

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 477 441**

21 Número de solicitud: 201300080

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

16.01.2013

43 Fecha de publicación de la solicitud:

16.07.2014

Fecha de la concesión:

09.03.2015

45 Fecha de publicación de la concesión:

16.03.2015

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE SEVILLA (100.0%)
OTRI - Pabellón de Brasil, Paseo de las Delicias
s/n
41012 Sevilla (Sevilla) ES**

72 Inventor/es:

**CUTILLAS BARRIOS , Cristina y
CALLEJÓN FERNÁNDEZ , Rocío**

54 Título: **Uso de enzimas de restricción como marcadores moleculares para el diagnóstico de la Tricuriasis humana y otras Tricuriasis de origen animal**

57 Resumen:

Uso de enzimas de restricción como marcadores moleculares para el diagnóstico de la Tricuriasis humana y otras Tricuriasis de origen animal consistente en un procedimiento específico basado en marcadores moleculares para diferenciar qué especie de Trichuris está infectando al hombre, o qué especie de Trichuris está presente en cualquier muestra de heces, aguas, u otras; para aplicarse al diagnóstico, epidemiología, control y profilaxis, y tratamiento de la Tricuriasis humana y animal.

ES 2 477 441 B1

DESCRIPCIÓN

Uso de enzimas de restricción como marcadores moleculares para el diagnóstico de la Tricuriasis humana y otras Tricuriasis de origen animal.

5

OBJETO DE LA INVENCION

El objeto de la invención, según se expresa en el enunciado de esta memoria descriptiva, es la utilización de un procedimiento de diferenciación específica del género *Trichuris* basado en marcadores moleculares específicos para aplicarse al diagnóstico, epidemiología, control y profilaxis, y tratamiento de la tricuriasis humana y animal.

10

El área científica a la que corresponde la invención sería la de "Parasitología molecular" y el Sector de Actividad sería prioritariamente en el sector farmacéutico y, en general, en el sector sanitario. Es decir, la misma sería aplicable en el campo de la sanidad para el diagnóstico de la tricuriasis, en el campo de la epidemiología para llevar a cabo estudios de prevalencia, incidencia, zoonosis, así como en la detección de huevos de *Trichuris* en el análisis de aguas residuales, en vistas a poder llevar unas mejores y fiables medidas de control, así como en el campo de la industria farmacéutica para la elaboración de nuevas terapias (vacunas) para la tricuriasis y en terapias de la enfermedad de Crohn.

15

20

ANTECEDENTES EN EL ESTADO DE LA TÉCNICA

Los parasitismos gastrointestinales por helmintos son considerados como las infecciones parásitas más comunes. De hecho, más de un cuarto de la población mundial se encuentra infectada, siendo, de las infecciones humanas crónicas de cualquier tipo, la más prevalente. La mayoría de estas infecciones son atribuidas a cuatro especies de nematodos, cada una de ellas infecta a cientos de millones de personas. Estas especies, en orden de abundancia, son: *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Necator americanus* y *Ancylostoma duodenale*. Aunque la extraordinaria abundancia de estos nematodos se ha investigado ampliamente durante muchos años, el reconocimiento global de la importancia sanitaria de estas infecciones no se estableció hasta 1980, en que la

25

30

Organización Mundial de la Salud (OMS) reactivó un programa de investigación y control de estas infecciones helmínticas gastrointestinales.

5 Las especies del género *Trichuris* son nematodos parásitos del ciego de distintos hospedadores. Presentan un ciclo biológico directo; una vez que el gusano se asienta en el epitelio de la luz intestinal, empieza a madurar y crece, mudando a través de cuatro estados larvarios hasta adulto. En este estado, el gusano penetra en el epitelio por su parte anterior quedando el final posterior libre en el lumen. El gusano adulto parece alimentarse de material enterocítico y sangre, siendo responsable de una enfermedad en 10 el hombre conocida como tricuriasis. La tricuriasis es un parasitismo que afecta a un billón de personas en el mundo a través de áreas templadas y tropicales. Su agente etiológico, *Trichuris trichiura*, es parásito de la mucosa del colon humano en la cual produce inflamación. La tricuriasis es probablemente la segunda infección parásita humana más común en las regiones tropicales. No obstante, sería un error considerar a *T. trichiura* 15 como un parásito exclusivamente tropical, y así, aunque la infección es, hoy en día, más prevalente en regiones tropicales cálidas y húmedas, también se produce en zonas diferentes a los trópicos.

Unidos a estos datos de tipo epidemiológico, tenemos el hecho de que la infección 20 zoonótica en *Trichuris* parece posible, y así lo demuestran las citas de infección humana con el tricúrido del perro (*T. vulpis*) (Burrows y Lillis, 1960; Harper y col., 1964; Kenney y Yermakov, 1980; Mirdha y col., 1998; Dunn y col., 2002) o infecciones mixtas con ambas especies (Vazquez y col., 1997). Sin embargo, parece mucho más probable la infección zoonótica con el tricúrido del cerdo (*T. suis*), ya que infecciones accidentales y en 25 voluntarios humanos que han sido infectados con *T. suis* indican que esta última especie es capaz de producir huevos totalmente viables durante algunos meses (Beer, 1976). Así, en muchas localidades donde los cerdos viven en las cercanías de los humanos es muy probable que se produzca la infección zoonótica. La diferenciación específica de los huevos de *Trichuris trichiura*, *T. suis* y especies afines está basada en el tamaño del 30 huevo. Sin embargo, Yoshikawa y col. (1989) mencionaron la presencia de huevos de *Trichuris trichiura* con dos tamaños diferentes obtenidos a partir del útero de los gusanos adultos. Por otra parte, cabe destacar que algunos antihelmínticos tienen un efecto sobre el sistema reproductivo de las hembras de *T. trichiura*, favoreciendo así la producción de

5 huevos anormales, lo que podría conducir a un mal diagnóstico de la infección, ya que pueden confundirse con los huevos de otros parásitos o artefactos (Ferrer-Rodríguez y Kozek, 2007). De esta forma, hasta el momento, no existe ninguna característica o técnica que diferencie los huevos de las distintas especies de *Trichuris*, salvo el hecho de encontrarse o aislarse de un hospedador determinado.

10 Por otra parte, las especies del género *Trichuris* están entre las más comúnmente detectadas en las aguas residuales españolas. Los huevos del parásito causante de la tricuriasis humana, *Trichuris trichiura* son morfológicamente casi idénticos a los de *Trichuris suis* y están considerados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como uno de los tres bioindicadores preferidos para valorar la calidad de un agua regenerada. De ahí la importancia que adquiere una buena y fiable determinación específica.

15 Actualmente, las especies del género *Trichuris* han sido citadas como helmintos con unas características idóneas para ser utilizadas en la terapia de enfermedades autoinmunes, tales como la enfermedad de Crohn, la esclerosis múltiple y la diabetes tipo I (Elliott y col., 2007). Estas enfermedades resultan de la destrucción de tejidos debido a un proceso inflamatorio, y son prevalentes en países industrializados, muy desarrollados, siendo escasas en países poco desarrollados. Este hecho parece estar en relación con la
20 exposición humana a los helmintos en países poco desarrollados y a la escasa o total ausencia de éstos en los países más desarrollados. Los helmintos disminuyen la respuesta inmune en humanos que están parasitados de forma natural y reduce la inflamación en la colitis experimental. Así, la exposición a los helmintos puede ayudar a prevenir o incluso a paliar la enfermedad de Crohn. En este sentido, se han llevado a cabo
25 algunos ensayos por diversos autores (Sumners y col., 2005, Kradin y col., 2006) valorando la eficacia y seguridad del tratamiento de la enfermedad de Crohn con el helminto intestinal *Trichuris suis*. Los resultados obtenidos apuntan a que esta nueva terapia puede ofrecer una alternativa segura, eficaz y única en la enfermedad de Crohn. Estos mismos resultados también soportan la premisa de que la exposición natural a los
30 helmintos tales como *Trichuris suis* proporciona protección a las enfermedades inmunológicas como la enfermedad de Crohn.

Las especies de *Trichuris* tienen muchas características que las hacen buenas candidatas para su uso clínico. En concreto, *T. suis* tiene características adicionales que lo hacen un

candidato atractivo: puede obtenerse en grandes cantidades con absoluta pureza de cerdos criados en un ambiente específico libre de patógenos y no causa enfermedad humana, y, por lo tanto, disminuye el riesgo de su uso.

