



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 220 180**

② Número de solicitud: 200201381

⑤ Int. Cl.7: **C12Q 1/68**

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

② Fecha de presentación: **14.06.2002**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **01.12.2004**

Fecha de la concesión: **25.10.2005**

④ Fecha de anuncio de la concesión: **16.12.2005**

④ Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**16.12.2005**

⑦ Titular/es: **Universidad de Málaga  
Plaza de El Ejido, s/n  
29071 Málaga, ES  
Hospital Regional Carlos Haya**

⑦ Inventor/es: **Colmenero Castillo, Juan de Dios;  
Queipo Ortuño, María Isabel y  
Morata Losa, Pilar**

⑦ Agente: **No consta**

⑤ Título: **Procedimiento de detección de secuencias de ADN específicas de *Brucella spp* mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) acoplada a un enzimoimmunoensayo (ELISA).**

⑦ Resumen:

Procedimiento de detección de secuencias de ADN específicas de *Brucella spp* mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) acoplada a un enzimoimmunoensayo (ELISA).

Procedimiento de detección de secuencias de ADN específicas de *Brucella spp.* mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) acoplada a un enzimoimmunoensayo (ELISA). Después de una amplificación selectiva de una secuencia de 223 pb de *Brucella* utilizando los oligonucleótidos B4 y B5, los productos amplificados resultantes marcados con digoxigenina (DIG) son hibridados con una sonda de captura biotinilada. Posteriormente, estos híbridos son capturados en placas recubiertas con estreptavidina y detectados usando un conjugado anti-DIG Fab/peroxidasa. La técnica propuesta se ha mostrado mucho mas sensible que la PCR convencional y que los métodos bacteriológicos y mas específica que los métodos serológicos habituales, permitiendo su utilización para la puesta en práctica de un procedimiento fácil y rápido de diagnóstico molecular de la infección por *Brucella spp.* en muestras de sangre humana y en otras muestras clínicas, la monitorización de la respuesta al tratamiento y la detección precoz de las recidivas evitando el riesgo de manipulación del germen.

ES 2 220 180 B1

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

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento de detección de secuencias de ADN específicas de *Brucella spp* mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) acoplada a un enzimoimmunoensayo (ELISA).

**Objeto de la invención**

La presente invención se refiere a un procedimiento de detección de *Brucella spp.* y más concretamente para la detección de ADN específico de gérmenes del género *Brucella* en muestras de sangre humana y en otras muestras clínicas. Dicho procedimiento comprende un diagnóstico molecular basado en la amplificación del ADN mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la posterior detección de los productos amplificados marcados con digoxigenina mediante un enzimo-inmunoensayo (PCR-ELISA). La técnica es mucho mas sensible que la PCR convencional y que los métodos bacteriológicos y mas específica que los métodos serológicos habituales, permitiendo su utilización para la puesta en práctica de un procedimiento fácil y rápido de diagnóstico molecular de la infección por *Brucella spp.* en muestras de sangre humana y en otras muestras clínicas.

**Estado de la técnica**

La brucelosis es una zoonosis de distribución mundial que provoca una alta morbilidad en humanos. La enfermedad es endémica en amplias zonas del planeta. En España la incidencia de la brucelosis es muy elevada lo cual genera un elevadísimo coste socio-sanitario. Los gérmenes del género *Brucella* son capaces de sobrevivir e incluso multiplicarse dentro de las células del sistema mononuclear fagocítico lo cual explica la marcada tendencia de la enfermedad a producir complicaciones e incluso recaídas una vez concluido el tratamiento. Algunas de las complicaciones de la brucelosis son muy graves pudiendo conducir a la muerte del paciente. Se ha demostrado que la aparición de complicaciones se relaciona significativamente con una demora en el diagnóstico de la infección (Colmenero, J.D. et al. Medicine (Baltimore). 1996; 75:195-211).

