



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 352 782**

② Número de solicitud: 200930374

⑤ Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)
C12R 1/01 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **29.06.2009**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **23.02.2011**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
23.02.2011

⑰ Solicitante/s: **Instituto de Salud Carlos III
Sinesio Delgado, 6
28029 Madrid, ES**

⑱ Inventor/es: **Anda Fernández, Pedro;
García Amil, Cristina;
Roales Gómez, Paloma;
Rodríguez Vargas, Manuela y
Lobo Hernández, Bruno**

⑲ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑳ Título: **Método y kit para la detección molecular de *Tropheryma whipplei*.**

㉑ Resumen:

Método y kit para la detección molecular de *Tropheryma whipplei*.

La presente invención se refiere a un método para la detección de la bacteria *Tropheryma whipplei* en una muestra biológica aislada mediante la amplificación con pares de cebadores específicos de uno o más fragmentos de las secuencias nucleotídicas SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3, donde dichas secuencias corresponden, respectivamente, a secuencias parciales de la secuencia nucleotídica del gen que codifica para la proteína HSP (*Heat shock protein*) de 65 kDa, de la secuencia nucleotídica de NCDRC (*Non coding degenerated repeat cluster*) y de la secuencia nucleotídica del gen que codifica para una proteína de la familia WISP (*WNT1 inducible signaling pathway*) de *Tropheryma whipplei*. Preferiblemente la amplificación se lleva a cabo por medio de PCR multiplex. La detección de los productos de la amplificación se lleva a cabo por medio de sondas específicas complementarias a dichos productos. Asimismo, la presente invención se refiere a un kit que comprende los cebadores y sondas específicas para la detección de *Tropheryma whipplei*.

ES 2 352 782 A1

DESCRIPCIÓN

Método y kit para la detección molecular de *Tropheryma whipplei*.

5 La presente invención se refiere a un método para la detección de la bacteria *Tropheryma whipplei* en una muestra biológica aislada mediante la amplificación con pares de cebadores específicos de uno o más fragmentos de las secuencias nucleotídicas SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3, donde dichas secuencias corresponden, respectivamente, a secuencias parciales de la secuencia nucleotídica del gen que codifica para la proteína HSP (*Heat shock protein*) de 65 kDa, de la secuencia nucleotídica de NCDRC (*Non coding degenerated repeat cluste*) y de la
10 secuencia nucleotídica del gen que codifica para una proteína de la familia WISP (*WNT1 inducible signaling pathway*) de *Tropheryma whipplei*. Preferiblemente la amplificación se lleva a cabo por medio de PCR multiplex. La detección de los productos de la amplificación se lleva a cabo por medio de sondas específicas complementarias a dichos productos. Asimismo, la presente invención se refiere a un kit que comprende los cebadores y sondas específicas para la detección de *Tropheryma whipplei*.

15 Estado de la técnica anterior

Tropheryma whipplei es un bacilo gram positivo ubicuo del suelo/agua y que produce en el ser humano un amplio abanico de manifestaciones clínicas. Esta bacteria es la responsable de la denominada enfermedad de Whipple, para la que no existen métodos de diagnóstico clásicos (cultivo y serología), siendo necesario para la confirmación de un caso sospechoso el uso de métodos moleculares y la detección de, al menos, dos regiones genómicas, según el consenso actual. Hasta la fecha todos los métodos publicados se han enfocado en la amplificación de regiones individuales. Las series de casos descritas incluyen patologías como:

- 25 - Articular, incluyendo poliartritis simétrica migratoria no erosionante en rodillas, codos y muñecas.
- Digestiva, incluyendo diarrea, síndrome de mala absorción y pérdida de peso.
- Neurológica, con síntomas neurológicos prominentes, como encefalitis.
- 30 - Cardiovascular (miocarditis, pericarditis, endocarditis con cultivo negativo, entre otros).
- Mucocutánea.
- 35 - Pleuropulmonar.
- Oftalmológica, incluyendo uveítis, vitritis, retinitis y neuritis retrobulbar.
- Enfermedad inflamatoria granulomatosa de ganglios, hígado y bazo.

40 Las amplias posibilidades de manifestación de la enfermedad implica la necesidad de establecer un diagnóstico diferencial frente a un numeroso grupo de agentes infecciosos que ayude a identificar de forma específica las infecciones por *Tropheryma whipplei* (*T. whipplei*). Para el inicio del tratamiento se necesita una identificación de dicha bacteria en muestras clínicas. Por ejemplo, el tratamiento con trimetoprim-sulfametoxazol en combinación con penicilina o claritromicina se ha mostrado exitoso, aunque se ha descrito un 35% de recidivas.

Las muestras clínicas necesarias para un diagnóstico de laboratorio son, igualmente, muy amplias e incluyen desde heces hasta sangre, biopsias, líquidos corporales (LCR, líquido articular, sangre), muestras respiratorias, oculares, etc.

50 *T. whipplei* es un agente intracelular facultativo que tiene un tiempo de generación extraordinariamente alto (16 días). Todo esto tiene como consecuencia que el cultivo no pueda ser considerado un método diagnóstico y se reserve para estudios de investigación.

55 Como consecuencia de lo anterior, no se ha descrito, hasta la fecha, ningún método serológico, probablemente como consecuencia de la dificultad para disponer de material antigénico.

Por otra parte, no existe ningún método de diagnóstico disponible comercialmente. Con estos antecedentes, la única orientación posible para establecer un diagnóstico es la detección de la bacteria *T. whipplei* mediante la amplificación de fragmentos de regiones genómicas. En este sentido existen una multitud de métodos de PCR descritos, que amplifican regiones individuales del genoma (Blanco *et al.*, 2008. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 26: 573-580; Schneider *et al.*, 2008. *Lancet Infect Dis*, 8: 179-190; Fenollar *et al.*, 2007. *N Engl J Med*, 356: 55-66; Dutly F y Altwegg M, 2001. *Clin Microbiol Rev*, 14: 561-583). Sin embargo, está aceptado el criterio de necesitar resultados positivos, al menos, frente a dos regiones para confirmar un resultado positivo y ninguno de los métodos descritos resuelve este problema
65 (Rolain *et al.*, 2007. *BMC Microbiol.*, 29: 48).

Por otra parte, la enorme variedad de muestras clínicas susceptibles de ser empleadas en el diagnóstico molecular hace de la especificidad una necesidad importante.

Por tanto, se hace imprescindible resolver los dos problemas actuales planteados: especificidad y necesidad de amplificación de más de una región, para la detección de *Tropheryma whipplei*.

Explicación de la invención

5

La presente invención se refiere a un método para la detección de la bacteria *Tropheryma whipplei* en una muestra biológica aislada mediante la amplificación con pares de cebadores específicos de uno o más fragmentos de las secuencias nucleotídicas SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3, donde dichas secuencias corresponden, respectivamente, a secuencias parciales de la secuencia nucleotídica del gen que codifica para la proteína HSP (*Heat shock protein*) de 65 kDa, de la secuencia nucleotídica de NCDRC (*Non coding degenerated repeat cluste*i) y de la secuencia nucleotídica del gen que codifica para una proteína de la familia WISP (*WNT1 inducible signaling pathway*) de *Tropheryma whipplei*. Preferiblemente la amplificación se lleva a cabo por medio de PCR multiplex. La detección de los productos de la amplificación se lleva a cabo por medio de sondas específicas complementarias a dichos productos. Asimismo, la presente invención se refiere a un kit que comprende los cebadores y sondas específicas para la detección de *Tropheryma whipplei*.