5 Actualmente existen varias técnicas de examen para detectar la presencia de huevos de parásitos en muestras fecales, incluyendo el examen fecal directo, la técnica de la concentración del formol-éter (Ridley y Hawgood, 1956; Allen y Ridley, 1970), la técnica de Kato-Katz (Katz y col., 1972; Peters y col., 1980), la técnica de McMaster (Who, 2008), y la técnica recientemente descrita de FLOTAC® (Cringoli, 2006). Entre ellas, la técnica
10 de Kato-Katz (Peters y col., 1980) es la más comúnmente utilizada (Knopp, 2008; Goodman y col., 2007; Utzinger y col., 2008), debido a la facilidad de su uso en el campo y al costo relativamente bajo. La técnica de Kato-Katz es recomendada por la Organización Mundial de la Salud (WHO) para la vigilancia y las encuestas epidemiológicas de las geohelmintiasis (Who, 1994; Montresor y col., 1998). Diversos
15 autores han citado que la presencia de huevos en muestras diarias fecales varía (Hall, 1982; Anderson y Schad, 1985; Marti y Koella, 1993; Booth y col., 2003) y, por lo tanto, la sensibilidad de la técnica de diagnóstico usada para determinar la tricuriasis queda limitada al día de toma de muestras para el diagnóstico de la infección. Así, varios autores (Utzinger y col., 2008, Booth y col., 2003) recomendaron el análisis de muestras fecales
20 durante días consecutivos para mejorar la sensibilidad de la prueba, pero a mayor sensibilidad menor especificidad de esta técnica.

Hasta la fecha, la identificación y clasificación de muchas especies parásitas se ha basado casi exclusivamente en criterios morfológicos y, con menos frecuencia, en la especificidad
25 del parásito a su hospedador. No obstante, teniendo en cuenta el grado de variabilidad morfológica de los parásitos, y la influencia que el hospedador u otros factores pueden ejercer sobre esta variación, se ha llegado al convencimiento de la necesidad de evaluar otros criterios en los estudios taxonómicos y diagnósticos. Por lo tanto, se requieren mejores métodos de caracterización para una definición más precisa de los parásitos del
30 hombre y de los animales, así como posibles hospedadores reservorios. Es más, se requiere una mejor comprensión de la diversidad genética de los organismos parásitos ya que muchos helmintos, que son morfológicamente idénticos, parecen tener distintos factores tales como infectividad, patogenicidad, inmunogenicidad y sensibilidad a la droga.

Las técnicas moleculares han sido aplicadas para la diferenciación de las especies del género *Trichuris* (Oliveros y col., 2000; Cutillas y col., 2002, 2004 y 2007) basadas en la amplificación y secuenciación del segmento ribosómico que comprende los espacios
5 internos transcritos (ITS) 1 y 2 y el gen 5,8S. El resultado del estudio llevado a cabo por Oliveros y col. (2000) en base al ITS2 fue la identificación de sinonimias entre *Trichuris ovis* y *Trichuris globulosa* y la observación de un alto porcentaje de variabilidad entre las especies *Trichuris ovis*, *T. suis* y *T. leporis* confirmando el valor diagnóstico de estas técnicas. El estudio realizado en el año 2002 en base al fragmento ribosómico ITS1-5,8S-
10 ITS2 permitió discernir entre dos especies distintas de tricúridos (*Trichuris muris* y *T. arvicolae*) en 3 hospedadores distintos de roedores. Seguidamente, en el año 2004, se caracterizaron molecularmente distintas poblaciones de *T. ovis* y *T. globulosa*, *T. leporis* y *T. skrjabini*. El resultado fue la identificación de sinonimias entre *T. ovis* y *T. globulosa*.

15 La concesión de un Proyecto (CGL2004-00630/BOS) en el año 2004 nos permitió llevar a cabo un estudio morfológico, biométrico y molecular de *Trichuris suis* aislado de distintos hospedadores (cerdo y jabalí), de *Trichuris vulpis* aislado del perro y *Trichuris trichiura* aislado del mono y del hombre, en el que se ensayaban técnicas moleculares de amplificación de ADN mediante PCR al estudio de la epidemiología y control de la
20 tricuriasis, basándose en las secuencias obtenidas del fragmento ITS1-5,8S-ITS2 del ADN ribosómico.

Los resultados publicados en nuestro trabajo (Parasitology Research, 2007) llamó la atención a grupos que trabajaban en la terapia de la enfermedad de Crohn, por tratarse,
25 precisamente, de una terapia a base de la administración de huevos de *Trichuris suis*. Así, el Dr. Bernhard Tewes de Falk Pharma GMBH, Alemania, se interesó por nuestra investigación y solicitó asesoramiento en cuanto a las técnicas moleculares a llevar a cabo para la identificación de esta especie parásita. Los estudios llevados a cabo en colaboración con la empresa farmacéutica alemana Dr. Falk Pharma GMBH, nos permitió
30 poner a punto un test de identidad para huevos de *T. suis* basado en técnicas de PCR (Cutillas y col., 2009). En este trabajo, se hace una revisión de las características diferenciales utilizadas hasta ese momento para distinguir ambas especies.

Actualmente, la diferenciación específica y el diagnóstico de la tricuriasis se basa en la detección de huevos en heces de acuerdo a las características morfológicas de éstos. Esto constituye un doble problema: por una parte, los huevos de las distintas especies de *Trichuris* son prácticamente idénticos, y por otra, que el número de huevos en heces es muy bajo y, en algunos casos se aconseja la utilización de técnicas combinadas para evitar los falsos negativos. Estos problemas se solucionan con la utilización de marcadores moleculares específicos que permiten la identificación de huevos en heces de manera específica. Hasta ahora existen en el mercado kits específicos para llevar a cabo la extracción de ADN a partir de muestras de heces, pero esta invención aporta, el procedimiento, los cebadores y las enzimas de restricción específicas necesarias para llevar a cabo el diagnóstico específico.

EXPLICACIÓN DE LA INVENCIÓN

A modo de explicación de la invención "Uso de enzimas de restricción como marcadores moleculares para el diagnóstico de la Tricuriasis humana y otras tricuriasis de origen animal" es preciso remarcar cómo los diagnósticos directos basados en las características morfológicas de los huevos de *Trichuris* no permiten llevar a cabo un diagnóstico específico. La variabilidad morfológica de los huevos observada en una misma especie, la posibilidad de zoonosis: tricuriasis transmitidas por perros y cerdos, las condiciones climáticas y la migración poblacional, hace que actualmente, los estudios epidemiológicos llevados a cabo por las distintas agencias mundiales no puedan ser fiables al 100% y, por lo tanto, no se puedan tomar las medidas adecuadas para tratar, controlar y prevenir la tricuriasis.

Además, la invención propuesta supone un adelanto en el control de las aguas residuales, ya que el contenido de huevos de helmintos parásitos, como indicador del riesgo sanitario asociado con la reutilización de aguas regeneradas para riego sin restricciones, es uno de los parámetros de calidad incluidos en la tercera edición de las guías de la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicadas en el año 2006 bajo el título original de "*Guidelines for the safe use of wastewater, excreta and greywater*". La OMS recomienda un límite igual o inferior a 1 huevo de helmintos parásitos por litro de agua para la reutilización segura de un agua de riego sin restricciones, y un límite más restrictivo, igual o inferior a

0,1 huevo de helmintos parásitos por litro de agua, cuando personas menores de 15 años pueden verse expuestas al contacto con esas aguas.

5 El RD 1620/2007 por el que se establece el régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas en España recoge estas recomendaciones de la OMS y fija un valor máximo admisible de 1 huevo de nematodos intestinales en 10 litros de agua para diversas opciones de uso urbano, agrícola, industrial y ambiental del agua regenerada. Estos límites llevan asociado un protocolo de vigilancia que incluye, en la mayoría de los casos, una frecuencia quincenal de análisis parasitológicos del agua regenerada, estando 10 las especies del género *Trichuris* entre las más comúnmente detectadas en las aguas residuales españolas. Los huevos del parásito causante de la tricuriasis humana, *Trichuris trichiura* son morfológicamente casi idénticos a los de *Trichuris suis* y están considerados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como uno de los tres bioindicadores preferidos para valorar la calidad de un agua regenerada. De ahí la importancia que 15 adquiere una buena y fiable determinación específica.

A partir de la problemática indicada la invención propuesta consiste en un procedimiento específico basado en marcadores moleculares que nos permitirá diferenciar qué especie de *Trichuris* está infectando al hombre, o qué especie de *Trichuris* está presente en 20 cualquier muestra: heces, aguas, u otras, es decir, estos marcadores moleculares hacen viable realizar el diagnóstico en base al despliegue del siguiente procedimiento:

1. Recogida y detección del material objeto de estudio (huevos de las heces o del agua).
- 25 2. Cultivo a 32°C de estos huevos (Opcional en función de la carga parasitaria).
3. Extracción del ADN de los huevos extraídos con el kit comercial Dneasy Blood & Tissue Kit (Qiagen).
4. Amplificación del ADN con cebadores específicos para el gen de la *citocromo oxidasa 1* de las especies del género *Trichuris*.
- 30 5. Purificación del producto de PCR obtenido.
6. Digestión con enzimas de restricción específicas (endonucleasas) que nos diferencian las distintas especies de *Trichuris*.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

5 Para complementar la descripción que se está realizando y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características de la invención, de acuerdo con un ejemplo preferente de realización práctica de la misma, se acompaña como parte integrante de dicha descripción, un juego de figuras en donde con carácter ilustrativo y no limitativo, se ha representado lo siguiente:

10 FIGURA 1.- Esquema del procedimiento de amplificación y purificación del gen de la *citocromo oxidasa 1* a partir de huevos de *Trichuris* spp.