Debido a lo heterogéneo y escasamente específico de su cuadro clínico, actualmente el diagnóstico de la brucelosis requiere siempre una confirmación mediante el aislamiento del germen, o la demostración de anticuerpos específicos mediante diferentes pruebas serológicas. Ambos métodos poseen importantes limitaciones. De los métodos bacteriológicos, el hemocultivo es la muestra clínica mas rentable para el diagnóstico microbiológico. Su sensibilidad oscila entre el 53-90% en los casos de brucelosis aguda producida por *B. melitensis*. Sin embargo esta sensibilidad se reduce considerablemente en los pacientes con cuadros clínicos de larga evolución, en los pacientes con complicaciones focales y las infecciones causadas por *B. abortus* y *B. suis*. Los resultados del hemocultivo son en muchas ocasiones excesivamente lentos. Por otra parte, la manipulación de estos gérmenes supone un alto riesgo para el personal de laboratorio que se ve obligado a manipular para su correcta identificación final cepas vivas, debido a que *Brucella spp* es un patógeno de clase III. Aunque en la actualidad existe una amplia batería de métodos serológicos aplicables al diagnóstico de la brucelosis humana, todos ellos adolecen de importantes limitaciones. Así, su sensibilidad es baja en las fases precoces de la enfermedad, en la cual los niveles de anticuerpos aún pueden ser bajos. Además su especificidad es escasa en zonas de alta endemia, en personas profesionalmente expuestas, en pacientes que han padecido una infección reciente y en las frecuentes recidivas de la enfermedad.

Últimamente se ha demostrado que la amplificación de secuencias específicas de ADN de *Brucella* mediante PCR es un procedimiento mucho mas sensible que los hemocultivos, y que su positividad es una prueba bastante específica de enfermedad activa. Gracias a este método la detección del germen y por tanto de la enfermedad puede realizarse de forma rápida y fácil, independientemente del tiempo de evolución de la infección y de la respuesta serológica que pueda producirse en el paciente. Este método también permite la monitorización del tratamiento y el diagnóstico precoz de las recidivas.

Estas técnicas de amplificación del ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permiten la amplificación exponencial e identificación de un fragmento específico de ADN y se han mostrado muy útiles en el diagnóstico de diversas enfermedades infecciosas producidas por gérmenes de difícil aislamiento con las técnicas bacteriológicas convencionales. Los gérmenes del genero *Brucella* crecen lentamente y requieren ocasionalmente medios y condiciones especiales. Apoyándose en los conocimientos previos sobre la biología molecular de los gérmenes del género *Brucella*, y aplicando las técnicas de amplificación del ADN, nosotros hemos descrito previamente una técnica sensible y específica de PCR en muestras de sangre humana que depara mejores resultados que las técnicas microbiológicas convencionales en el diagnostico, tanto de la infección primaria como de las recidivas, así como en las complicaciones de la enfermedad (nº de registro P 97/02234 y nº publicación 2137124). Sin embargo, la interpretación de los resultados de la PCR convencional a veces es bastante subjetiva, es obligatorio la realización de una electroforesis en geles de agarosa, y la manipulación de productos tóxicos como el bromuro de etidio y en algunas ocasiones hay que realizar una hibridación posterior, (Dot o Southern-Blot) para la interpretación de resultados dudosos. Estas técnicas, consumen excesivo tiempo, y no son susceptibles de ser aplicadas a un alto número de muestras simultaneas, no siendo por ello muy adecuadas para laboratorios generales de diagnóstico clínico. Con el objetivo primordial de evitar estas dificultades, hemos desarrollado y optimizado una técnica de PCR-ELISA, y posteriormente hemos evaluado su rendimiento diagnóstico en muestras de sangre periférica de pacientes con brucelosis.