15

En la presente invención se desarrolla un método que es capaz de detectar fragmentos de tres regiones del genoma de *Tropheryma whipplei* amplificadas en el mismo ensayo mediante PCR multiplex. Este método va acoplado a un sistema de hibridación en fase sólida frente a sondas moleculares específicas de *T. whipplei* lo que, además de aumentar la sensibilidad del método, asegura una especificidad máxima. Además, para evitar los falsos positivos debidos a contaminaciones con los controles positivos, se han diseñado fragmentos de ADN sintético siguiendo la secuencia de las dianas seleccionadas (SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3). En dichos fragmentos se han incorporado mutaciones en la región que hibrida con la sonda, de manera que sea posible diferenciar de forma visual una reacción frente a la sonda real (que aparecerá en los casos positivos) y frente a la sonda mutada (que debe aparecer exclusivamente en los controles positivos).

20

25

El método descrito en la presente invención presenta una serie de ventajas respecto de las técnicas convencionales:

30

- Fiabilidad y sencillez para identificar bacterias de la especie *Tropheryma whipplei* en muestras biológicas aisladas.

- Alta sensibilidad. El bajo nº de bacterias de dicha especie presentes en los tejidos (muestras clínicas) hace de este método una herramienta útil donde otros métodos, como por ejemplo los métodos serológicos, son desestimados.

35

- La técnica de amplificación simultánea mediante PCR multiplex tiene una especificidad del 100%, ya que no amplifica ADN de otras especies bacterianas relacionadas (Tabla 2). La elevada especificidad es debida al empleo de cebadores y sondas moleculares específicas para *Tropheryma whipplei*. Dicha especificidad evita pasos secundarios como la secuenciación del producto.

40

- Aumenta el valor predictivo de un resultado positivo en un único ensayo debido a la amplificación y detección conjunta de 3 regiones del genoma. Este hecho supone una determinación más rápida de *Tropheryma whipplei* respecto de otro tipo de métodos que emplean PCR con uno o dos pares de cebadores.

45

- Los controles positivos empleados permiten evitar los falsos positivos que pudieran tener lugar como consecuencia de un error de manipulación en la amplificación y/o en la hibridación.

Un primer aspecto de la presente invención se refiere a un método para la detección de *Tropheryma whipplei* que comprende:

50

a. Obtener una muestra biológica aislada,

b. poner la muestra del paso (a), o parte de la misma, en contacto con una mezcla de reacción que contiene cebadores capaces de amplificar uno o más fragmentos de las secuencias nucleotídicas SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3,

55

c. amplificar los fragmentos de las secuencias nucleotídicas según el paso (b) mediante la reacción en cadena de la polimerasa, y

d. detectar y/o cuantificar los productos de la amplificación del paso (c).

60

La muestra es una fracción estadísticamente significativa que aporta información sobre la presencia o ausencia de microorganismos de la especie *Tropheryma whipplei* en el individuo o elemento del que procede (en adelante se podrá emplear el término *T. whipplei* para hacer referencia a este microorganismo). El término "muestra biológica aislada" hace referencia a una muestra aislada de materiales de origen biológico que pueden ser tanto de origen humano como animal o vegetal. La muestra puede proceder de un tejido biológico o puede ser un producto de deshecho del metabolismo biológico como por ejemplo, pero sin limitarse, un fluido biológico o heces. La principal aplicación de este método va dirigida a muestras de origen humano pero el método de la presente invención puede aplicarse

65

ES 2 352 782 A1

para detectar *T. whipplei* en otros seres vivos o muestras ambientales que puedan comportarse como vehículos de transmisión de los microorganismos citados.

5 En el paso (b) del método se pone en contacto la muestra del paso (a), o parte de la misma, con una mezcla de reacción que contiene cebadores capaces de amplificar uno o más fragmentos de las secuencias nucleotídicas SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3. El término “parte de la muestra” hace referencia a cualquier fracción de la misma. Preferiblemente dicha fracción es material genético. Más preferiblemente, el material genético es ADN. El ADN se extrae de la muestra mediante métodos y técnicas conocidas en el estado de la técnica. Si se pone en contacto la muestra con dichos cebadores, ésta debe ser tratada de modo que el material genético contenido en la misma sea reconocido por los cebadores capaces de actuar de iniciadores de la amplificación de los correspondientes fragmentos. 10 La amplificación hace referencia a la replicación repetida de dichos fragmentos por medio de la reacción en cadena de la polimerasa. Esta reacción en cadena, conocida como PCR (de las siglas en inglés *Polymerase Chain Reaction*), es una técnica de biología molecular para obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN.

15 El término “cebador”, (puede ser empleado el término sinónimo “iniciador” o “primer”) tal como se entiende en la presente invención” es un oligonucleótido corto que se puede sintetizar *in vitro* para ser utilizado en diversas técnicas moleculares. Se diseñan como secuencias complementarias de una región de ADN diana que se desea detectar. Para obtener la amplificación de un fragmento, son necesarios dos cebadores, uno de ellos se unirá a la hebra molde (cebador directo) y el otro a la hebra complementaria (cebador reverso), en una posición que permita obtener, mediante sucesivas amplificaciones con una enzima ADN polimerasa termorresistente, uno o más fragmentos de las secuencias nucleotídicas SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 que pueda ser detectado y/o cuantificado. 20

El aislamiento de la fracción de material genético se lleva a cabo mediante métodos conocidos en el estado de la técnica que permiten extraer el ADN total de la muestra, entre el que se incluye el ADN de *T. whipplei* si la muestra contiene dicha bacteria. De este modo, los fragmentos de interés del ADN del microorganismo *T. whipplei* podrán ser amplificados y detectados. Por ejemplo, pero sin limitarse, si la muestra aislada procede de un humano infectado con *T. whipplei*, se pondrá en contacto el ADN total extraído de dicha muestra con la mezcla de reacción que contiene cebadores capaces de amplificar uno o más fragmentos de las secuencias nucleotídicas SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3, y dichos fragmentos podrán ser detectados. 25

30 La detección de los productos de la amplificación del paso (c) permite determinar la presencia o ausencia de *T. whipplei* en la muestra. La detección puede ir seguida de la cuantificación de dichos productos de la amplificación mediante técnicas conocidas en el estado de la técnica como por ejemplo pero sin limitarse, PCR en tiempo real o medida de la intensidad de la banda correspondiente al fragmento amplificado. 35