15 FIGURA 2.- Secuencias obtenidas para la *citocromo oxidasa 1* de las distintas especies de *Trichuris*. Estas secuencias han sido depositadas en GenBank y están protegidas hasta su publicación.

20 FIGURA 3.- Esquema de los puntos de corte específicos de las distintas enzimas de restricción en las secuencias del gen de la *citocromo oxidasa 1* de las distintas especies de *Trichuris*.

25 FIGURA 4.- Mapa de restricción característico de la endonucleasa *Hae III* para las distintas especies de *Trichuris* responsables del parasitismo en el hombre. MIX: marcador molecular; T.t: *Trichuris trichiura*; (H.s): *Homo sapiens*; C.g.k.: *Colobus guerezae kikuyensis*; T.s.: *Trichuris suis*; T.v.: *Trichuris vulpis*.

30 FIGURA 5.- Mapa de restricción característico de la endonucleasa *Mse I* para las distintas especies de *Trichuris*. MIX: marcador molecular; T.t: *Trichuris trichiura*; (H.s): *Homo sapiens*; C.g.k.: *Colobus guerezae kikuyensis*; T.s.: *Trichuris suis*; T.v.: *Trichuris vulpis*. T.m.: *Trichuris muris*; T.A.: *Trichuris arvicolae*; T.sk.: *Trichuris skrjabini*; T.d.: *Trichuris discolor*; T.o.: *Trichuris ovis*; EL: marcador molecular.

EJEMPLO DE REALIZACION

5 Así, mediante la invención “Uso de enzimas de restricción como marcadores moleculares para el diagnóstico de la Tricuriasis humana y otras tricuriasis de origen animal” se propone la utilización de un procedimiento basado en la utilización de marcadores moleculares para la diferenciación específica del género *Trichuris*.

10 La mayoría de los trabajos publicados en los últimos años han ido dirigidos a la perfección y aplicación de técnicas moleculares al diagnóstico y epidemiología de las enfermedades parasitarias. Así, las técnicas moleculares no son complicadas y ofrecen enormes ventajas frente a las técnicas convencionales en su aplicación al estudio sistemático de parásitos (Prichard, 1997) ya que: el ADN es más estable que las proteínas; los ácidos nucleicos tienen una especial capacidad para hibridar con otra cadena sencilla de ácido nucleico similar, ofreciendo un amplio rango de ventajas. La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) permite la posibilidad de amplificar múltiples secuencias determinadas de ADN o ARN. La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Saiki y col., 1988) es un método muy utilizado, ya que permite el análisis de genes con cantidades mínimas de material parásito (Gasser y col., 1993; Campbell y col., 1995), y no requiere elementos radiactivos. Entre los métodos basados en la PCR más utilizados están: PCR- fragmentos de restricción (PCR-RFLP).

25 La técnica conocida como PCR-RFLP, es un método que detecta la mínima variación en un gen cuando se produce una sustitución de una sola base, si ésta ha originado la creación de un sitio capaz de ser digerido por un enzima de restricción, o bien ha originado la desaparición de éste. Las Endonucleasas de Restricción son enzimas de origen bacteriano capaces de cortar o digerir la doble cadena de ADN, al reconocer una secuencia específica de entre 4 y 7 pares de bases. En esta técnica, la PCR se utiliza para amplificar una región del gen. El producto de la PCR es sometido a la digestión por una o varias endonucleasas de restricción. Estos productos digeridos se visualizan tras electroforesis en gel de agarosa, teñido con bromuro de etidio, bajo luz UV, observándose

el patrón de bandas característico. Este método requiere conocer previamente la porción del ADN a estudiar para poder comparar los patrones obtenidos.

5 Un detalle del procedimiento, como ejemplo a desplegar para la realización de la técnica y que nos ha llevado a los resultados que proponemos patentar, se relaciona a continuación:

1. Recogida del material objeto de estudio

10 Una vez que las muestras fecales llegan al laboratorio en botes herméticamente cerrados, se procede al examen microscópico, directo y tras concentración, de las heces para la visualización de huevos de *Trichuris*. La técnica de concentración utilizada es la de flotación en una solución de cloruro sódico sobresaturada (Schnieder y col., 1999, Cutillas y col., 2009).

15 Los huevos aislados, si son escasos, pueden ser cultivados en tubo a 32°C durante 3 a 4 semanas en solución de dicromato potásico al 0,2% (Horii y Usui, 1985).

2. Amplificación y secuenciación de huevos de *Trichuris* spp.

20 El estudio molecular de estos nematodos parásitos comprende varias etapas:

2.1. Extracción de ADN:

25 La técnica de extracción de ADN se basa en el protocolo del kit comercial Dneasy Blood & Tissue Kit (Qiagen). Una vez extraído el ADN, se somete a electroforesis una alícuota en un gel de agarosa al 0.8% y bromuro de etidio para su visualización.

2.2. Amplificación del gen *cox 1* del ADNmt (Figura 1)

30 Amplificación

El ADN extraído es sometido a una reacción de amplificación del fragmento de ADN objeto de estudio siguiendo el siguiente protocolo:

	<u>Componentes</u>	<u>Volumen</u>	<u>Concentración final</u>
5	Tampón de PCR 10x	5 µl	1x
	Mezcla de dNTP 10 mM	2 µl	0.4 mM cada uno
	Cl ₂ Mg 50 mM	3 µl	1.5 mM
	Cebadores (µM cada uno) 5 µl		1 mM cada uno
	Muestra de ADN 5 µl		
10	Taq DNA Polimerasa 5U/µl)	0.5 µl	2.5 Unidades
	Agua destilada c.s.p.	50 µl	

Los cebadores utilizados para la amplificación parcial del gen de la *citocromo c oxidasa* subunidad 1 (*cox1*) del ADNmt han sido diseñados específicamente a partir de los descritos por Folmer y col. (1994) y Nagano y col (1999):

HC02198F 5´-TGATTTTTTGGTCACCCTGAAGTTTA-3´ como cebador directo y
 CORA5´-ACYACATAGTAGGTRTCATG-3´ como reverso

Esta mezcla de reacción es sometida a los siguientes ciclos de temperaturas:

1. Un ciclo a 94°C durante 5 minutos

2. 40 ciclos consistentes en: 94 °C durante 60 segundos
 48 °C durante 60 segundos
 72 °C durante 60 segundos

3. Un ciclo a 72 °C durante 7 minutos.

Una vez terminada la reacción de PCR, la muestra se somete a una electroforesis en gel al 2% de agarosa en tampón TBE a voltaje constante, en presencia de bromuro de etidio y utilizando un marcador de pesos moleculares. Posteriormente, se observa el gel en un transiluminador, pudiéndose visualizar la banda correspondiente al fragmento de ADN objeto de estudio. Por último, se fotografía con el sistema KODAK 1D (Scientific imaging systems).

2.3. Purificación y secuenciación

La banda del producto PCR correspondiente, se extrae del gel de agarosa y se purifica siguiendo el protocolo del kit comercial de QIAEX II Extraction Kit (Qiagen). Los fragmentos de ADN amplificados se secuencian.

3. Estudio de las secuencias obtenidas a partir del ADN mitocondrial (Figura 2).

Se ha estudiado:

3.1. La variabilidad intraespecífica: Que se basa en conocer las diferencias de secuencias (variabilidad) entre individuos de una misma especie. Una vez conocidas se haya la secuencia patrón o consenso.

3.2. La variabilidad interespecífica: Se estudia comparativamente las secuencias obtenidas para *Trichuris trichiura*, *T. suis* y *T. vulpis*, responsables de parasitismos en el hombre y otras especies de este género con las posibles secuencias depositadas en el GenBank para estudiar la similitud existente entre las especies del género *Trichuris* y otras especies de nematodos parásitos.

4. Estudio comparativo de los datos obtenidos con otras especies de nematodos parásitos. Obtención de marcadores moleculares específicos (Figura 3, 4 y 5).

Esta fase del estudio ha consistido en utilizar programas como el Clustal W para llevar a cabo los alineamientos pertinentes y los cálculos de similitud y homología entre distintas especies. Así mismo, las secuencias obtenidas se han estudiado mediante el

programa “map” de GenBank para definir enzimas de restricción específicas que nos diferencien las especies de *Trichuris* estudiadas.

