiautomático para confirmación de la especificidad. También se ha realizado southern-blot e hibridación de los filtros usando diferentes sondas marcadas con digoxigenina: a) ADN genómico de *L. infantum*, b) fragmento de 75bp, c) fragmento de 124bp, y d) fragmento de 200bp. Los resultados de la secuenciación, southern, e hibridación demuestran que la secuencia del fragmento de 75bp está contenida en todos los demás fragmentos, cuya amplificación queda justificada por la hibridación repetida de uno de los cebadores con la secuencia del minicírculo.

Para la optimización del proceso de detección del producto amplificado mediante ELISA se han probado distintas temperaturas de hibridación siendo elegida la que proporcionaba los mejores resultados con la máxima astringencia (50°C). También se ha comprobado que se consiguen los mejores resultados con un tiempo de hibridación de 3 horas, no siendo aconsejable la hibridación o/n (over/night).

La PCR-ELISA ha sido aplicada a 33 cepas de *L. infantum* pertenecientes a 18 zimodemos distintos, y todas ellas han proporcionado resultados positivos. La sensibilidad ha sido tal que ha permitido detectar 5 fentogramos de ADN genómico. No se ha encontrado en la literatura sobre el tema ninguna PCR que se haya probado frente a una variedad tan grande de cepas del parásito. El mismo método ha sido aplicado usando el ADN de *L. donovani*, *L. major*, *L. tropica*, *L. mexicana*, *Trypanosoma cruzi* Y, *T. tulahuen*, además de ADN humano y canino, obteniendo en estos casos resultados negativos, y confirmándose, de esta forma, la especificidad del método para detectar *L. infantum*. Cuando el método ha sido aplicado usando una suspensión de promastigotes de *L. infantum*, la sensibilidad del mismo ha sido tal que ha permitido la detección de 0,01 promastigotes.

Se ha comprobado el efecto de un exceso de ADN del hospedador sobre la sensibilidad del método, mezclando cantidades crecientes de ADN humano y canino con el de *L. infantum* sin detectar inhibición en las mezclas realizadas, y obteniendo resultados positivos con 1 promastigote mezclado con 20 ng de ADN del hospedador (mezclas con cantidades superiores de ADN del hospedador no realizadas).

La PCR-ELISA ha sido aplicada a 70 muestras de origen canino, procedentes de 31 perros (ver Tabla 1) y 8 de origen humano procedentes de 8 individuos (ver Tablas 2 y 3), habiéndose realizado de forma simultánea otras pruebas diagnósticas como el cultivo y/o obser-

vación al microscopio óptico de preparaciones teñidas con Giemsa en las muestras humanas, e IFI y cultivo en las muestras de origen canino. Todas las muestras humanas procedían de casos sospechosos de LVH o LCH. Las muestras caninas fueron obtenidas de perros a los que se iba a practicar la eutanasia en la Sociedad Protectora de Animales "Francisco de Asís" de Granada, con y sin síntomas inespecíficos (delgadez, onicogrifosis, lesiones cutáneas etc...). La sensibilidad de la técnica de PCR-ELISA ha sido superior en todos los casos a la de las demás técnicas diagnosticas utilizadas. Todas las muestras positivas por alguna de las técnicas diagnosticas clásicas han resultado positivas por PCR-ELISA. Se demuestra que con este método es posible utilizar la sangre periférica como muestra para diagnóstico de leishmaniosis visceral humana (en coinfección con el HIV) y leishmaniosis canina, así como el material de raspado y/o exudado de lesiones cutáneas en la LCH. Se demuestra que la técnica de inmunofluorescencia indirecta, con un título umbral de 160, resulta insuficiente para el diagnóstico de la leishmaniosis canina, recomendándose el uso de este método basado en la PCR/ELISA cuando los títulos sean inferiores a 160.