Para determinar la presencia de *T. whipplei* puede ser necesario determinar la desviación de los datos de amplificación del paso (c) del método con respecto a un control. Este control puede ser, un control positivo y/o un control negativo. El control es aquella amplificación que procede tanto de muestras en las que *T. whipplei* se encuentra ausente (control negativo) como de muestras en las que se encuentra presente de forma certera (control positivo). La medida de la desviación de las amplificaciones obtenidas de las muestras problema respecto del control o controles, puede llevarse a cabo mediante comparación de presencia o ausencia de bandas, así como también la cuantificación de dichos productos. Esta desviación puede ser atribuida a la presencia o ausencia de *T. whipplei* en las muestras analizadas. 40

45 La secuencia SEQ ID NO: 1 es un fragmento de 501 pares de bases (pb) de la secuencia nucleotídica del gen que codifica para la proteína HSP (*Heat shock protein*) de 65 kDa de *T. whipplei* (ver nº de acceso y la posición de dicho fragmento en la secuencia, en la tabla 1). Las proteínas de la familia HSP están relacionadas con la exposición de las células a temperaturas elevadas y otros tipos de estrés. La nomenclatura de las proteínas HSP se ha llevado a cabo de acuerdo con su peso molecular, así, por ejemplo, Hsp65, Hsp70 y Hsp90 se refiere a proteínas con un tamaño de 65, 70 y 90 kilodaltons, respectivamente. 50

55 La secuencia SEQ ID NO: 2 es un fragmento de 257 pb de una secuencia nucleotídica NCDRC (del inglés *Non coding degenerated repeat cluster*) de *T. whipplei* (ver nº de acceso y la posición de dicho fragmento en la secuencia, en la tabla 1).

60 La secuencia SEQ ID NO: 3 es un fragmento de 225 pb de la secuencia nucleotídica del gen que codifica para una proteína de la familia WISP (del inglés *WNT1 inducible signaling pathway*) de *T. whipplei* (ver nº de acceso y la posición de dicho fragmento en la secuencia, en la tabla 1). WNT1 es una proteína de la familia de proteínas glicosiladas implicadas en señalización que median en diversos procesos del desarrollo.

65 Una realización preferida de la presente invención se refiere a un método donde los cebadores del paso (b) son SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 para amplificar el fragmento SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 7 para amplificar el fragmento SEQ ID NO: 2; y SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9 para amplificar el fragmento SEQ ID NO: 3. Para obtener la amplificación de un fragmento, son necesarios dos cebadores, uno de ellos se unirá a la hebra de ADN molde (cebador directo) y el otro a la hebra complementaria (cebador reverso), en una posición que permita obtener, mediante sucesivas amplificaciones con una enzima ADN polimerasa termorresistente, un fragmento que pueda ser detectado y/o cuantificado. Los cebadores SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 8 son cebadores directos. Los cebadores SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 9 son cebadores reversos.

ES 2 352 782 A1

Otra realización preferida se refiere a un método donde la amplificación se lleva a cabo por medio de PCR multiplex. La PCR se denomina multiplex cuando se utilizan más de un par de cebadores para amplificar de forma simultánea varios fragmentos de ADN en una sola reacción de amplificación. Para poder llevar a cabo estas amplificaciones, el diseño de los cebadores debe ser lo suficientemente específico para evitar reacciones cruzadas que den lugar a amplificaciones inespecíficas que pudieran invalidar el método. En PCR multiplex de la presente invención se pueden emplear al menos 3 pares de cebadores, un par de cebadores por cada una de las secuencias SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3. Preferiblemente se emplea un par de cebadores por cada una de dichas secuencias. En este caso se denomina PCR triplex. Por ejemplo, la PCR triplex se puede llevar a cabo por medio de los pares de cebadores SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5; SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 7; SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9.

Según otra realización preferida del método de la presente invención, la detección y/o cuantificación se lleva a cabo por medio de una o más sondas moleculares capaces de hibridar con cualquiera de los fragmentos de las secuencias nucleotídicas.

Las sondas moleculares específicas consisten en una secuencia de ADN lineal y de cadena sencilla, complementario, parcialmente, de cualquier parte de la secuencia del fragmento amplificado correspondiente.

Una realización aún más preferida de la invención se refiere al método donde las sondas moleculares para llevar a cabo la detección y/o cuantificación son SEQ ID NO: 10 para detectar y/o cuantificar SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 11 para detectar y/o cuantificar SEQ ID NO: 2, y SEQ ID NO: 12 para detectar y/o cuantificar SEQ ID NO: 3. Para la detección de los productos de la amplificación también pueden emplearse cualquiera de las secuencias complementarias de las sondas SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12. En la tabla 1 se muestran las posiciones nucleotídicas que reconocen las correspondientes sondas (o sus secuencias complementarias).

Otra realización preferida se refiere al método donde, además, comprende sondas control capaces de hibridar con las secuencias modificadas de uno o más fragmentos de las secuencias nucleotídicas SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3.

Las sondas control se utilizan como controles positivos de la hibridación. Dichas sondas control son fragmentos nucleotídicos que incorporan mutaciones respecto de la región complementaria con la secuencia los productos amplificados, para ello se diseñaron secuencias de ADN sintético siguiendo la secuencia de las sondas diseñadas para la detección y/o cuantificación de dichos productos, pero con cambios en algunos nucleótidos de la misma posición, impidiendo de esta manera la hibridación de dicha sonda control con las secuencias de los productos de la amplificación por tratarse de secuencias que no son totalmente complementarias. Estas sondas control permiten localizar falsos positivos debidos a contaminaciones por manipulación en el proceso de amplificación y/o hibridación. Las sondas control se clonan en vectores de clonación apropiados que serán utilizados, tras su aislamiento y purificación, como controles de la hibridación, de modo que la sonda control es capaz de hibridar con las secuencias modificadas (y clonadas en dicho vector) de uno o más fragmentos de las secuencias nucleotídicas SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 y que además, no es capaz de hibridar con la sonda complementaria que consiste en un fragmento complementario de una secuencia real ni tampoco con ninguna de las secuencias de los productos amplificados que cuyo molde procede de la muestra biológica aislada que es objeto de este método.

Una realización más preferida se refiere al método donde las sondas control, capaces de hibridar con las secuencias modificadas de dichos fragmentos, son SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 15 o cualquiera de sus secuencias complementarias.

Otra realización preferida de la presente invención se refiere al método donde la detección y/o cuantificación se lleva a cabo por medio de la hibridación de las sondas con las secuencias nucleotídicas amplificadas, en fase sólida.

La hibridación en fase sólida tal como se entiende en la presente invención se refiere al proceso en el cual cualquiera de los productos amplificados es susceptible de ser fijado a un soporte sólido y detectado por medio de la hibridación de una sonda molecular específica complementaria a cualquiera de los fragmentos de los productos fijados. Asimismo, dicha detección se puede llevar a cabo fijando la sonda molecular específica al soporte sólido. El término "soporte sólido" tal como se entiende en la presente invención, se refiere, pero sin limitarse, a la resina de intercambio iónico o adsorción, vidrio, plástico, látex, nylon, gel, ésteres de celulosa, esferas paramagnéticas o cualquiera de sus combinaciones. Preferiblemente el material del soporte sólido es plástico. El soporte sólido puede ser un *array*. Dicho *array* puede ser un *macroarray* o un *microarray*.