**Explicación de la invención**

Con el principal objetivo de mejorar la sensibilidad de detección de *Brucella spp.* por PCR convencional (nº de registro P 97/02234 y nº publicación 2137124), la presente invención ha desarrollado y optimizado una hibridación en placa de los productos amplificados empleando un enzimo-inmunoensayo. Teniendo en cuenta la alta sensibilidad de la PCR, y considerando que los inóculos encontrados habitualmente en los pacientes con bacteriemia son muy pequeños, la capacidad de detección de cualquier técnica de PCR aplicada al diagnóstico de la brucelosis debe ser muy alta. Datos previos, han podido demostrar que la PCR convencional es capaz de amplificar 10 fg de ADN bacteriano (cantidad equivalente a dos células bacterianas), sin embargo, a veces para la correcta identificación de las señales de amplificación en geles de agarosa de inóculos tan bajos, es necesario emplear una técnica de hibridación denominada Dot Blot. Por otra parte, las altas concentraciones de ADN humano presentes en las muestras de sangre periférica interfieren en ocasiones la amplificación deseada. La técnica de PCR-ELISA amplifica correctamente 10 fg de ADN, y dicha amplificación no es inhibida por la presencia de altas concentraciones de ADN leucocitario.

En la presente invención se ha desarrollado un simple ensayo PCR-ELISA, utilizando los oligonucleótidos B4 y B5, que generan después de la amplificación un fragmento de 223bp de un gen que codifica la síntesis de una proteína inmunogenica de membrana de 31 kDa específica del género *Brucella* (BCSP31). Los productos amplificados marcados con digoxigenina (DIG), son hibridados con una sonda de captura biotinilada, la cual es complementaria a una región interna del producto amplificado. Los híbridos así obtenidos, son capturados en placas recubiertas con estreptavidina y detectados usando un conjugado anti-DIG Fab/ peroxidasa. De este modo, la técnica propuesta se ha mostrado mucho mas sensible que la PCR convencional desarrollada y patentada (Patente española P9702234) y 1 que los métodos bacteriológicos y mas específica que los métodos serológicos habituales de diagnóstico.

Como valor añadido a la alta sensibilidad y especificidad de la técnica de PCR-ELISA, habría que sumarle las siguientes ventajas que suponen el uso de este procedimiento:

- La detección de los productos 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 como el bromuro de etidio;
- Permite la monitorización de la respuesta al tratamiento y la detección precoz de las recidivas.
- Evita el riesgo de manipulación del germen por el personal de laboratorio;
- Permite el manejo simultáneo de un elevado numero de muestras.
- Susceptible de ser automatizada, lo cual la hace muy atractiva para el uso en cualquier laboratorio clínico.

En resumen, el método de diagnóstico molecular para la detección de *Brucella spp.* en muestras de sangre humana, objeto de la presente invención, comprende los siguientes pasos:

- 1) Extracción y purificación del ADN total de muestras de sangre periférica y otras muestras clínicas de pacientes con brucelosis.
- 2) Amplificación del ADN
- 3) Detección de los productos PCR mediante DIG-ELISA.

**Explicación de la figura**

En la figura 1 se compara la sensibilidad analítica de la Técnica PCR convencional, de la Técnica de hibridación (Dot-Blot) y de la Técnica PCR-ELISA. La figura consta de tres partes (A,B,C)

- A) Sensibilidad analítica de la PCR convencional, en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio.
- B) Hibridación (Dot-Blot.)
- C) Sensibilidad analítica de la PCR-ELISA

En las calles correspondientes se observa lo siguiente:

- Calle MW: marcador de peso molecular
- Calle 1: Control positivo *Brucella melitensis* Rev-1.
- Calle 2: Control negativo en ausencia de ADN en la mezcla de reacción.

## ES 2 220 180 B1

Calles 3-10: Diluciones seriadas desde  $10^8$  fg hasta  $10^1$  fg de ADN procedente de la cepa vacunal *Brucella melitensis* Rev-1. A cada una de estas diluciones se le ha añadido 3,5 microgramos de ADN genómico humano procedente de leucocitos. (Dichas cantidades de ADN se corresponden con  $20 \times 10^7$  hasta 2 células bacterianas respectivamente).