Descripción de la invención

Hemos escogido como secuencia blanco, para la amplificación por PCR, un fragmento de ADN del kinetoplasto de *Leishmania infantum* que, usado como sonda en experimentos de hibridación, se había mostrado diagnóstico de esta especie (nº acceso a la secuencia: S49390) (Gramiccia y cols., 1992. A kinetoplast DNA probe diagnostic for *Leishmania infantum*. Parasitology 105, 29-34; Martín Sánchez y cols., 1998. Research and Reviews in Parasitology 58, 91-94).

En base a la secuencia de esta sonda, hemos seleccionado y ensayado para amplificación específica del ADN de *L. infantum*, diversas parejas de cebadores. La pareja finalmente retenida tiene las siguientes secuencias y características:

Cebador o "primer" 9 (forward primer): SEQ ID NO: 1, Tm= 63,6, %GC= 55,0.

Cebador o "primer" 83 (reverse primer): SEQ ID NO: 2, Tm= 63,0, %GC= 54,5 Características del producto amplificado y secuencia del mismo flanqueada por los cebadores (el producto amplificado a partir de varias cepas distintas del parásito ha sido secuenciado y su secuencia alineada y comparada con la de la sonda original, así como con las secuencias de las bases de datos del GenEMBL).

Longitud del producto amplificado: 75; %GC = 49,3; Tm = 71,1.

La secuencia de este fragmento de 75bp está contenida en todos los demás fragmentos de 121, 124, 200, 504 y otros mayores, que en ocasiones son amplificados. Esto se ha podido comprobar por secuenciación del primero, y mediante southern-hibridación en los demás casos. La amplificación de estos fragmentos se justifica por la hibridación repetida del cebador 9 con la secuencia del minicírculo del ADN del kinetoplasto.

La amplificación por PCR es realizada bajo las siguientes condiciones: a) Un primer ciclo de desnaturalización, a 94°C durante 3 minutos. b) 40 ciclos de 94°C durante 30 segundos de desnatu-

ralización, 60°C durante 30 segundos de "annealing" y 72°C durante 30 segundos de extensión, cada uno. c) una extensión final a 72°C durante 2 minutos.

La reacción de amplificación tiene la siguiente composición, siendo realizada en un volumen final de 25 µl: 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs, 12,5 pmoles del cebador 9, 12,5 pmoles del cebador 83, 0,5 µl de la muestra problema y 0,6 U de Taq polimerasa.

Análisis por electroforesis: Los productos amplificados han sido analizados por electroforesis en gel de agarosa al 3% en TBE (Tampón Tris-Borato-EDTA) con 0,2 mg/ml de bromuro de etidio.

ELISA: Para la detección del producto amplificado mediante una ELISA es necesario utilizar en la amplificación por PCR una mezcla de dNTPs que además de los componentes habituales dATP, dCTP, dGTP y dTTP, contiene DIG-dUTP. Hemos utilizado la mezcla proporcionada por Boehringer Mannheim, "PCR DIG labeling mix", que contiene 2 mM de dATP, dCTP, dGTP, 1,9 mM de dTTP y 0,1 mM de DIG-dUTP. El resto de los componentes y las condiciones de amplificación se mantienen invariables.

Las características y composición de bases de la sonda oligonucleótida son SEQ ID NO: 3; Tm= 53,7; %GC= 50, y marcada con biotina en posición 5'. La temperatura de hibridación óptima es de 50°C, siendo el tiempo de hibridación de 3 horas. Se deberá evitar superar este tiempo de hibridación mas de 5 horas. La cantidad de sonda utilizada por reacción es de 1,6 pmoles.

Hemos utilizado el kit "PCR ELISA (DIG Detection) de Boehringer Mannheim, Cat. No. 1 636 111, siguiendo las recomendaciones proporcionadas por el mismo, con las siguientes particularidades: a) Utilizamos los 25 µl de amplificado por muestra. b) Los lavados post-hibridación y los lavados tras la reacción antígeno-anticuerpo se han realizado en número de tres con una duración de 5 minutos cada uno. c) La incubación, a 37°C, con el sustrato ABTS, se ha realizado durante 40 minutos, periodo tras el cual se ha efectuado la lectura de la densidad óptica (DO) a 405 y 495 nm, utilizando como "blanco" la solución ABTS. Los valores de DO obtenidos a 495 nm han sido substraidos de los valores de DO a 405 nm para minimizar el error debido al color que pudieran tener los reactivos.