En la presente invención, la detección mediante hibridación se puede llevar a cabo, pero sin limitarse, por medio de *Reverse Une Blotting*.

Según otra realización preferida del método de la presente invención, la muestra biológica aislada es un fluido biológico o una biopsia de tejido biológico. El fluido biológico se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse, líquido cefalorraquídeo, sangre, saliva, orina, líquido articular, humor acuoso o líquido pleural. La biopsia de tejido biológico se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse, biopsia intestinal, biopsia de válvula cardíaca, biopsia de ganglio linfático, biopsia cutánea, o biopsia de tejido sinovial.

Otra realización preferida se refiere al método de la presente invención como herramienta para la monitorización de la respuesta a un tratamiento de la enfermedad de Whipple donde se realizan tomas de muestras biológicas seriales de pacientes que han recibido un tratamiento. Esta enfermedad está provocada por *Tropheryma whipplei*. El análisis del ascenso o del descenso de la cuantificación del ADN de los productos de la amplificación, permite evaluar si la respuesta al tratamiento es negativa o positiva, respectivamente.

El procedimiento de monitorización comprende una serie de pasos que comienzan por la toma de muestras seriales. Se entiende por toma de muestras seriales, la extracción de cualquier tipo de muestras biológicas, incluidas las mencionadas en la presente invención. La toma de muestras se realiza a diferentes tiempos desde que se administra un tratamiento para eliminar al agente causante de la enfermedad de Whipple, de forma que la cuantificación de la amplificación de los fragmentos de los productos de la amplificación en cada una de las muestras procedentes del mismo paciente, indicarán la eficacia del mismo. Así pues, una disminución de la desviación de los valores de amplificación respecto de un control, representado éste último, por ejemplo, pero sin limitarse, por valores de amplificación en un mismo individuo, previos al tratamiento, supondría que el tratamiento está surtiendo efecto en el sentido de disminuir la cantidad de microorganismos de la especie *T. whipplei*.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un kit para la detección de *T. whipplei* que comprende cebadores capaces de amplificar uno o más fragmentos de las secuencias nucleotídicas SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3. El kit puede contener pero sin limitarse, reactivos o sondas marcadas con fluoróforos. El kit también puede incluir controles positivos y negativos. Por controles positivos y negativos se entienden componentes del kit que permitan comprobar la eficacia de los reactivos, sondas u otros componentes suministrados en el mismo. Un control positivo puede ser, por ejemplo, pero sin limitarse, una construcción genética que incluya las secuencias de los fragmentos que pueden ser amplificados por los pares de cebadores descritos anteriormente y, el control negativo puede ser, por ejemplo, pero sin limitarse, una construcción que carece de dichos fragmentos presentes en el control positivo.

Una realización preferida de la invención se refiere al kit donde los cebadores son SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 para amplificar la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 7 para amplificar la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9 para amplificar la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 3.

Otra realización preferida de la presente invención es el kit que además comprende sondas moleculares capaces de hibridar con cualquiera de los fragmentos de las secuencias nucleotídicas o con cualquiera de sus secuencias complementarias. Una realización más preferida de la presente invención se refiere al kit donde las sondas moleculares son SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12 o cualquiera de sus secuencias complementarias.

El kit de la presente invención se puede emplear para la monitorización de la respuesta a un tratamiento de la enfermedad de Whipple.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenden en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Descripción de las figuras

Fig 1. Muestra la sensibilidad y especificidad del método de detección de *Tropheryma whipplei*.

La figura muestra la especificidad (carriles 1-15), sensibilidad (carriles 26-29) y un ejemplo de realización con muestras clínicas (carriles 17-24), con positividad frente a 1, 2 ó las 3 dianas.

Carril 1: *Salmonella enteritidis*; carril 2: *Bacillus subtilis*; carril 3: *Enterococcus faecium*; carril 4: *Klebsiella pneumoniae*; carril 5: *Proteus mirabilis*; carril 6: *Escherichia coli*; carril 7: *Actinomyces odontolyticus*; carril 8: *Actinomyces turicensis*; carril 9: *Capnocytophaga gingivalis*; carril 10: *Rickettsia typhi*; carril 11: *Bartonella henselae*; carril 12: *Brucella mellitensis*; carril 13: *Mycoplasma pneumoniae*; carril 14: *Chlamydia pneumoniae*; carril 15: *Legionella pneumophila*; carril 16: Control negativo; carriles 17-24: muestras clínicas; carril 25: Control de extracción; carril 26: control positivo 10^3 copias; carril 27: control positivo 10^2 copias; carril 28: control positivo 10 copias; carril 29: control positivo 1 copia.

Ejemplos

Ejemplo 1

Amplificación y detección de secuencias de ADN de *Tropheryma whipplei*

El método de la presente invención se desarrolla por medio de una PCR multiplex, concretamente una PCR triplex (con tres pares de cebadores) capaces de amplificar tres regiones diferentes del genoma de *Tropheryma whipplei*, un fragmento del gen que codifica para HSP65 (*Heat Shock Protein 65 kDa*), para un fragmento del gen que codifica para

ES 2 352 782 A1

una proteína de superficie de la familia WISP (*WNT1 inducible signaling pathway*) y para el fragmento de la región no codificante *non-coding degenerated repeat cluster*. Este método va acoplado a un sistema de hibridación en fase sólida frente a sondas específicas de *T. whipplei* lo que, además de aumentar la sensibilidad del método, asegura una especificidad máxima. Como controles positivos de la hibridación se emplearon fragmentos que incorporaron mutaciones en la región que hibrida con la secuencia de los productos de la amplificación. Para ello se diseñaron secuencias de ADN sintético siguiendo la secuencia de las sondas diseñadas para la detectar y/o cuantificación de dichos productos, pero con cambios en algunos nucleótidos de la misma posición que impidieron la correcta hibridación de dicha sonda control con las secuencias de los productos de la amplificación ya que no son secuencias totalmente complementarias. De esta forma se evitaron los falsos positivos debidos a contaminaciones por manipulación en dicha amplificación.

De esta manera fue posible diferenciar de forma visual una reacción frente a la sonda real (que apareció en los casos positivos) y frente a la sonda mutada (que apareció exclusivamente en los controles positivos). La síntesis de los controles positivos sintéticos se realizó mediante el uso de cebadores solapantes de aproximadamente 70 pares de bases (pb) en sucesivas reacciones de PCR, que posteriormente se clonaron en vectores apropiados para su multiplicación en células competentes.

- Selección de las regiones del genoma que se amplifican: después de un exhaustivo análisis de diferentes elementos del genoma disponibles, mediante el uso de programas informáticos de libre distribución, se eligieron fragmentos útiles para el diseño de sondas específicas, flanqueados por regiones conservadas, útiles para el diseño de los cebadores.

- Secuencias de los cebadores y de las sondas (Tabla 1): cada una de las regiones elegidas se analizó, posteriormente, con programas informáticos adicionales y mediante análisis visual, localizando zonas de aproximadamente entre 22 y 25 nucleótidos de longitud, aproximadamente, cuya eficacia como cebadores para la amplificación fue estimada tanto empíricamente como mediante software apropiado. Igualmente, se realizó una búsqueda de regiones de entre 21 y 23 nucleótidos, aproximadamente, que fueran específicas de *T. whipplei*, cuya eficacia como sondas específicas fue estimada, también, empíricamente y mediante software especializado.