### 5 Descripción detallada del modo de realización de la invención

De acuerdo con la presente invención, se emplea la técnica DIG-PCR-ELISA para la detección de *Brucella* en muestras de sangre humana utilizando la siguiente metodología.

- 10 1) Extracción y purificación del ADN total de muestras de sangre periférica y otras muestras clínicas de pacientes con brucelosis.
- 2) Amplificación del ADN
- 15 3) Detección de los productos PCR mediante DIG-ELISA.

A continuación, como un modo de realización de la invención se describen detalladamente cada uno de estos pasos.

#### Extracción y purificación del ADN

20 El ADN total se extrae a partir de una muestra de sangre periférica, almacenada a  $-20^\circ\text{C}$ . En esta alícuota se encuentra el ADN genómico leucocitario y el bacteriano este último en pequeña concentración. El aislamiento y purificación del mismo es un paso clave en esta metodología ya que la sangre contiene gran cantidad de inhibidores de la reacción de amplificación.

25 Para la realización de la prueba, el ADN total es extraído a partir de muestras de 1ml de sangre periférica recogida en viales con citrato sódico. Dicha sangre es resuspendida en 1ml de tampón de lisis de hematíes (320 mM de sacarosa, 5mM de  $\text{MgCl}_2$ , 1% Tritón X-100 y 10 mM de Tris HCl pH 7,5), mezclada y centrifugada a  $15000 \times g$  durante 5 min. Después de la centrifugación el sobrenadante es eliminado y el pellet de leucocitos es lavado con 1ml de agua milli-Q estéril, centrifugado nuevamente a  $15000 \times g$  durante 2 min. El sobrenadante es eliminado, se añaden  $100 \mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30% wt/wt) y se incuban las muestras de 2-5 min a temperatura ambiente, eliminando posteriormente el exceso de peróxido de hidrogeno con la punta de la pipeta. Cuatrocientos  $\mu\text{l}$  de tampón de lisis nuclear (60 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y 24mM  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$  pH 8), conteniendo proteinasa K (10mg/ml) y SDS 1% son añadidos al pellet y se incuba a  $55^\circ\text{C}$  durante 30 min. Una vez finalizada la incubación, las muestras son enfriadas a temperatura ambiente, y se añaden 35 posteriormente  $100 \mu\text{l}$  de acetato amónico 7.5 M, se centrifugan a  $15.000 \times g$  durante 10 min a temperatura ambiente. Se vierte el sobrenadante en un tubo limpio de 1.5 ml y se añade 1 ml de etanol absoluto frío a  $4^\circ\text{C}$ . Se dejar precipitar el ADN invirtiendo los tubos varias veces y se centrifuga a  $15.000 \times g$  durante 10 min. a temperatura ambiente. Se desecha el sobrenadante y se añaden 0.5 ml de etanol al 70%. Se centrifuga a  $15.000 \times g$  durante 5 min, se desecha el etanol y se elimina el exceso de alcohol con la ayuda de un algodón. Finalmente el ADN es resuspendido en 40 40  $\mu\text{l}$  de agua milli-Q estéril. La concentración y la pureza del ADN es determinada espectrofotométricamente midiendo la absorbancias a longitudes de onda de 260 y 280 nm. Una cantidad comprendida entre 2-4  $\mu\text{g}$  de ADN total (ADN genómico leucocitario y bacteriano, este último en pequeña concentración) extraído y purificado de las muestras sanguíneas como se describe anteriormente es utilizado para la amplificación.

#### 45 Amplificación

Para la identificación de *Brucella spp* se amplificó una región de ADN de 223 pb, del gen que codifica una proteína de la superficie celular de *Brucella abortus* de 31 kDa, que fue clonada y secuenciada por Mayfield. Esta proteína es común a todas las biovariedades de *Brucella*. Como iniciadores de la reacción de amplificación de la secuencia diana, se emplean los siguientes oligonucleótidos:

B<sub>4</sub>: 5' TGG CTC GGT TGC CAA TAT CAA 3' (SEQ. ID: 1).