Los resultados obtenidos pueden observarse en la tabla que se muestra a continuación:

5

Enzima	<i>T. suis</i>	<i>T. vulpis</i>	<i>T. trichiura</i> (<i>Homo sapiens</i>)	<i>T. trichiura</i> (<i>Papio sp.</i>)	<i>T. trichiura</i> (<i>Colobus guereza kikuyensis</i>)	<i>T. arvicolae</i>	<i>T. muris</i>	<i>T. ovis</i>	<i>T. discolor</i>	<i>T. skrjabini</i>
<i>EcoR</i> I	-	230	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Mse</i> I	85, 244, 324, 348	-	75, 234	84, 243	252	84	51	84, 243, 299	-	92, 307
<i>Hae</i> III	-	-	87	96	-	-	63	156, 345	103	-
<i>Mfe</i> I	-	-	327	336	-	171	138	99	106, 178	-
<i>Pvu</i> II	-	-	246	255	-	-	-	255	-	-
<i>Ava</i> I	193	-	-	-	201	-	-	-	199	200
<i>Taq</i> I	194	-	-	-	202	-	-	54, 186	200	-
<i>Xho</i> I	193	-	-	-	201	-	-	-	199	-
<i>Pst</i> I	-	213	-	-	-	211	-	-	-	-
<i>Dra</i> I	86	-	76	-	-	85	52	85	-	93
<i>Bc</i> II	-	-	-	-	-	-	-	-	-	227
<i>BshT</i> I	-	-	-	-	359	-	-	-	-	244
<i>Ahl</i> I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	393
<i>Bsp19</i> I	-	-	-	-	-	336	-	-	-	-
<i>BfrB</i> I	-	373	-	-	380	-	-	371	-	-
<i>Avr</i> II	-	138	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Acc</i> III	-	-	-	-	-	-	-	314	-	-
<i>Aat</i> I	-	-	-	-	-	-	-	345	-	-

10 Así, el conocimiento de estos enzimas de restricción, nos permiten concretar la metodología para la identificación específica de los huevos de *Trichuris* en tres pasos:

1. Detección, extracción y amplificación del ADN de los huevos de *Trichuris* mediante cebadores específicos para la enzima *cox 1*.
2. Purificación del ADN amplificado
- 5 3. Digestión con enzimas de restricción específicas.

No se considera necesario hacer más extensa esta descripción para que cualquier expert en la materia comprenda el alcance de la invención y las ventajas que de la misma s derivan. Las técnicas empleadas y su aplicación, serán susceptibles de variación siempr
10 y cuando ello no suponga una alteración en la esencialidad del invento.

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Método de diagnóstico in vitro de Tricuriasis humana y otras de origen animal basado en el uso de enzimas de restricción como marcadores moleculares caracterizado por comprender las siguientes etapas:
- 10 a) Aislamiento de huevos de *Trichuris* de heces humanas, aguas residuales.
 - b) Cultivo a 32°C de estos huevos (opcional en función de la carga parasitaria).
 - c) Extracción de ADN de los huevos y amplificación mediante la técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) del gen *citocromo oxidasa 1*.
 - 15 d) Purificación y digestión del producto PCR con enzimas específicas.
- 20 2.- Método de diagnóstico in vitro de Tricuriasis humana y otras de origen animal según reivindicación primera donde las enzimas de restricción utilizadas son (endonucleasas) *Hae* III, *Mfe* I y *Pvu* II que cortan específicamente para *Trichuris trichiura* parásito del hombre pero no cortan en *T. suis* ni en *T. vulpis*.
- 25 3.- Método de diagnóstico in vitro de Tricuriasis humana y otras de origen animal según reivindicación primera donde las enzimas de restricción utilizadas son *Avr* II y *Eco* R I que cortan específicamente en *T. vulpis* parásito del perro y responsable de zoonosis en el hombre, pero no en *T. suis* ni en *T. trichiura*.
- 30 4.- Método de diagnóstico in vitro de Tricuriasis humana y otras de origen animal según reivindicación primera donde las enzimas de restricción utilizadas son *Ava* I, *Taq* I, *Xho* I que cortan específicamente en *Trichuris suis* parásito del cerdo y especie zoonótica para el hombre, pero no cortan en *T. vulpis* ni en *T. trichiura* parásito del hombre.
- 5.- Método de diagnóstico in vitro de Tricuriasis humana y otras de origen animal según reivindicación primera donde la enzima de restricción utilizada es la *Mse* I que diferencia

específicamente *Trichuris suis*, *T. vulpis*, *T. trichiura*, *T. arvicolae*, *T. muris*, *T. ovis*, *T. discolor* y *T. skrjabini*.

5 6.- Método de diagnóstico in vitro de Tricuriasis humana y otras de origen animal según reivindicación primera donde la enzima de restricción utilizada es la *Dra I* que corta específicamente para *Trichuris trichiura* parásito del hombre y *T. suis* pero no en *T. vulpis*.

10 7.- Enzimas de restricción como marcadores moleculares para el diagnóstico de la Tricuriasis según reivindicaciones 1, 2, 3, 4, 5 y 6 caracterizadas por las secuencias de la *citocromo oxidasa 1* de las que se han extraído las endonucleasas específicas, y que comprende las secuencias SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 9 y SEQ ID N° 10.

15 8.- Uso del método de diagnóstico in vitro de Tricuriasis humana y otras de origen animal según reivindicación primera para amplificar y secuenciar el gen de la *citocromo oxidasa 1* del ADN mitocondrial.

20 9.- Uso de enzimas de restricción como marcadores moleculares para el diagnóstico de la Tricuriasis humana y otras Tricuriasis de origen animal, según reivindicaciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8, caracterizado por sus cebadores diseñados para amplificar el gen de la *citocromo oxidasa 1* en todas las especies del género *Trichuris*; HC02198F como cebador directo y CORA como reverso, y que comprenden las secuencias SEQ ID N° 11 y SEQ ID N° 12, respectivamente.

FIGURA 1

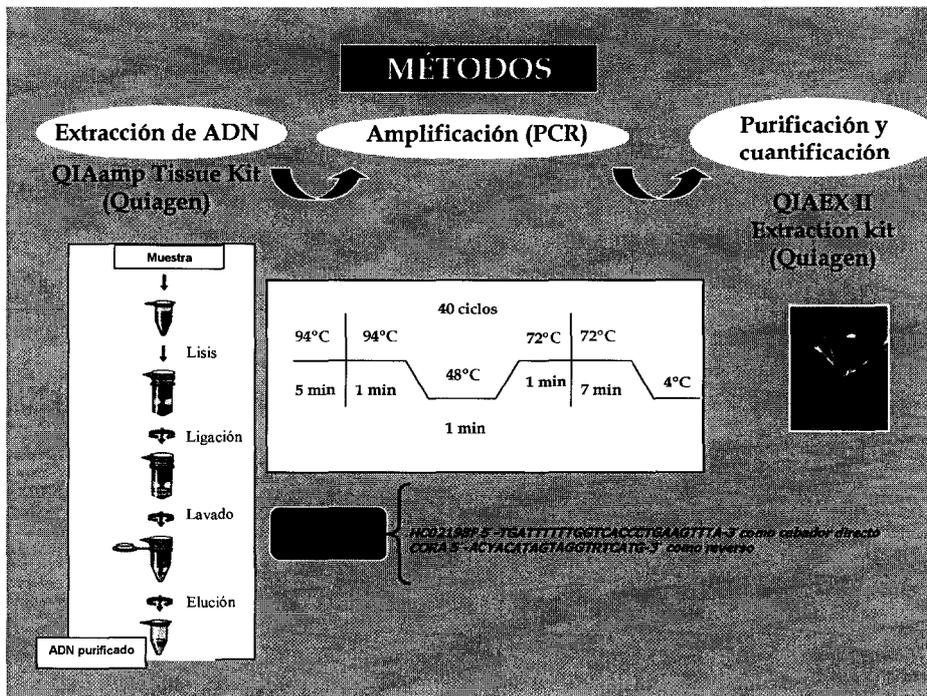


FIGURA 2

>*Trichuris arvicolae* (*Myodes glareolus*) Callejón y Cutillas, 2011 (**FR51284**)
 TTTGGGCATCCTGAGGTTTATATCTCGTATTGCCTGCATTCGGCGCAATTCAGAGTCTATTTTATTTATATCAGGC
 AAGTTTAAAGTGTGGTCCCTTAGGTATAATCTACGCTATAATAAGAATTGGTATTTTAGGATGTTTTGTGTGAGGA
 CATCATATATATAACAATTGGAATAGACGTTGACACTCGTGCTTACTTTACTGCAGCCACTATAATTATTGGTATTCCG
 ACCGGAGTAAAAATTTTAGGTGATTAGCAACACTTTATGGTAGAGCTAGACCAAATCACCTTTATTTTTATGGGTG
 ATTGGCTTCTTGGTGCTTTTACCATGGGAGGGCTCACAGGTGTATCACTTTCTAATGCCTCACTGGACTTATTATTA
 CATGATACATACTATGTAGT