TABLA 1

Cebadores y sondas utilizadas

GEN	CEBADOR	SONDA	POSICIÓN ¹
HSP 65	SEQ ID NO: 4		767-789 (AF483649)
	SEQ ID NO: 5		1267-1243 (AF483649)
		SEQ ID NO: 10	912-933 (AF483649)
		SEQ ID NO: 13	Nueva secuencia, modificada a partir de SEQ ID NO: 10
NCDRC	SEQ ID NO: 6		284399-284421 (BX251411.1)
	SEQ ID NO: 7		284655-284633 (BX251411.1)
		SEQ ID NO: 11	284595-284615 (BX251411.1)
		SEQ ID NO: 14	Nueva secuencia, modificada a partir de SEQ ID NO: 11
Proteína tipo WISP	SEQ ID NO: 8		117999-118020 (BX251410.1)
	SEQ ID NO: 9		118223-118201 (BX251410.1)
		SEQ ID NO: 12	118171-118193 (BX251410.1)
		SEQ ID NO: 15	Nueva secuencia, modificada a partir de SEQ ID NO: 12

HSP 65: *Heat shock protein* de 65 kDa.

NCDRC: *Non coding degenerated repeat cluster*.

Proteína tipo WISP: *WNT1 inducible signaling pathway*.

1: Posición donde comienza y termina cada oligonucleótido (cebador o sonda), contando desde el comienzo de la secuencia completa depositada en GenBank (número de acceso entre paréntesis).

ES 2 352 782 A1

Los cebadores se modificaron en posición 5' con biotina. Se manipularon evitando someterlos a más de 2 ciclos de congelación/descongelación, dada la sensibilidad comprobada de la unión oligonucleótido-biotina a estos ciclos de temperatura. Para ello, una vez rehidratados por primera vez, se alicuotearon en volúmenes de 110 µl con una concentración variable según cada uno. Cada una de las alícuotas solo se descongeló una vez para su utilización en la fabricación de un lote de mezcla de reacción, lote que se mantuvo congelado hasta su uso en la reacción de amplificación.

Los cebadores SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 amplificaron un fragmento de 501 pb de la secuencia nucleotídica que codifica para la proteína HSP 65 que corresponde a SEQ ID NO: 1. Los cebadores SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 7 amplificaron un fragmento de 257 pb de la secuencia nucleotídica que codifica para el fragmento de la región no codificante *non-coding degenerated repeat cluster* que corresponde con la secuencia SEQ ID NO: 2. De igual modo, los cebadores SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9 amplificaron un fragmento de 225 pb de la secuencia nucleotídica que codifica para la proteína de superficie de la familia WISP que corresponde a SEQ ID NO: 3.

Los fragmentos amplificados fueron clonados en vectores competentes para la replicación. Tal como se menciona en los ejemplos, cada uno de los fragmentos amplificados citados se clonó en vectores comerciales (TOPO TA Cloning®, Invitrogen) para facilitar su propagación y posterior utilización como controles positivos cuantificables del proceso de amplificación. Los controles positivos de la amplificación son cualquiera de los fragmentos SEQ ID NO: 1, 2 y 3 clonados en dicho vector TOPO TA o en cualquier otro vector competente para la replicación.

En todos los casos, la especificidad de cada una de las regiones identificadas como válidas para cebadores o sondas fue comprobada adicionalmente mediante:

- Comparación con bases de datos de secuencias de acceso público (GenBank) mediante software de acceso público (Blastn).

- Análisis de ADN de especies bacterianas heterólogas mediante el método de la presente invención que emplea cebadores específicos para *T. whipplei* (Tabla 2).

TABLA 2

Especies bacterianas con las que se ha comprobado la especificidad del método

ORGANISMO	Resultado
<i>Salmonella enteritidis</i>	Negativo
<i>Bacillus subtilis</i>	“
<i>Enterococcus faecium</i>	“
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	“
<i>Proteus mirabilis</i>	“
<i>Escherichia coli</i>	“
<i>Rickettsia typhi</i>	“
<i>Bartonella henselae</i>	“
<i>Brucella mellitensis</i>	“
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	“
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	“
<i>Legionella pneumophila</i>	“
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	“
<i>Actinomyces turicensis</i>	“
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	“

ES 2 352 782 A1

1.2. Reacción de PCR

- La composición de la mezcla de reacción de la PCR triplex se muestra en la tabla 3. Se determinó empíricamente la concentración relativa de cada pareja de cebadores que permitió una eficacia de amplificación similar bajo diferentes condiciones (un solo ADN con su pareja de cebadores; un solo ADN con todas las parejas de cebadores; todos los ADNs con todos los cebadores). También se adaptó la concentración de alguno de los componentes (albúmina bovina sérica) para favorecer la amplificación simultánea propuesta.

TABLA 3

Composición de la mezcla de reacción (por cada tubo de PCR, volumen final de la reacción de 50 μ L)

Componentes	Cantidades
Buffer 10X*	9 μ L
Cl ₂ Mg*	6 μ L
Taq Gold*	5 unidades
Nucleótidos (dNTPs)	200 μ Molar
BSA**	4 μ g
Cebadores***: SEQ ID NO: 4	25 pmoles/tubo
SEQ ID NO: 5	25 pmoles/tubo
SEQ ID NO: 6	30 pmoles/tubo
SEQ ID NO: 7	30 pmoles/tubo
SEQ ID NO: 8	45 pmoles/tubo
SEQ ID NO: 9	25 pmoles/tubo
ADN/Muestra	hasta 300 ng
H ₂ O	hasta un volumen final de 50 μ L

* Amplitaq Gold DNA Polimerasa y reactivos para este producto (*Applied Biosystems*).

** Taq polimerasa Roche, ref. 13178439.

*** Sintetizados por purificación RP1 (*Sigma-Aldrich Spain*) y con modificación Biotina en el extremo 5'.

En el caso del control positivo de la amplificación, el componente ADN/muestra es ADN plasmídico aislado que comprende las secuencias SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3.

- Condiciones de la amplificación:

La amplificación se realiza mediante los siguientes ciclos:

-1º) 1 ciclo a 94°C durante 9 minutos.

-2º) 40 ciclos con las siguientes condiciones: 94°C durante 30 segundos seguidos de una exposición de 55°C durante 1 minuto y 72°C durante 2 minutos.

-3º) 1 ciclo a 72°C durante 10 minutos.