Consideramos un resultado POSITIVO cuando el valor de DO resultante es mayor o igual a 1. Se recomienda repetir la PCR - ELISA usando 1 µl de muestra cuando la DO resultante sea mayor de 0,5. El valor medio de la DO para muestras que solo contienen ADN del hospedador ha sido 0,1. El valor medio de la DO del control blanco de la PCR (PCR sin ADN) ha sido 0,04.

Manera de realizar la invención

1.) Toma de muestras

A) *LCH:* Se desinfecta con alcohol de 70° y gasa estéril, y presionando la lesión entre los dedos índice y pulgar para evitar la salida de sangre, se efectúa un raspado de los bordes de la lesión utilizando un bisturí. El material así recogido (producto raspado y exudado) se coloca en un eppendorff estéril y se congela a -20°C hasta

su tratamiento. Procediendo de la misma forma también se ha realizado el cultivo de parte de este material en medio EMTM y a la preparación de improntas teñidas con Giemsa para utilizarlos como métodos diagnósticos de referencia.

Las biopsias son realizadas, también en el borde de la lesión, por personal médico especializado, utilizando un biopsy punch (Stiefel) de 2 a 3 mm de diámetro. El material es macerado usando un "potter" estéril siendo usado parte de él para cultivo y preparación de improntas, y el resto es congelado hasta su tratamiento.

B) *LVH*: Las muestras han consistido en 500-1500 μ l de sangre periférica, con EDTA como anticoagulante, que han sido congeladas hasta su tratamiento. Como método diagnóstico de referencia se ha realizado la observación al microscopio óptico de frotis teñidos con Giemsa preparados a partir de muestras de médula ósea.

C) *LCA*: Se han utilizado tres tipos de muestras: sangre periférica (1000 -1500 μ l), médula ósea (500-1000 μ l) y material ganglionar (1000-1500 μ l). La sangre se ha obtenido por punción en vena cefálica y se ha utilizado una solución de citrato sódico al 10% como anticoagulante; la punción de médula ósea se ha realizado en la unión osteocondrial, usando una aguja de 1,1 mm de diámetro y con citrato sódico como anticoagulante; el material ganglionar se obtiene por punción en ganglio poplíteo, usando también aguja de 1,1 mm de diámetro. En todos los casos hemos utilizado parte del material recogido para cultivo en medio EMTM, para usarlo como método diagnóstico de referencia. También se ha realizado una inmunofluorescencia indirecta para determinar el título de anticuerpos frente a *Leishmania*.

Las muestras han sido congeladas hasta su tratamiento.

2) *Tratamiento de las muestras para realización de la PCR*

Es posible utilizar cualquier método de extracción del ADN, siendo recomendable el que habitualmente se realice en cada laboratorio. El método con más frecuencia utilizado por nosotros es el siguiente:

Partimos de aproximadamente 500 μ l de muestra (cuando sea posible) que colocamos en un tubo eppendorff estéril. Si se trata de sangre y queremos partir de un volumen mayor se recomienda realizar una leucoconcentración (se puede hacer por simple centrifugado o bien por otros métodos conocidos), de forma que el material de partida estará constituido principalmente por glóbulos blancos.

Añadimos 1000 μ l de un tampón de lisis (0,22%, NaCl, 0,015% de saponina, 0,0372% de EDTA en agua bidestilada. Esterilizar al autoclave) y mezclamos en vortex.

Centrifugamos a 10.000/12.000 rpm durante 3 minutos, y eliminamos el sobrenadante. Repetiremos este paso tantas veces como sea necesario de forma que eliminemos los globulos rojos. En las muestras procedentes de punción ganglionar es suficiente repetir 2 veces.