B<sub>5</sub>: 5' CGC GCT TGC CTT TCA GGT CTG 3' (SEQ. ID: 2).

55 Una cantidad comprendida entre 2-4  $\mu\text{g}$  de ADN extraído y purificado de las muestras como se describe anteriormente es utilizado para la amplificación. La mezcla de reacción se realiza en un volumen final de  $50 \mu\text{l}$  conteniendo [10mM Tris-Cl (pH 8.4), 50 mM KCl, 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$ ],  $200 \mu\text{M}$  de cada desoxirribonucleótido trifosfato (dATP, dCTP, dGTP) mas  $190 \mu\text{M}$  dTTP y  $10 \mu\text{M}$  DIG-11'-dUTP, 200 nM de cada oligonucleótido B4 (SEQ. ID: 1) y B5 (SEQ. ID: 2) y 1,25 U de *Taq* polimerasa. Cien ng de ADN de *B. melitensis* Rev-1 y *B. abortus* B-19 son utilizadas como controles positivos. La reacción es llevada a cabo en un termociclador sin aceite mineral. Las condiciones de amplificación son las siguientes: desnaturalización , durante un minuto a  $90^\circ\text{C}$ , hibridación con los iniciadores 30s a  $60^\circ\text{C}$  y una extensión de 1min a  $72^\circ\text{C}$ , durante 35 ciclos. La PCR es precedida de una fase de incubación de la mezcla reactiva a una temperatura de  $94^\circ\text{C}$  durante 5 min y un periodo de extensión final a  $72^\circ\text{C}$  durante 7 min. En cada reacción de 65 amplificación se incluyen controles positivos y negativos y todas las muestras se procesan por duplicado. El producto resultante de la PCR se analiza mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio (2 mg/ml). El tamaño del fragmento amplificado se estima comparándolo con un marcador de peso molecular analizado en paralelo en el mismo gel. La visualización por fluorescencia de fragmentos de 223 pares de bases demuestra la

## ES 2 220 180 B1

presencia de la secuencia diana de ADN tanto en los controles positivos como en las muestras de los pacientes con brucelosis (ver Figura 1).

5 Los controles negativos que contenían todos los reactivos de la mezcla de reacción excepto el ADN, fueron procesados de forma rutinaria para monitorizar cualquier tipo de posible contaminación con ADN de *Brucella*.

### *Detección de productos PCR mediante DIG-ELISA*

10 La reacción es realizada sobre placas comerciales (Vircell, Santa Fe, Granada), marcadas con estreptavidina a una concentración de 2.5 µg/ml. Dichas placas fueron preparadas por la empresa Vircell en grandes lotes para minimizar las variaciones entre pocillos y envasadas al vacío para su correcto almacenamiento. La reacción es realizada como se detalla a continuación: alícuotas de 40 µl de productos PCR son mezcladas con 80 µl de 1x SSC (0.15 M NaCl, 0.015 M citrato sódico)- 0.5% Tween 20 conteniendo una sonda de 21 nucleótidos complementaria a la región previamente amplificada y marcada en su extremo 5' con biotina: 5' TCA GAC GTT GCC TAT TGG GCC 3' (SEQ. ID: 3).

15 Una etapa de desnaturalización a 94°C durante 15 min y otra de hibridación a 55°C durante 60 min son llevadas a cabo en el termociclador. A continuación alícuotas de 50 µl de mezcla de reacción son añadidas por duplicado a las placas marcadas con estreptavidina e incubadas en una estufa a 37°C durante 30 min. Después de la incubación las placas son lavadas dos veces con 200 µl /pocillo de 0.1 x SSC- 0.1% SDS y otras dos veces con 200 µl /pocillo de  
20 PBS pH 7.2 - 0.05% Tween 20. Posteriormente, 50 µl del conjugado antidigoxigenina Fab/peroxidasa diluido 1:3,500 en un buffer estabilizador son añadidos a cada pocillo y las placas son incubadas nuevamente a 37°C durante 30 min. Después de 4 lavados con 200 µl pocillo de PBS pH 7.2-0.05% Tween 20, el color es desarrollado mediante la adición de 50 µl de tetramethylbenzidina. Finalmente, el desarrollo de color es detenido después de 15 min de incubación a  
25 37°C mediante la adición de 50 µl de 0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La absorbancia a 450 nm de cada muestra es medida en un lector de ELISA MR-3100T como un valor neto después de restarle el valor del blanco (ver Figura 1c).