ES 2 352 782 A1

1.3. Detección de secuencias de ADN de *Tropheryma whipplei*

En una segunda fase, para la detección/identificación de las muestras positivas, se utiliza una hibridación en fase sólida (en un soporte sólido) en macroarrays, mediante el método *Reverse Line Blotting*, que permite enfrentar cada producto de amplificación frente a un número de sondas, cuya única limitación en número se refiere al tamaño de la membrana en la que se realice la hibridación. Para ello, en la membrana de hibridación todas las sondas específicas han de ser unidas covalentemente. El soporte sólido es una membrana de plástico, preferiblemente el plástico es Nylon. La membrana de Nylon está cargada negativamente (nombre comercial Biodyne® [Pall Corporation]) y pensada para la inmovilización de proteínas. Esto permite que un oligonucleótido modificado en un extremo con una cola de amino pueda unirse covalentemente a la membrana mediante procedimientos químicos conocidos en el estado de la técnica. La metodología está disponible en la literatura científica (por ejemplo: García-Esteban *et al.*, 2008. *J Clin Microbiol.*, 46: 776-779). Las temperaturas de hibridación que se han utilizado en este método son: 48°C, para la hibridación y 40°C para la incubación con el conjugado y para los lavados. La concentración de sondas utilizadas en cada caso, se muestran en la tabla 4.

TABLA 4

Sondas y concentraciones empleadas en la hibridación

Sonda	Concentración (pMoles/ μ L)
SEQ ID NO: 10	12,8
SEQ ID NO: 11	0,4
SEQ ID NO: 12	0,2
SEQ ID NO: 13*	12,8
SEQ ID NO: 14**	0,4
SEQ ID NO: 15***	0,2

*: Secuencia artificial. Modificación de SEQ ID NO: 10.

**: Secuencia artificial. Modificación de SEQ ID NO: 11.

***: Secuencia artificial. Modificación de SEQ ID NO: 12.

1.4. Otras consideraciones del método

Sensibilidad

La sensibilidad del método para cada uno de los fragmentos amplificados se determinó mediante el cálculo del número de copias de los plásmidos con los fragmentos insertados que el método amplifica, en 1 copia de cada una de las 3 dianas (Fig. 1).

Especificidad

La especificidad del método (Fig. 1) se ensayó frente a una batería de especies bacterianas relacionadas, bien por su proximidad filogenética con *T. whipplei*, o bien por su ubicuidad o por haber sido descritas como causa de falsos positivos. La especificidad de este método es de un 100% (Tabla 2 y Fig. 1).

Ejemplo 2

Resultados de la aplicación del método de detección de Tropheryma whipplei

En la Fig. 1 se muestran ejemplos de realización del método con muestras humanas. Se ha elegido una representación de casos que presentan positividad frente a 1, 2 o los 3 fragmentos que se detectan con el método. En la tabla 5 se presentan resultados de la aplicación del método de la presente invención. Como puede observarse hay 42 muestras que se sospecha que podrían contener el microorganismo *T. whipplei*. Se detectaron 26 casos probables (positivos solamente frente a un fragmento), 8 casos positivos frente a 2 fragmentos y 8 casos positivos a los 3 fragmentos (éstos quedarían confirmados). Los 16 casos positivos frente a 2 ó 3 fragmentos quedan confirmados si bien, la detección de los 3 fragmentos asegura dicha confirmación, eliminando posibles falsos positivos.

ES 2 352 782 A1

Los resultados que se presentan en la tabla 5 y la tabla resumen, están basados en la aplicación del método en el que se lleva a cabo la amplificación de los fragmentos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 mediante PCR triplex, es decir, usando simultáneamente los tres pares de cebadores. En este sentido, la interpretación de los resultados es la siguiente: El signo + debe interpretarse como la presencia de los fragmentos amplificados mediante la PCR triplex. En este sentido, en una muestra de un paciente se pueden detectar 1, 2 ó 3 fragmentos, en cuyo caso le correspondería el signo + para 1 fragmento (SEQ ID NO: 1 ó SEQ ID NO: 2 ó SEQ ID NO: 3), para 2 fragmentos (SEQ ID NO: 1 y 2 ó SEQ ID NO: 1 y 3 ó SEQ ID NO: 2 y 3) o para 3 fragmentos (SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3). Por ejemplo, en la muestra de sangre del paciente 42, se detectan los tres fragmentos: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3, es decir, este paciente es positivo (+) a los 3 fragmentos pero no es positivo (-) tan sólo a 2 fragmentos o tan sólo a un fragmento.

TABLA 5

Resultados en pacientes con el método de PCR triplex

Pacientes	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 1 y 2	SEQ ID NO: 1 y 3	SEQ ID NO: 2 y 3	SEQ ID NO: 1, 2 y 3
1 ^a	+	-	-	-	-	-	-
2 ^a	+	-	-	-	-	-	-
3 ^b	+	-	-	-	-	-	-
4 ^c	+	-	-	-	-	-	-
5 ^d	+	-	-	-	-	-	-
6 ^e	+	-	-	-	-	-	-
7 ^a	+	-	-	-	-	-	-
8 ^a	+	-	-	-	-	-	-
9 ^a	+	-	-	-	-	-	-
10 ^c	+	-	-	-	-	-	-
11 ^c	+	-	-	-	-	-	-
12 ^c	+	-	-	-	-	-	-
13 ^c	+	-	-	-	-	-	-
14 ^b	+	-	-	-	-	-	-

ES 2 352 782 A1

5	15 ^c	+	-	-	-	-	-
	16 ^d	+	-	-	-	-	-
	17 ^f	+	-	-	-	-	-
	18 ^b	+	-	-	-	-	-
	19 ^c	+	-	-	-	-	-
10	20 ^a	+	-	-	-	-	-
	21 ^c	+	-	-	-	-	-
	22 ^c	+	-	-	-	-	-
15	23 ^c	+	-	-	-	-	-
	24 ^g	+	-	-	-	-	-
20	25 ^h	-	-	+	-	-	-
	26 ^c	-	-	+	-	-	-
	27 ^c	-	-	-	-	+	-
25	28 ^c	-	-	-	-	+	-
	29 ^a	-	-	-	-	+	-
	30 ^b	-	-	-	-	+	-
30	31 ^c	-	-	-	-	-	+
	32 ^h	-	-	-	-	-	+
	33 ^a	-	-	-	-	-	+
35	34 ^g	-	-	-	-	-	+
	35 ^b	-	-	-	-	-	-
	36 ^f	-	-	-	-	-	+
40	37 ^c	-	-	-	-	-	+
	38 ^c	-	-	-	-	-	+
	39 ⁱ	-	-	-	-	-	+
45	40 ^c	-	-	-	-	-	+
	41 ^g	-	-	-	-	-	+
50	42 ^a	-	-	-	-	-	+

Los siguientes superíndices indican la procedencia de las muestras en los pacientes correspondientes:

55 a: Sangre/ b: Válvula mitral/ c: Biopsia de duodeno/ d: biopsia de ganglio/ e: Biopsia de ileón/ f: Válvula aórtica/ g: Heces/ h: Biopsia de yeyuno/ i: Saliva.

Tabla resumen de los resultados mostrados en la tabla anterior: Pacientes en los que se ha detectado la presencia del correspondiente fragmento amplificado.

SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 1 y 2	SEQ ID NO: 1 y 3	SEQ ID NO: 2 y 3	SEQ ID NO: 1, 2 y 3
24	0	2	0	4	4	8

65 Positivos confirmados (≥ 2 regiones positivas): 16.

Probables positivos (1 región positiva): 26.