Resuspender en 500 μ l de tampón 2 (0,01M Tris HCl pH 8, 0,38% KCl, 10 mg proteinasa K/100 ml, 500 μ l de Tween/100 ml, alícuotado

y congelado a -20°C) Incubar a 56°C durante 1 hora.

Extracción

con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico y cloroformo/alcohol isoamílico (este paso, aunque ha sido realizado con frecuencia por nosotros, no es estrictamente necesario, solo cuando se quiera disponer de un ADN limpio).

Precipitación con acetato amónico 8M y etanol absoluto. La mezcla se mantiene media hora a -80°C y después se centrifuga a 10.000-12.000 rpm durante 20 minutos.

Eliminar el sobrenadante por simple volcado del eppendorf y secar sobre papel secante.

Agregar etanol 70% y centrifugar a 10.000-12.000 rpm durante 10 minutos.

Eliminar el sobrenadante por volcado.

Dejar secar completamente el precipitado, lo cual se puede hacer dejándolo en estufa, a 37°C , durante 10 minutos.

Resuspender en 20-60 μ l de agua bidestilada estéril y conservar a -10°C hasta su uso.

3. *Amplificación por PCR*

La amplificación por PCR ha sido normalmente realizada en un termociclador Techne Progene.

El volumen final de la reacción ha sido de 25 μ l, para lo cual en cada tubo de reacción hemos añadido, en este mismo orden: 16,5 μ l de agua estéril, 2,5 μ l de tampón 10X, 1,5 μ l de MgCl_2 25 mM, 2,5 μ l de "PCR DIG labeling mix" (Boehringer Mannheim), 12,5 pmoles (0,5 μ l) del cebador 9, 12,5 pmoles (0,5 μ l) del cebador 83, 0,6 U de Taq polimerasa (0,5 μ l), y por último (y en habitación separada) se ha agregado 0,5 μ l de la muestra problema, previamente descongelada y agitada con vortex durante 30 segundos.

Cada vez que se hacía la prueba se utilizaba:

a) un control de reactivos, usando todos los componentes anteriores excepto el ADN que era sustituido por agua (control blanco de la PCR), b) un control negativo usando 5-10 ng de ADN del hospedador, c) un control positivo usando 6 ng de ADN de *L. infantum*.

4. *ELISA*

Hemos utilizado el kit "PCR ELISA" (DIG Detection) de Boehringer Mannheim, Cat. No. 1 636 111, siguiendo las recomendaciones proporcionadas por el mismo, con algunas particularidades.

Se transfieren los 25 μ l del amplificado a un tubo eppendorf. de 1,5 ml.

Se agregan 20 μ l de la solución desnaturalizante (vial 3)

Mezclar con vortex y centrifugar brevemente.

Incubar durante 10' a temperatura ambiente.

Agregar 205 μ l de la solución de hibridación (2 μ l de una solución de la sonda marcada con biotina preparada con agua bidestilada a concentración de 0,77 pmoles/ μ l, + 198 μ l del tampón de hibridación o vial 4). Agitar con vortex y centrifugar brevemente.

Transferir los 250 μ l de la mezcla anterior a un pocillo cubierto con estreptavidina.

Incubar a 50°C durante 3 horas con agitación continua. Tapar los pocillos para evitar evaporación.

Descartar la solución y lavar 3 veces con

tampón de lavado (preparado con una tableta del vial 5 en 2 litros de agua bidestilada) durante 5 minutos cada vez, a temperatura ambiente y bajo agitación. Atención: la estabilidad del tampón de lavado es inferior a las 6 semanas indicadas por la casa comercial, siendo crítica para la calidad de los resultados.

Agregar 200 μl de una solución con el anticuerpo (antiDIG-POD), preparada de la siguiente manera: a) añadir 250 μl de agua estéril al liofilizado del vial 7. b) mezclar cuidadosamente por 15 minutos. La mezcla es estable durante 2 meses. c) mezclar 2 μl del reconstituido anterior con 198 μl del tampón conjugado o vial 6.

Incubar a 37°C durante 30 minutos, bajo agitación continua.