>*Trichuris muris* (*Apodemus sylvaticus*) Callejón y Cutillas, 2012 (**HE653133**)
 ATCGCATTGGTGCGATTCAGAATCTATCTTATTCATATCGGGCAAATTTAAAGTATTTGGCCCTCTGGGTATAGTG
 TATGCCATAATAAGAATCGGAATCCTGGGTTGTTTTGTGTGAGGTCATCATATATATAACAATTGGTATAGATGTGGAT
 ACTCGTGCGTATTTACCAGCTGCTACTATAATTATTGGTATCCCTACGGGAGTAAAAATCTTTAGGTGATTAGCAACA
 CTTTACGGCAGAGCTAGACCGGATCTCCTTTATTTCTATGGGTTATTGGTTTCTGTACTTTTCACTATAGGAGGA
 CTCACGGGTGTGTCCCTTTCTAATGCGTCCCTAGATCTACTGTTACACGACACATACATATGTGGTAA

>*Trichuris vulpis* (*Canis lupus familiaris*) Callejón y Cutillas, 2012
 (**HE653138**)
 TTTTTGGTCACCCCTGAAGTATATATCTTGTGTTTTACCAGCGTTGGCGCTATTTCCGAATCTATTATGTTTCATAGCAG
 GAAAATTCAGGTATTTGGTCCATTAGGTATAGTATATGCCATGATAAGAATTGGTATCCTAGGATGCTTCGTTTGGG
 GGCATCATATATATACCATGGTATAGACATTGATACCCGTGCATATTTCACTGCAGCAACTATGATTATTGGAATTC
 CTACAGGAGTAAAAATTTTAGATGATTAGCAACATTATATGGAAGAGCCAGTTCCAAATCTCCTTTATATTTATGGG
 TAATTGGATTCTTAGTCTTTTCACTATAGGAGGACTTACCGGAGTTTCGTTATCAAATGCATCTCTTGATCTTTTAC
 TTCACGACACATACTATGTGGTAA

>*Trichuris discolor* (*Bos taurus*) Callejón y Cutillas, 2012 (**HE653139**)
 TTGATTTTTTGGTCACCCCTGAAGTTTATATCTTAGTCTTACCTGCGTTTCGGCGCAATTTCCGAGTCAATTTTATACAT
 AGCAGGTAAATTCAAAGTATTCGGCCCAATTGGAATAATCTACGCAATAATAAGAATCGGAATCCTTGGTTGCTTCGT
 ATGGGGGCACCATATATACACAATTGGAATAGACATTGATACTCGAGCCTACTTCACTGCTGCAACCATAATTATCGG
 AGTGCCAACAGGAGTCAAATCTTCAGTTGACTAGCCACATTATACGGAAGCGCCAGACCTTTTAGTCCGCTGATACT
 TTGAGTGTCTGGATTTTTAGTTTTATTCACTATAGGAGGACTAACTGGAGTTTCATTAGCAAACGCTTCACTAGATCT
 TTTAGTTCATGACACCA

>*Trichuris skrjabini* (*Capra hircus*) Callejón y Cutillas, 2012 (**HE653121**)
 TTTGGTCTTCGGACACCCCTGAAGTTTACATCCTAGTACTCCCAGCATTCCGGAATCTCAGAATCAATCCTATACA
 TAGCAGGGAAGTTTAAAGTATTCGGACCCCTCGGTATAATCTATGCAATAATAAGAATCGGAATCCTCGGCTGTTTTG
 TTTGGGGACACCATATATACACCATTTGGCATAGACGTTGATACCCGAGCTTACTTCACTGAGCCACTATGATCATCG
 GTATTCCAACCGGTGTGAAAATCTTTAGGTGATTAGCTACGCTCTATGGCTCAGCTTCTCCGAGATCTCCTTTAATAC
 TGTGAGTTTTAGGTTTTTTAGTATTATTTACTATAGGAGGACTCACAGGAGTTTCACTTGCCAACGCATCCCTTGATC
 TACTAGTTCATGATACCTACTACGTAGTA

>*Trichuris ovis* (*Capra hircus*) Callejón y Cutillas, 2012 (**HE653142**)
 TTTTTGGTCATCTGAGGTTTATATCTTAGTGCTGCCCGCATTGGTGCGATTCGAGTCTATTTTATACATAGCAGGA
 AAGTTTAAAGTATTCGGACCAATTGGAATAATTTACGCAATAATAAGAATTGGAATCCTTGGTTGTTTTGTATGAGGC
 CACCATATATACACAATCGGCATAGATATCGACACACGAGCTTACTTTACCGCCGCAACTATAATCATTGAGTCCCA
 ACAGGAGTTAAAATTTTACAGTACTAGCTACCTTATATGGGAGTGCTAGCCCTTCAACCCCTTTAATAATGTGAGTA
 TCCGGATTCTTAGTGTATTCACTATAGGAGGCCTTACCGGAGTTTCCTTAGCTAATGCATCACTAGATTTATTAGTT
 CATGACACCTACTATGTGGTA

>*Trichuris suis* (*Sus scrofa scrofa* y *Sus scrofa domestica*) Callejón y
 Cutillas, 2012 (**HE653128**, **HE653124**)
 TTTTGGGCATCCTGAGGTTTATATTTTAGTACTGCCTGCATTTGGTGCAATCTCTGAGTCTGTTATATTCATGTCAGG
 AAAATTTAAAGTTTTTGGACCTTTAGGAATAATCTATGCTATAATAAGTATTGGTATTTTAGGTTGCTTCGTATGAGG
 GCATCATATATATACCATTTGGAATAGACATTGACACTCGAGCATACTTTACAGCCGCAACTATAATCATCGGAGTTCC
 GACTGGCGTTAAAATTTTTAGATGATTGGCAACTCTATATGGTAACCTTGTCCAAATAACTCCTCTAATACTGTGAGT
 AATTGGGTTTTTAAATTTTACTATCGGAGGATTAACAGGAGTATCACTATCTAATGTTCCCTAGATTTATTGCTA
 CATGATACATACTATGTAGTA

>*Trichuris trichiura* (*Colobus guereza kikuyensis*) Callejón y Cutillas, 2012
 (**HE653118**)

TTTTGGTTCTTCGGACACCCAGAAGTATATATCCTAGTCCTTCCTGCCTTCGGAGTTATCTCTGAATCGGTTATATAT
ATAGCAGGAAAAGTTCAAAGTATTTGGACCCCTTAGGTATAATCTATGCAATAATAAGCATCGGGATTCTAGGATGCTTT
GTGTGAGGACACCACATATACACCATCGGCATAGACATTGACACTCGAGCTTACTTCACAGCCGCAACAATAATCATT
GGTGTGCCTACTGGTGTAAAATCTTCAGATGATTGGCTACTCTCTACGGCAACACCTGTCTGCTACTCCTTTGATG
CTATGAGTAATCGGATTCCTAGTACTATTTACTATAGGAGGTCTCACCGGTGTCTCTTTATCTAATGCATCCTTAGAC
TTACTCCTCCATGATACATACTATGTAGT

>*Trichuris trichiura* (*Papio* sp.) Callejón y Cutillas

TTTTGGGCATCCTGAGGTTTACATTTTAGTGCTCCCAGCATTGGGGCAATCTCTGAGTCATTATGTATATAGCAGGA
AAATTTAAGGTATTCGGCCCTTAGGAATGATTTACGCAATAATAAGAATTGGCATTTTAGGATGCTTCGTGTGGGGT
CATCATATATATACTATTGGCATAGATATTGACACCCGTGCTTATTTTACTGCCGCTACTATGATTATTGGTATTCCA
ACGGGCGTTAAAATTTTCAGCTGATTAGCCACATTATATGGTAGCTCTTCCTCACTTAGTCTCATACTATGAGTA
ATCGGTTTTCTTGTATTATTTACAATTGGTGGACTCACTGGAGTTTCTTTATCTAACGCCCTCGCTAGACCTTATACTC
CATGATACATACTATGTAGT

>*Trichuris trichiura* (*Homo sapiens*) Petrasova y col. 2011 (JF690962)

CCCGAAGTCTATATTTTAGTGCTGCCAGCATTGGAGCAATTTCTGAATCTATTATATATATAGCAGGAAAATTTAAA
GTGTTTGGCCCTTGGGAATAATCTATGCAATGATAAGCATCGGCATTCTAGGATGCTTTGTATGAGGGCACCACATA
TACACCATTTGGCATAGATATTGATACTCGTGCTTACTTTACTGCTGCCACTATAATTATTGGTATTCCAACAGGCGTT
AAAGGTTTCAGCTGATTAGCTACATTATATGGCAACTCTTCCCCGCTCAGTCCCCTAATATTATGGGTAATTGGATTC
CTTGACTGTTTACAATTGGAGGACTTACCGGAGTTTCTCTATCTAATGCTTCACTAAAT