ES 2 352 782 A1

REIVINDICACIONES

1. Método para la detección de *Tropheryma whipplei* que comprende:

- a. Obtener una muestra biológica aislada,
- b. poner la muestra del paso (a), o parte de la misma, en contacto con una mezcla de reacción que contiene cebadores capaces de amplificar uno o más fragmentos de las secuencias nucleotídicas SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3,
- c. amplificar los fragmentos de las secuencias nucleotídicas según el paso (b) mediante la reacción en cadena de la polimerasa, y
- d. detectar y/o cuantificar los productos de la amplificación del paso (c).

2. Método según la reivindicación 1, donde los cebadores del paso (b) son:

- a. SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 para amplificar el fragmento SEQ ID NO: 1,
- b. SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 7 para amplificar el fragmento SEQ ID NO: 2, y
- c. SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9 para amplificar el fragmento SEQ ID NO: 3.

3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, donde la amplificación se lleva a cabo por medio de PCR multiplex.

4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la detección y/o cuantificación se lleva a cabo por medio de una o más sondas moleculares capaces de hibridar con cualquiera de los fragmentos de las secuencias nucleotídicas.

5. Método según la reivindicación 4, donde las sondas moleculares para llevar a cabo la detección y/o cuantificación son:

- a. SEQ ID NO: 10 para detectar y/o cuantificar SEQ ID NO: 1,
- b. SEQ ID NO: 11 para detectar y/o cuantificar SEQ ID NO: 2, y
- c. SEQ ID NO: 12 para detectar y/o cuantificar SEQ ID NO: 3.

6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 4 ó 5, donde además comprende sondas control capaces de hibridar con las secuencias modificadas de uno o más fragmentos de las secuencias nucleotídicas SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3.

7. Método según la reivindicación 6, donde las sondas control, capaces de hibridar con las secuencias modificadas de dichos fragmentos, son SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 15.

8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, donde la detección y/o cuantificación se lleva a cabo por medio de la hibridación de las sondas moleculares con las secuencias nucleotídicas amplificadas, en fase sólida.

9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde la muestra biológica aislada es un fluido biológico o una biopsia de tejido biológico.

10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para la monitorización de la respuesta a un tratamiento de la enfermedad de Whipple, provocada por *Tropheryma whipplei*.

11. Kit para la detección de *Tropheryma whipplei* que comprende cebadores capaces de amplificar uno o más fragmentos de las secuencias nucleotídicas SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3.

12. Kit según la reivindicación 11, donde los cebadores son:

- a. SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 para amplificar la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 1,
- b. SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 7 para amplificar la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 2, y

ES 2 352 782 A1

c. SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9 para amplificar la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 3.

5 13. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 11 ó 12 que además comprende sondas moleculares capaces de hibridar con cualquiera de los fragmentos de las secuencias nucleotídicas.

14. Kit según la reivindicación 13, donde las sondas moleculares son SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12.

10 15. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 13 ó 14 que además comprende las sondas control SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 15, capaces de hibridar con secuencias modificadas de los fragmentos de dichas secuencias nucleotídicas.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

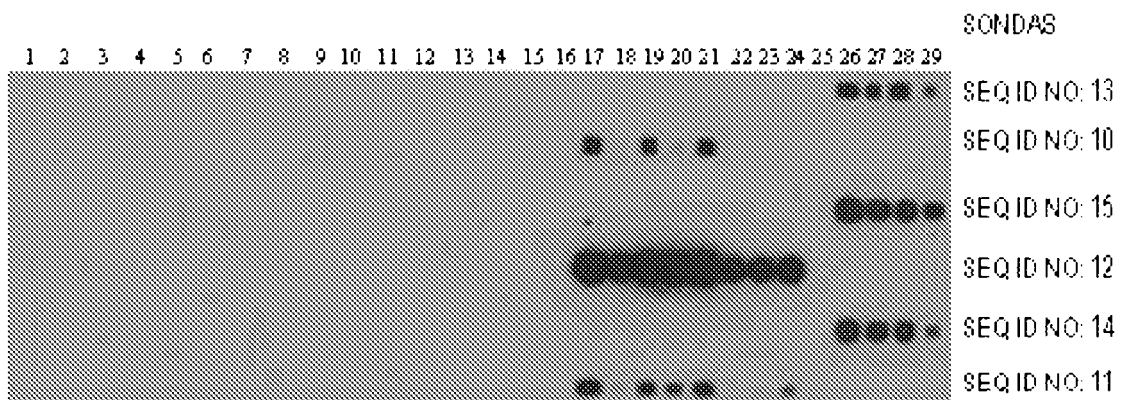


FIG. 1

ES 2 352 782 A1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Instituto de Salud Carlos III

5 <120> Método y kit para la detección molecular de *Tropheryma whipplei*

<130> ES1613.6

10 <160> 15

<170> PatentIn version 3.5

15 <210> 1

<211> 501

<212> DNA

20 <213> *Tropheryma whippelii*

<400> 1

25 tgacgggacc acaacatctg ttgtattagc ccaggctatg gtacgtgagg gcctcaaaaa 60
 cgtggctgct ggtgctgatc ctatcagttt gcgccggggt attgagaagt ctgttgctgc 120
 ggtatcgaaa gcgcttctca cctccgcgaa agaggttgag actgaggcag aaatcgctgc 180
30 ctgcgccctg atctctgccg gggatccgca gataggggat attattgccc aagcactcga 240
 gaaggttggc aaggaaggcg ttgtcactgt cgaggagtca aatactttcg ggaccgaact 300
 cgagataacc gagggcatgc gttttgataa aggctacctt tcggcttatt ttgtaaccga 360
35 tgcggagcgg caggaaacgg tttttgagaa cccttacatt cttattttgtg atagcaaaat 420
 atcgagtgtt aaagatctgc tcccggttgt tgacaagggt atccagtctg gtaagcaact 480
40 tcttatcatt gctgaagatg t 501

<210> 2

45 <211> 257

<212> DNA

<213> *Tropheryma whippelii*

50 <400> 2

 gccacactgt taggattatc ttcattgagg ttatcttgcg accgtctttt attctttcga 60
55 cgataacggg tcttttgatc ataagaaaa gtacaagggg cgtaactgga tatatcaaac 120
 taatcccctg ggtatcctgg gtgcttttac ttgttttcca gtacgtgggt tataaaaagta 180
 gggtggatgc atgtgacac agtaccgaag atgggtcaag gcgtaaaca gcatcaagaa 240
60 caaaaacaga gggcgctc 257

<210> 3

65 <211> 225

<212> DNA

<213> *Tropheryma whippelii*

ES 2 352 782 A1

<400> 3

gaccccagtc tcttatcttg tctatatatt tgttgacggg cccggttata ccagttaccc 60
5 aaccgtttat tttggttagt cctgttttgg ttgagtttag gaatttgagg tgagctgtgt 120
ctgttaggta ggtgaagaag tcctttagag aggttagaac agatttttga aagttattta 180
10 cagcaccggt tacagttttt atctgctcat tgacagactt gagag 225