Descartar la solución y lavar en las mismas condiciones anteriores.

Agregar 200 μl de una solución de ABTS preparada de la siguiente manera: disolver una tableta de ABTS contenida en el vial 9 en 5 ml del tampon sustrato. Nosotros hemos utilizado esta suspensión tanto preparada de forma fresca como tras 3 semanas de su preparación sin observar ninguna diferencia en la calidad de los resultados.

Incubar a 37°C durante 40 minutos bajo agitación continua. La lectura se puede hacer inmediatamente después de esta incubación, siendo posible también su realización al día siguiente pues las coloraciones son estables.

La lectura la hemos realizado en un lector de ELISA "Multiskan Plus P. versión 2.02", en el modo Absorbancia, utilizando filtros de 405 y 492 nm, y usando un pocillo con la solución de ABTS como blanco de lectura.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Kit para diagnóstico específico de las leishmaniosis causadas por *Leishmania infantum* por la técnica de PCR-ELISA **caracterizado** por poseer 8 microtubos de 1,5 ml de capacidad, marcados del 1 al 8, que contienen los siguientes componentes:

Reactivo 1: Solución tampón apropiada para llevar a cabo la reacción de PCR

Reactivo 2: Solución tamponada de desoxirribonucleótidos trifosfato

Reactivo 3: Solución del cebador 9

Reactivo 4: Solución del cebador 83

Reactivo 5: Solución de la enzima Taq polimerasa

Reactivo 6: Agua bidestilada esterilizada

Reactivo 7: ADN purificado de *Leishmania infantum*

Reactivo 8: Solución de la sonda oligonucleótida interna

2. Kit para diagnóstico específico de las leishmaniosis causadas por *Leishmania infantum* por la técnica de PCR-ELISA según reivindicación 1 **caracterizado** porque el reactivo 3 (cebador 9) está compuesto por una solución del oligonucleótido descrito en SEQ ID NO: 1.

3. Kit para diagnóstico específico de las leishmaniosis causadas por *Leishmania infantum* por la técnica de PCR-ELISA según reivindicación 1 **caracterizado** porque el reactivo 4 (cebador 83) está compuesto por una solución del oligonucleótido descrito en SEQ ID NO: 2.

4. Kit para diagnóstico específico de las leishmaniosis causadas por *Leishmania infantum* por la técnica de PCR-ELISA según reivindicación 1 **caracterizado** porque el reactivo 8 (sonda oligonucleótida interna) está compuesto por una solución del oligonucleótido SEQ ID NO:3, marcado con biotina en posición 5'.

5. Método del uso del kit para diagnóstico específico de las leishmaniosis causadas por *Leishmania infantum* por la técnica de PCR-ELISA **caracterizado** porque la reacción se realiza en tres microtubos distintos llamados muestra, positivo y negativo. En el de muestra se añaden de 0,5 a 1 μ l de preparado biológico a analizar junto a los reactivos 1, 2, 3, 4, 5, y 6, en el positivo se sustituye el preparado biológico por el reactivo 7 y en el negativo no se pone ni preparado biológico ni reactivo 7.

6. Método del uso del kit para diagnóstico específico de las leishmaniosis causadas por *Leishmania infantum* por la técnica de PCR-ELISA **caracterizado** porque tras la mezcla de reactivos según la reivindicación 5 se procede a la amplificación del ADN en un termociclador para PCR mediante: a) un primer ciclo de desnaturalización, a 94°C: durante 3 minutos. b) 40 ciclos de 94°C durante 30 segundos de desnaturalización, 60°C durante 30 segundos de "annealing" y 72°C durante 30 segundos de extensión, cada uno. c) una extensión final a 72°C durante 2 minutos.

7. Método del uso del kit para diagnóstico específico de las leishmaniosis causadas por *Leishmania infantum* por la técnica de PCR-ELISA según reivindicaciones 5 y 6 **caracterizado** porque la detección del producto amplificado por PCR se hace mediante una ELISA utilizando una sonda oligonucleótida **caracterizada** en la reivindicación 4 que hibrida de forma específica con el amplificado de *Leishmania infantum*.