FIGURA 3

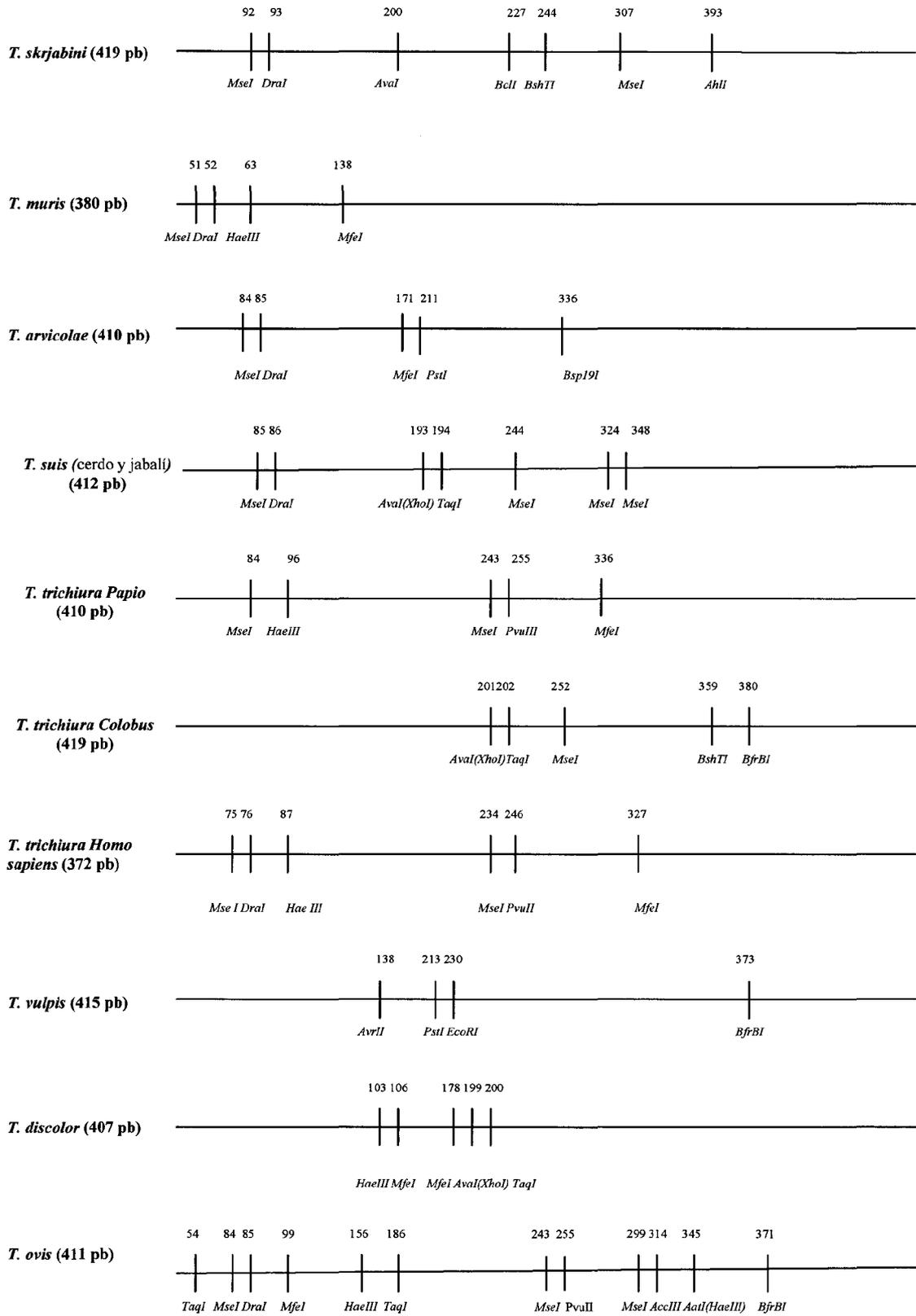


FIGURA 4

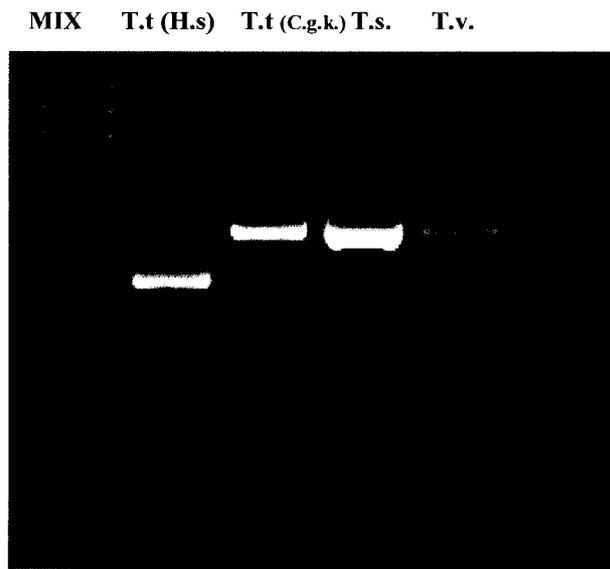
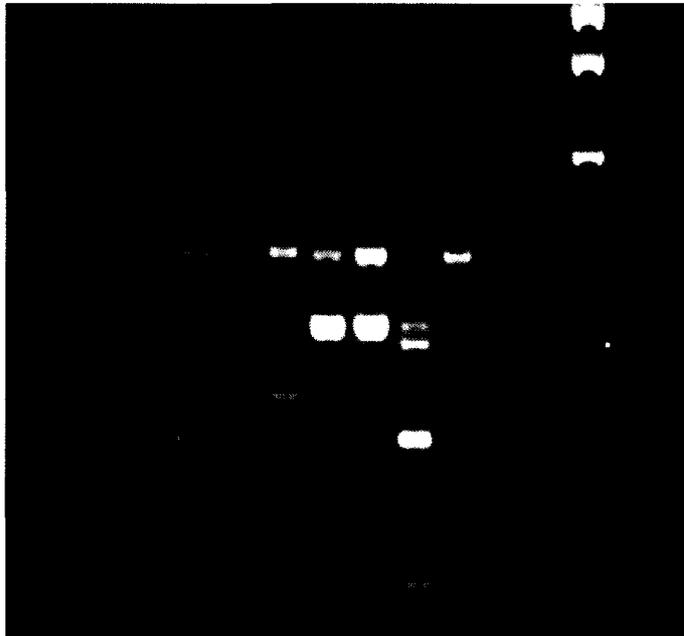


FIGURA 5

EL T.s.(j) T.s.(c) T.v. T.t.(P) T.t.(C)T.m T.a. T.sk T.d. T.o. T.o. MIX



LISTA DE SECUENCIAS

<110> Cutillas, C y Callejón, R. Universidad de Sevilla

<120> Uso de enzimas de restricción como marcadores moleculares para el diagnóstico de la Tricuriasis humana y otras Tricuriasis de origen animal.

<160> 10

<210> 1

<211> 410 pb

<212> ADN

<213> *Trichuris arvicolae* (*Myodes glareolus*) Callejón y Cutillas, 2011 (FR851284)

<400> 1

```
TTTGGGCATC CTGAGGTTTA TATTCTCGTA TTGCCTGCAT TCGGCGCAAT TTCAGAGTCT 60
ATTTTATTTA TATCAGGCAA GTTTAAAGTG TTTGGTCCTT TAGGTATAAT CTACGCTATA 120
ATAAGAATTG GTATTTTAGG ATGTTTTGTG TGAGGACATC ATATATATAC AATTGGAATA 180
GACGTTGACA CTCGTGCTTA CTTTACTGCA GCCACTATAA TTATTGGTAT TCCGACCGGA 240
GTAAAAATTT TTAGGTGATT AGCAACACTT TATGGTAGAG CTAGACCAA ATCACCTTTA 300
TTTTTATGGG TGATTGGCTT CTGGTGCCTT TTCACCATGG GAGGGCTCAC AGGTGTATCA 360
CTTTCATGCT CCTCACTGGA CTTATTATTA CATGATACAT ACTATGTAGT 410
```

<210> 2

<211> 380 pb

<212> ADN

<213> *Trichuris muris* (*Apodemus sylvaticus*) Callejón y Cutillas, 2012 (HE653133)

<400> 2

```
ATCGCATTTG GTGCGATTTT AGAATCTATC TTATTCATAT CGGGCAAAT TAAAGTATTT 60
GGCCCTCTGG GTATAGTGTA TGCCATAATA AGAATCGGAA TCCTGGGTTG TTTTGTGTGA 120
GGTCATCATA TATAIACAAT TGGTATAGAT GTGGATACTC GTGCGTATTT CACCGCTGCT 180
ACTATAATTA TTGGTATCCC TACGGGAGTA AAAATCTTTA GGTGATTAGC AACACTTTAC 240
GGCAGAGCTA GACCGGGATC TCCTTTATTT CTATGGGTTA TTGGTTTTCT TGTACTTTTC 300
ACTATAGGAG GACTCACGGG TGTGTCCCTT TCTAATGCGT CCCTAGATCT ACTGTTACAC 360
GACACATACA TATGTGGTAA 380
```