<210> 4

<211> 23

15 <212> DNA

<213> *Tropheryma whippelii*

<400> 4

20 tgacgggacc acaacatctg ttg 23

<210> 5

<211> 25

<212> DNA

<213> *Tropheryma whippelii*

30

<400> 5

35 acatcttcag caatgataag aagtt 25

<210> 6

<211> 23

<212> DNA

40 <213> *Tropheryma whippelii*

<400> 6

45 gccacactgt taggattatc ttc 23

<210> 7

50 <211> 23

<212> DNA

<213> *Tropheryma whippelii*

55 <400> 7

gacgccctct gtttttgttc ttg 23

60

<210> 8

<211> 22

<212> DNA

65 <213> *Tropheryma whippelii*

ES 2 352 782 A1

	<400> 8	
5	gaccccagtc tcttatcttg tc	22
	<210> 9	
	<211> 23	
10	<212> DNA	
	<213> <i>Tropheryma whippelii</i>	
	<400> 9	
15	ctctcaagtc tgtcaatgag cag	23
	<210> 10	
20	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> <i>Tropheryma whippelii</i>	
25	<400> 10	
	gcgaaagagg ttgagactga gg	22
30	<210> 11	
	<211> 21	
	<212> DNA	
35	<213> <i>Tropheryma whippelii</i>	
	<400> 11	
40	gcacagtacc aaggatgggt c	21
	<210> 12	
45	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> <i>Tropheryma whippelii</i>	
50	<400> 12	
	gttatttaca gcaccgggta cag	23
55	<210> 13	
	<211> 22	
	<212> DNA	
60	<213> <i>Tropheryma whippelii</i>	
	<400> 13	
65	gcgaaacacc ttcacactga gg	22

ES 2 352 782 A1

<210> 14

<211> 21

<212> DNA

5 <213> *Tropheryma whippelii*

<400> 14

10 cgagactagg aaccatccct g

21

<210> 15

<211> 23

15 <212> DNA

<213> *Tropheryma whippelii*

20 <400> 15

cttatttaga cgaggtctta gac

23

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 200930374

②② Fecha de presentación de la solicitud: 29.06.2009

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **C12Q1/68** (01.01.2006)
C12R1/01 (01.01.2006)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	FENOLLAR F. et al., "Use of genome repeated sequences increases the sensitivity of PCR detection of Tropheryma whipplei" . Journal of Clinical Microbiology, (2004), vol. 42, nº 1, pág. 401-403.	1-15
A	ROLAIN JM., et al., "False positive PCR detection of Tropheryma whipplei in the saliva of healthy people". Biomedcentral (2007), [en línea] Recuperado de Internet [recuperado el 18.01.2011] <URL://http://www.biomedcentral.com/1471-2180/7/48.	1-15
A	MORGENEGG S. et al., "Cloning and sequencing of a part of the heat shock protein 65 gene (hsp65) of Tropheryma whippelii and its use for detection of Tropheryma whippelii in clinical specimens by PCR". Journal of Clinical Microbiology (2000), vol. 38, nº 6, pág. 2248-2253.	1-15
A	ES 2287287 T3 (UNIV AIX-MARSEILLE II) 16.12.2007	1-15
A	ES 2269115 T3 (UNIV AIX-MARSEILLE II) 01.04.2007	1-15

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
25.01.2011

Examinador
M. Hernandez Cuellar

Página
1/4

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

C12Q, C12R

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

INVENES, EPODOC

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 25.01.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-15	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-15	SI
	Reivindicaciones	NO

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

Base de la Opinión.-

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

1. Documentos considerados.-

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	FENOLLAR F. et al., "Use of genome repeated sequences increases the sensivity of PCR detection of <i>Tropheryma whipplei</i> " . Journal of Clinical Microbiology, (2004), vol. 42, nº 1, pág. 401-403.	
D02	ROLAIN JM., et al., "False positive PCR detection of <i>Tropheryma whipplei</i> in the saliva of healthy people". Biomedcentral (2007), [en línea] Recuperado de Internet [recuperado el 18.01.2011] <URL://http://www.biomedcentral.com/1471-2180/7/48.	
D03	MORGENEGG S. et al., "Cloning and sequencing of a part of the heat shok protein 65 gene (hsp65) of <i>Tropheryma whippelii</i> and its use for detection of <i>Tropheryma whippelii</i> in clinical specimens by PCR". Journal of Clinical Microbiology (2000), vol. 38, nº 6, pág. 2248-2253.	
D04	ES 2287287 T3 (UNIV AIX-MARSEILLE II)	16.12.2007
D05	ES 2269115 T3 (UNIV AIX-MARSEILLE II)	01.04.2007

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente invención describe un método para la detección específica de la bacteria *Tropheryma whipplei*, en una muestra biológica aislada, mediante una PCR triplex en la que se amplifican, con pares de cebadores específicos, uno o más fragmentos de las secuencias parciales de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO: 3, donde dichas secuencias parciales corresponden, respectivamente, a secuencias parciales de la secuencia nucleotídica del gen que codifica la proteína HSP (Heat Shock Protein) de 65 k Da, de la secuencia nucleotídica de NCDRC (Non coding degenerated repeat cluster) y de la secuencia nucleotídica del gen que codifica una proteína de la familia WISP (WNT1 inducible signaling pathway) de *Tropheryma whipplei*. La detección de los productos se lleva a cabo por medio de sondas específicas complementarias a dichos productos. Asimismo, la presente invención se refiere a un kit que comprende los cebadores y sondas específicas

1.- NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA.

Los documentos D01-D05 definen el estado de la técnica relativo a la invención de la presente solicitud. Todos ellos describen métodos de detección de *Tropheryma whipplei* basados en la tecnología PCR.

En el documento D01 los autores han identificado siete secuencias repetidas presentes en el genoma de *Tropheryma whipplei* que utilizan para desarrollar un ensayo PCR que, comparado con otros ensayos PCR, aumenta la sensibilidad sin alterar la especificidad.

El documento D02 describe un método de detección PCR de falsos positivos de *Tropheryma whipplei* en saliva de personas sanas. El objetivo del estudio es comparar los resultados de ensayos PCR previamente publicados que utilizaban cebadores específicos del gen 16s rRNA con el ensayo PCR en tiempo-real, en 57 muestras de saliva, que utiliza las sondas Taqman específicas de genes repetidos que solo se encuentran en el genoma de *Tropheryma whipplei*.

El documento D03 describe un método de detección de *Tropheryma whipplei* que se lleva a cabo mediante una PCR-semianidada que utiliza como diana un fragmento de 620 pb del gen que codifica la proteína hsp65.

Finalmente los documentos D04 y D05 se refieren a ensayos de detección PCR de *Tropheryma whipplei* en los que se utiliza como diana fragmentos de la proteína rpoB de esta bacteria.

Ninguno de estos documentos describe los cebadores y sondas reivindicados en la invención de la presente solicitud, así como tampoco en ninguno se realiza o sugiere la posibilidad de realizar el ensayo de detección mediante una PCR triplex. En este sentido, en opinión de esta Oficina, las reivindicaciones 1-15 son nuevas e implican actividad inventiva.