8. Método del uso del kit para diagnóstico específico de las leishmaniosis causadas por *Leishmania infantum* por la técnica de PCR-ELISA **caracterizado** porque para la reacción de ELISA se deberá utilizar: 1) 25 μ l del amplificado por PCR, 2) una temperatura de hibridación de 45 a 55°C, 3) un tiempo de hibridación de 1 a 5 horas, 4) 3 lavados post-hibridación de 5 minutos cada uno, 5) 3 lavados post-reacción antígeno-anticuerpo de 5 minutos cada uno, 6) un tiempo de incubación con el sustrato (ABTS) de 40 minutos.

9. Método del uso del kit para diagnóstico específico de las leishmaniosis causadas por *Leishmania infantum* por la técnica de PCR-ELISA según reivindicaciones 5, 6, 7 y 8, **caracterizado** porque la lectura de los resultados se hace en un lector de ELISA, midiendo Absorbancia a 405 y 495 nm, y considerando un resultado POSITIVO cuando el valor de DO resultante de sustraer la absorbancia a 495 de la absorbancia a 405 es mayor o igual a 1 (repetir la PCR-ELISA usando 1 μ l de muestra cuando la DO resultante sea mayor de 0,5). El valor de la DO para muestras que solo contengan ADN del hospedador (muestras negativas) deberá ser próximo a 0,1. El valor de la DO de los controles blanco de la PCR (PCR sin ADN) será próximo a 0,04. El valor de la DO de los controles positivos (ADN de *Leishmania infantum*) estará en torno a 2,8.

55

60

65

ES 2 169 966 A1

LISTAS DE SECUENCIAS

<110> UNIVERSIDAD DE GRANADA

5 <120> Kit para diagnóstico específico de las leishmaniosis causadas por *Leishmania infantum* por la técnica de PCR-ELISA

<140> ES P990184

<141> 1999-03-08

10

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> *Leishmania infantum*

15

<400> 1

caaaagtccc caccaatccc 20

20

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> *Leishmania infantum*

25

<400> 2

aaaccctggt ctggaggctt ag 22

30

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> *Leishmania infantum*

<400> 3

35

ccaacaggg caaaaacc 18

40

45

50

55

60



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.⁷: C12Q 1/68

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	PIÑERO, J. et al. "PCR-ELISA for diagnosis of mucocutaneous leishmaniasis", ACTA TROPICA, 1999, Vol. 73, páginas 21-29. Todo el documento.	1-9
Y	COSTA, J.M. et al. "PCR enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of leishmaniasis in human immunodeficiency virus-infected patients", JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, 1996, páginas 1831-1833. Todo el documento.	1-9
Y	GRAMICCIA, M. et al. "A Kinetoplast DNA probe diagnostic for Leishmania infantum", PARASITOLOGY, 1992, Vol. 105, páginas 29-34. Todo el documento.	1-9
A	EP 0819766 A (SUMITOMO ELECTRIC INDUSTRIES LIMITED) 21.01.1998, todo el documento.	1-9
A	LÓPEZ, M. et al. "Diagnosis of Leishmania using the polymerase chain reaction: A simplified procedure for field work", AM. J. TROP. MED. HYG., 1993, Vol. 49, N° 3, páginas 348-356. Todo el documento.	1-9
A	LE FICHOUX, Y. et al. "Occurrence of Leishmania infantum parasitemia in asymptomatic blood donors living in an area of endemicity in southern France", JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, 1999, Vol. 37, N° 6, páginas 1935-1957. Todo el documento.	1-9
A	RODGERS, M.R. et al. "Amplification of Kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of Leishmania", EXPERIMENTAL PARASITOLOGY, 1990, Vol. 71, páginas 267-275. Todo el documento.	1-9

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n°:

Fecha de realización del informe

10.06.2002

Examinador

J.L. Vizán Arroyo

Página

1/1