<210> 3

<211> 415 pb

<212> ADN

<213> *Trichuris vulpis* (*Canis lupus familiaris*) Callejón y Cutillas, 2012 (HE653138)

<400> 3

```
TTTTTGGTCA CCTGAAGTA TATATTCTTG TTTTACCAGC GTTTGGCGCT ATTTCGGAAT 60
CTATTATGTT CATAGCAGGA AAATTCAAGG TATTTGGTCC ATTAGGTATA GTATATGCCA 120
TGATAAGAAT TGGTATCCTA GGATGCTTCG TTTGGGGGCA TCATATATAT ACCATTGGTA 180
TAGACATTGA TACCCGTGCA TATTTTACTG CAGCAACTAT GATTATTGGA ATTCCTACAG 240
GAGTAAAAAT TTTTAGATGA TTAGCAACAT TATATGGAAG AGCCAGTTCC AAATCTCCTT 300
TATATTTATG GGTAAATTGGA TTCTTAGTTC TTTTCACTAT AGGAGGACTT ACCGGAGTTT 360
CGTTATCAAA TGCATCTCTT GATCTTTTAC TTCACGACAC ATACCTATGT GGTAA 415
```

ES 2 477 441 B1

<210> 4
 <211> 407 pb
 <212> ADN
 <213> *Trichuris discolor* (*Bos taurus*) Callejón y Cutillas, 2012 (HE653139)
 <400> 4

```
TTGATTTTTT GGCACCCCTG AAGTTTATAT CTTAGTCTTA CCTGCGTTCG GCGCAATTTTC 60
CGAGTCAATT TTATACATAG CAGGTAAATT CAAAGTATTC GGCCCAATTG GAATAATCTA 120
CGCAATAATA AGAATCGGAA TCCTTGTTG CTTTCGTATGG GGGCACCATA TATACACAAT 180
TGGAATAGAC ATTGATACTC GAGCCTACTT CACTGCTGCA ACCATAATTA TCGGAGTGCC 240
AACAGGAGTC AAAATCTTCA GTTGACTAGC CACATTATAC GGAAGCGCCA GACCTTTTAG 300
TCCGCTGATA CTTTGAGTGT CTGGATTTTT AGTTTTATTC ACTATAGGAG GACTAACTGG 360
AGTTTCATTA GCAAACGCTT CACTAGATCT TTTAGTTCAT GACACCA 407
```

<210> 5
 <211> 419 pb
 <212> ADN
 <213> *Trichuris skrjabini* (*Capra hircus*) Callejón y Cutillas, 2012 (HE653121)
 <400> 5

```
TTTGTTTCTT CGGACACCCT GAAGTTTACA TCCTAGTACT CCCAGCATTC GGAACATATCT 60
CAGAATCAAT CCTATACATA GCAGGGAAGT TTAAAGTATT CGGACCCCTC GGTATAATCT 120
ATGCAATAAT AAGAATCGGA ATCCTCGGCT GTTTTGTGTTG GGGACACCAT ATATACACCA 180
TTGGCATAGA CGTTGATACC CGAGCTTACT TCACCGCAGC CACTATGATC ATCGGTATTC 240
CAACCGGTGT GAAAATCTTT AGGTGATTAG CTACGCTCTA TGGCTCAGCT TCTCCGAGAT 300
CTCCTTTAAT ACTGTGAGTT TCAGGTTTTT TAGTATTATT TACTATAGGA GGACTCACAG 360
GAGTTTCACT TGCCAACGCA TCCCTTGATC TACTAGTTCA TGATACCTAC TACGTAGTA 419
```

<210> 6
 <211> 411 pb
 <212> ADN
 <213> *Trichuris ovis* (*Capra hircus*) Callejón y Cutillas, 2012 (HE653142)
 <400> 6

```
TTTTTGGTCA TCTGAGGTTT ATATCTTAGT GCTGCCCGCA TTTGGTGCGA TTTGAGTCT 60
ATTTTATACA TAGCAGGAAA GTTTAAAGTA TTCGGACCAA TTGGAATAAT TTACGCAATA 120
ATAAGAATTG GAATCCTTGG TTGTTTTGTA TGAGGCCACC ATATATACAC AATCGGCATA 180
GATATCGACA CACGAGCTTA CTTTACCGCC GCAACTATAA TCATTGGAGT CCCAACAGGA 240
GTTAAAATTT TCAGCTGACT AGCTACCTTA TATGGGAGTG CTAGCCCTTT CACCCCTTTA 300
ATAATGTGAG TATCCGGATT CTTAGTGTTA TTCACTATAG GAGGCCTTAC CGGAGTTTCC 360
TTAGCTAATG CATCACTAGA TTTATTAGTT CATGACACCT ACTATGTGGT A 411
```

<210> 7
 <211> 411 pb
 <212> ADN
 <213> *Trichuris suis* (*Sus scrofa scrofa* y *Sus scrofa domestica*) Callejón y Cutillas, 2012 (HE653128, HE653124)
 <400> 7

ES 2 477 441 B1

TTTTGGGCAT CCTGAGGTTT ATATTTTAGT ACTGCCTGCA TTTGGTGCAA TCTCTGAGTC 60
 TGTATATATC ATGTCAGGAA AATTTAAAGT TTTTGGACCT TTAGGAATAA TCTATGCTAT 120
 AATAAGTATT GGTATTTTAG GTTGCTTCGT ATGAGGGCAT CATATATATA CCATTGGAAT 180
 AGACATTGAC ACTCGAGCAT ACTTTACAGC CGCAACTATA ATCATCGGAG TTCCGACTGG 240
 CGTTAAAATT TTTAGATGAT TGGCAACTCT ATATGGTAAC TCTTGTCCAA TAACTCCTCT 300
 AATACTGTGA GTAATTGGGT TTTTAATTTT ATTCACTATC GGAGGATTAA CAGGAGTATC 360
 ACTATCTAAT GTTCCCTAGA TTTATTGCTA CATGATACAT ACTATGTAGT A 411

<210> 8

<211> 419 pb

<212> ADN

<213> *Trichuris trichiura* (*Colobus guereza kikuyensis*) Callejón y Cutillas, 2012 (HE653118)

<400> 8

TTTTGGTTCT TCGGACACCC AGAAGTATAT ATCCTAGTCC TTCCTGCCTT CGGAGTTATC 60
 TCTGAATCGG TTATATATAT AGCAGGAAAG TTCAAAGTAT TTGGACCCTT AGGTATAATC 120
 TATGCAATAA TAAGCATCGG GATTCTAGGA TGCTTTGTGT GAGGACACCA CATATACACC 180
 ATCGGCATAG ACATGACAC TCGAGCTTAC TTCACAGCCG CAACAATAAT CATTGGTGTG 240
 CCTACTGGTG TTAAAATCTT CAGATGATTG GCTACTCTCT ACGGCAACAC CTGTCCTGCT 300
 ACTCCTTTGA TGCTATGAGT AATCGGATTC CTAGTACTAT TTACTATAGG AGGTCTCACC 360
 GGTGTCTCTT TATCTAATGC ATCCTTAGAC TTACTCCTCC ATGATACATA CTATGTAGT 419

<210> 9

<211> 410 pb

<212> ADN

<213> *Trichuris trichiura* (*Papio* sp.) Callejón y Cutillas, 2013 (HG003692)

<400> 9

TTTTGGGCAT CCTGAGGTTT ACATTTTAGT GCTCCCAGCA TTTGGGGCAA TCTCTGAGTC 60
 ATTATGTATA TAGCAGGAAA ATTTAAGGTA TTCGGCCCCT TAGGAATGAT TTACGCAATA 120
 ATAAGAATTG GCATTTTAGG ATGCTTCGTG TGGGGTCATC ATATATATAC TATTGGCATA 180
 GATATTGACA CCCGTGCTTA TTTTACTGCC GCTACTATGA TTATTGGTAT TCCAACGGGC 240
 GTTAAAATTT TCAGCTGATT AGCCACATTA TATGGTAGCT CTTCTCACT TAGTCTCTC 300
 ATACTATGAG TAATCGGTTT TCTTGTATTA TTTACAATTG GTGGACTCAC TGGAGTTTCT 360
 TTATCTAACG CCTCGCTAGA CCTTATACTC CATGATACAT ACTATGTAGT 410

<210> 10

<211> 372 pb

<212> ADN

<213> *Trichuris trichiura* (*Homo sapiens*) Petrásová y col. 2011 (JF690962)