Todas las experiencias son realizadas por duplicado y cada ensayo de PCR- ELISA es realizado utilizando controles positivos (100 ng de ADN de *Brucella abortus* B-19) y negativos. Un ensayo se considera positivo si la media de los valores de densidades ópticas de las duplicas superan el valor de la media de las densidades ópticas del control sano  
30 mas tres desviaciones estándar.

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Procedimiento de detección de secuencias de ADN específicas de *Brucella spp* mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) acoplada a un enzimoimunoensayo (ELISA) en el que, tras la extracción y purificación del ADN de muestras de sangre u otras muestras clínicas, se usan el oligonucleótido B<sub>4</sub>, que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ. ID: 1 y el oligonucleótido B<sub>5</sub>, que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ. ID: 2, como iniciadores de la reacción de amplificación de una secuencia de ADN de 223 pares de bases del gen que codifica una proteína de superficie celular de 31 Kda de *Brucella abortus*, **caracterizado** porque comprende esencialmente una hibridación de la secuencia de ADN amplificada (productos resultantes de la PCR) marcada con digoxigenina (DIG), con una sonda de 21 nucleótidos complementaria y específica de la secuencia de ADN amplificada, marcada con biotina en el extremo 5', que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ. ID: 3, tras la que se realiza la correspondiente detección mediante ELISA (enzimainmunoensayo).

15 2. Procedimiento de detección de secuencias de ADN específicas de *Brucella spp* mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) acoplada a un enzimoimunoensayo (ELISA) según reivindicación 1, **caracterizado** porque para la hibridación de los productos resultantes de la PCR estos se mezclan con una solución que contiene la sonda de 21 nucleótidos marcada con biotina en el extremo 5', que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ. ID: 3, sometiendo la mezcla a una etapa de desnaturalización y otra de hibridación.

20 3. Uso del procedimiento de detección de secuencias de ADN específicas de *Brucella spp* mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) acoplada a un enzimoimunoensayo (ELISA) según reivindicaciones 1 ó 2, para la puesta en práctica de un método de detección molecular de *Brucella spp*. en muestras clínicas de sangre periférica o en otras muestra clínicas diferentes de las sanguíneas.

25 4. Uso del procedimiento de detección de secuencias de ADN específicas de *Brucella spp* mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) acoplada a un enzimoimunoensayo (ELISA) según reivindicaciones 1 ó 2, para la puesta en práctica de un método de detección precoz de las recidivas de la enfermedad producida por *Brucella spp*. y para el control evolutivo de los pacientes.

30 5. Uso del procedimiento de detección de secuencias de ADN específicas de *Brucella spp* mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) acoplada a un enzimoimunoensayo (ELISA) según reivindicaciones 1 ó 2, para la puesta en práctica de un método diagnóstico de enfermedades producidas por *Brucella spp*.