<400> 10

CCCGAAGTCT ATATTTTAGT GCTGCCAGCA TTTGGAGCAA TTTCTGAATC TATTATATAT 60
 ATAGCAGGAA AATTTAAAGT GTTTGGCCCC TTGGGAATAA TCTATGCAAT GATAAGCATC 120
 GGCATTTCTAG GATGCTTTGT ATGAGGGCAC CACATATACA CCATTGGCAT AGATATTGAT 180
 ACTCGTGCTT ACTTTACTGC TGCCACTATA ATTATTGGTA TTCCAACAGG CGTTAAAGTG 240
 TTCAGCTGAT TAGCTACATF ATATGGCAAC TCTTCCCCGC TCAGTCCCCT AATATTATGG 300
 GTAATTGGAT TCCTTGTAFT GTTTACAATT GGAGGACTTA CCGGAGTTTC TCTATCTAAT 360
 GCTTCACTAA AT 372

<210> 11
<211> 26 pb
<212> ADN
<213> *Trichuris discolor* (*Bos taurus*) Callejón y Cutillas, 2012 (HE653139)
<400> 11

TGATTTTTTG GTCACCCTGA AGTTTA 26

<210> 12
<211> 20 pb
<212> ADN
<213> *Trichuris discolor* (*Bos taurus*) Callejón y Cutillas, 2012 (HE653139)
<400> 12

ACYACATAGT AGGTRTCATG 20



- 21 N.º solicitud: 201300080
22 Fecha de presentación de la solicitud: 16.01.2013
32 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

5 Int. Cl.: **C12Q1/68** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	56 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	CUTILLAS C et al. Trichuris suis and Trichuris trichiura are different nematode species. ACTA TROPICA, 20090901 ELSEVIER SCIENCE BV., AMSTERDAM, NL 01.09.2009 VOL: 111 No: 3 Págs: 299-307 ISSN 0001-706X Doi: doi:10.1016/j.actatropica.2009.05.011.	7,9
Y		1-9
Y	LIU G -H et al. Characterization of the complete mitochondrial genomes of two whipworms Trichuris ovis and Trichuris discolor (Nematoda: Trichuridae). Infection, Genetics and Evolution 2012 Elsevier nld 12.2012 VOL: 12 No: 8 Págs: 1635-1641 ISSN 1567-1348 (print) ISSN 1567-7257 (electronic) Doi: doi:10.1016/j.meegid.2012.08.005.	1-9
Y	ROCIO CALLEJON et al. Molecular evolution of Trichuris muris isolated from different Muridae hosts in Europe. Parasitology Research. Agosto 2010. VOL: 107 No: 3 Págs: 631-641. ISSN 1432-1955.	1-9
Y	CALLEJON R et al. Phylogeography of Trichuris populations isolated from different Cricetidae rodents. Parasitology 2012 Cambridge University Press gbr 11.2012 VOL: 139 No: 13 Págs: 1795-1812 ISSN 0031-1820 (print) ISSN 1469-8161 (electronic) Doi: doi:10.1017/S0031182012001114.	1-9
A	WO 2013036929 A1 (UNIV LELAND STANFORD JUNIOR et al.) 14.03.2013, reivindicaciones 1,2,74,94.	1

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
09.04.2014

Examinador
J. Manso Tomico

Página
1/5

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

C12Q

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

INVENES, EPODOC, WPI, EMBASE, BIOSIS.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 09.04.2014

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-6, 8	SI
	Reivindicaciones 7, 9	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-9	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	Numero Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	CUTILLAS C et al. Trichuris suis and Trichuris trichiura are different nematode species. ACTA TROPICA, 20090901 ELSEVIER SCIENCE BV., AMSTERDAM, NL 01.09.2009 VOL: 111 No: 3 Págs: 299-307 ISSN 0001-706X Doi: doi:10.1016/j.actatropica.2009.05.011.	01.09.2009
D02	LIU G -H et al. Characterization of the complete mitochondrial genomes of two whipworms Trichuris ovis and Trichuris discolor (Nematoda: Trichuridae). Infection, Genetics and Evolution 2012 Elsevier nld 12.2012 VOL: 12 No: 8 Págs: 1635-1641 ISSN 1567-1348 (print) ISSN 1567-7257 (electronic) Doi: doi:10.1016/j.meegid.2012.08.005.	30.11.2012
D03	ROCIO CALLEJON et al. Molecular evolution of Trichuris muris isolated from different Muridae hosts in Europe. Parasitology Research. Agosto 2010. VOL: 107 No: 3 Págs: 631-641. ISSN 1432-1955.	15.05.2010
D04	CALLEJON R et al. Phylogeography of Trichuris populations isolated from different Cricetidae rodents. Parasitology 2012 Cambridge University Press gbr 11.2012 VOL: 139 No: 13 Págs: 1795-1812 ISSN 0031-1820 (print) ISSN 1469-8161 (electronic) Doi: doi:10.1017/S0031182012001114.	31.10.2012
D05	WO 2013036929 A1 (UNIV LELAND STANFORD JUNIOR et al.)	14.03.2013

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 solicitud divulga, en la reivindicación 1, un método de diagnóstico in vitro de Tricuriasis basado en el uso de enzimas de restricción para cortar el ADN producto de la amplificación del gen citocromo oxidasa 1 y posterior análisis de los fragmentos de restricción.

Las reivindicaciones 2-6, 8 caracterizan el método por las combinaciones de endonucleasas utilizadas. La reivindicación 7, 9, aunque están dirigidas a las enzimas de restricción y su uso, no aporta ningún dato estructural de estas enzimas, sino que caracteriza los fragmentos PCR de la citocromo oxidasa amplificados y los cebadores utilizados para su amplificación.

D01 divulga el uso de un análisis PCR-RFLP para el análisis de la secuencias ITS1 e ITS2 para la distinción entre la especies de Trichuris, T. trichiura y T. suis, utilizando las enzimas de restricción Sph I, Dra I y Hpa I.

D02 divulga de manera similar un trabajo de amplificación y secuenciación del fragmento ITS1-5.8S-ITS2 del ADN ribosomal y su posterior análisis de restricción utilizando distintas endonucleasas.

D03 divulga las secuencias del ADN mitocondrial completo de T. ovis y T. discolor y proporciona nuevos marcadores genéticos para el estudio de la genética de poblaciones, diagnóstico y epidemiología molecular de T. ovis y T. discolor, entre los que se encuentra el gen del citocromo oxidasa 1 y en concreto divulga los primers utilizados (tabla 1).

D04 divulga también el uso del ADN mitocondrial (subunidad 1 gen parcial citocromo c-oxidasa) como marcadores moleculares para estudios filogenéticos de Trichuris.

D05 divulga un Kit que comprende: una o más endonucleasas de restricción capaces de fragmentación de un polinucleótido, uno o más oligonucleótidos cebadores con una secuencia conocida; y una o más polimerasas capaces de síntesis de polinucleótidos, para identificar la presencia de un patógeno en una muestra dentro de los que podrían identificarse Trichuris trichiura (reivindicaciones 1, 2, 74, 94).

Ninguno de los documentos del estado de la técnica divulga un método que combine la amplificación del gen citocromo oxidasa 1 y su posterior digestión con enzimas de restricción para el diagnóstico in vitro de Tricuris humana, por lo que las reivindicaciones 1-6, 8 serían nuevas tal y como se menciona en el art.6 de la ley 11/1986. La reivindicación 7 caracteriza las enzimas de restricción por las secuencias del ADN que cortan y no por las características estructurales de las enzimas. De esta manera, esta reivindicación equivaldría a caracterizar las enzimas de restricción por su función como marcador molecular en el diagnóstico de Trichuris. De manera similar la reivindicación 9 equivaldría a reivindicar el uso de enzimas de restricción como marcador molecular para el diagnóstico de Trichuris. A la luz de lo divulgado en D01 donde se divulgan enzimas de restricción (página 206, columna izq.) para distinguir entre dos especies de Trichuris, ambas reivindicaciones carecerían de novedad tal y como se menciona en el art. 6 de la ley 11/1986.

La diferencia entre el objeto de la invención recogido en las reivindicaciones 1-9 sería la zona de amplificación y secuenciación seleccionada para cortar con endonucleasas de restricción, que sería la del gen citocromo oxidasa 1. El efecto técnico producto de esta diferencia sería la obtención de un mapa de restricción como herramienta para la diferenciación entre distintas especies de Trichuris. El problema técnico planteado sería la provisión de genes para la obtención de mapas de restricción con los que discriminar entre distintas especies de Trichuris analizadas.

Así pues, para el experto en la materia sería obvia la combinación de D01 y D02, o D03 y D04, con el fin de seleccionar el gen de la citocromo oxidasa 1 para la elaboración de un mapa de restricción que sirviese para discriminar entre distintas especies de *Trichuris*, como alternativa al ADN ribosomal ITS 1 y 2, utilizado en el estado de la técnica anterior. Para el experto en la materia no exigiría ningún esfuerzo inventivo la selección de distintas combinaciones de endonucleasas en función de los distintos sitios de restricción que aparecieran en las secuencia de los fragmentos de la citocromo oxidasa 1 amplificados para cada especie. Por tanto, las reivindicaciones 1-9 carecerían de actividad inventiva tal y como se menciona en el art. 8 de la ley 11/1986.