35

40

45

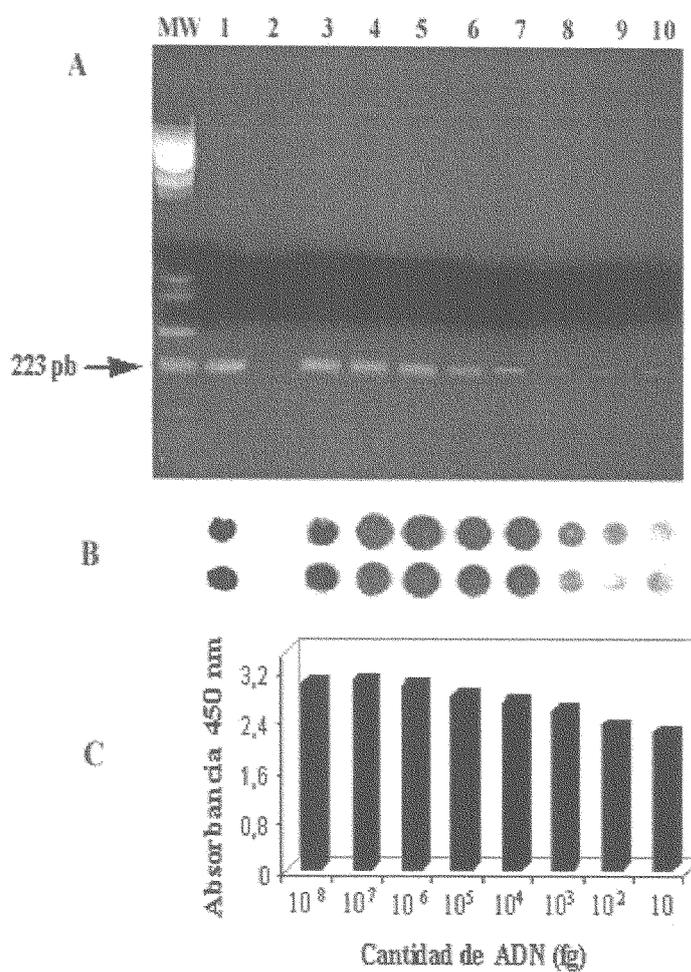
50

55

60

65

Figura 1



# ES 2 220 180 B1

## LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Universidad de Málaga  
Hospital Regional Carlos Haya
- 5 <120> Procedimiento de detección de secuencias de ADN específicas de *Brucella spp.* mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) acoplada a un enzimoimmunoensayo (ELISA)
- <140> P200201381
- <141> 14.06.2002
- 10 <160> 3
- <170> PatentIn Ver. 2.1
- <140> P200201381
- 15 <141> 14.06.2002
- <210> 1
- <211> 21
- 20 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <223> Oligonucleótido cebador
- <400> 1
- 25           tggtcgtgtt gccaatatca a 21
- <140> P200201381
- <141> 14.06.2002
- 30 <210> 2
- <211> 21
- <212> ADN
- 35 <213> Secuencia artificial
- <223> Oligonucleótido cebador
- <400> 2
- 40           cgcgcttgcc ttcaggct g 21
- <140> P200201381
- <141> 14.06.2002
- 45 <210> 3
- <211> 21
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- 50 <223> Sonda de hibridación
- <400> 3
- tcagacgttg cctattgggc c 21
- 55
- 60
- 65



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 220 180

② Nº de solicitud: 200201381

③ Fecha de presentación de la solicitud: 14.06.2002

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.7: C12Q 1/68

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	MATAR G.M. et al. Rapid laboratory confirmation of human Brucellosis by PCR analysis of a target sequence on the 31-kilodalton Brucella antigen DNA". JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, 1996, Vol. 34, Nº 2, páginas 477-478, todo el documento.	1-5
Y	LUK M.C. et al. An enzyme-linked immunosorbent assay to detect PCR products of the rfbS gene from serogroup D Salmonellae: a rapid screening prototype". J. CLIN. MICROBIOL., 1997, Vol. 35, páginas 714-718, todo el documento.	1-5
A	ES 2137124 A (UNIVERSIDAD DE MÁLAGA) 01.12.1999, página 3, línea 15 - página 4, línea 55.	1-5
A	BAILY, G.G. et al. "Detection of Brucella melitensis and Brucella abortus by DNA amplification". JOURNAL OF TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE, 1992, Vol. 95, páginas 271-275, todo el documento.	1-5

**Categoría de los documentos citados**

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

**Fecha de realización del informe**

02.11.2004

**Examinador**

A. Collados Martín Posadillo

Página

1/1