

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 404 483**

21 Número de solicitud: 201131753

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

**C07K 14/21** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

**02.11.2011**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**27.05.2013**

Fecha de la concesión:

**08.09.2014**

45 Fecha de publicación de la concesión:

**15.09.2014**

73 Titular/es:

**SERVICIO ANDALUZ DE SALUD (50.0%)**

**Avda. de la Constitución, 18**

**41071 Sevilla (Sevilla) ES y**

**UNIVERSIDAD DE SEVILLA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**MCCONNELL, Michael;**

**PÉREZ-ROMERO, Pilar;**

**PACHÓN, Jerónimo y**

**PÉREZ-ORDONEZ, Ana**

74 Agente/Representante:

**FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás**

54 Título: **Método de detección clínica estandarizada del patógeno Acinetobacter baumannii.**

57 Resumen:

La presente invención se encuentra dentro de la medicina y la biología molecular, y se refiere al uso de una región en la determinación de bacterias del orden Pseudomonadales, y a un método específico, eficiente y validado, de alta repetitividad y reproducibilidad, que permite la detección estandarizada de distintas cepas del patógeno Acinetobacter baumannii en muestras clínicas que presentan una baja contaminación, pudiendo incluso detectar ADN libre, presente en el ambiente.

ES 2 404 483 B1

**DESCRIPCIÓN****Método de detección clínica estandarizada del patógeno *Acinetobacter baumannii*.**

La presente invención se encuentra dentro de la medicina y la biología molecular, y se refiere al uso de una región en la determinación de bacterias del orden *Pseudomonadales*, y a un método específico, eficiente y validado, de alta repetitividad y reproducibilidad, que permite la detección estandarizada de distintas cepas del patógeno *Acinetobacter baumannii* en muestras clínicas que presentan una baja contaminación, pudiendo incluso detectar ADN libre, presente en el ambiente.

**ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR**

*Acinetobacter baumannii* es un bacilo aerobio gram-negativo perteneciente al orden *Pseudomonadales*, con creciente importancia como agente causal de infecciones nosocomiales. La frecuencia de las infecciones causadas por *A. baumannii* ha aumentado de forma alarmante en las dos últimas décadas. Esto incluye el aumento dramático del número de infecciones causadas por *A. baumannii* multirresistentes y panresistentes.

*A. baumannii* puede causar diferentes tipos de infección dependiendo de la ruta de entrada en el huésped. Las principales infecciones causadas por *A. baumannii* son neumonías, bacteriemias, infecciones del tracto urinario, infecciones del lecho quirúrgico y meningitis. Las infecciones respiratorias causadas por *A. baumannii* son las más comunes y con un mayor riesgo de muerte. En un estudio desarrollado en 2003 en Estados Unidos se describió que el 6,9% de los casos de neumonía en pacientes ingresados en la unidad de cuidados intensivos (UCI) estaban causados por *A. baumannii*, lo que suponía un incremento del 72% con respecto a los casos observados en 1986 (Gaynes, R., & J. R. Edwards. 2005. *Clin Infect Dis* 41:848-854). Aunque la neumonía nosocomial es la forma más común de la enfermedad, algunos casos de neumonías adquiridas en la comunidad son causadas por *A. baumannii*. Al igual que la neumonía nosocomial, la neumonía adquirida en la comunidad causada por *Acinetobacter* presenta una tasa de mortalidad alta. En un

estudio desarrollado en España se muestra que el 3,1% de las neumonías graves adquiridas en la comunidad estaban causadas por *A. baumannii* (Pachon *et al.*, 1990. *Am Rev Respir Dis* 142:369-373).

5 El tratamiento de las infecciones causadas por *A. baumannii* ha sido complicado debido a la emergencia durante las últimas dos décadas de cepas multirresistentes y panresistentes. Un estudio llevado a cabo en Estados Unidos entre los años 1986 y 2003 demostró que la resistencia a los antibióticos más comúnmente usados se ha incrementado de forma alarmante durante este período, incluyendo un aumento en  
10 el porcentaje de aislamientos que mostraron resistencia a ceftazidima (entre un 24% y un 67%), a amikacina (entre el 3% y el 20%) y a imipenem (entre el 0% y el 20%) (Gaynes, R., & J. R. Edwards. 2005. *Clin Infect Dis* 41:848-854). Un estudio llevado a cabo en 2005 a nivel mundial en el que se analizó la resistencia a antibióticos de aislados de *A. baumannii*, mostró que el 34% de las cepas aisladas fueron  
15 resistentes a ceftazidima, el 40% a ciprofloxacino, el 30% a levofloxacino, el 26% a gentamicina y el 22% a cefepima (Rhomberg *et al.*, 2007. *Diagn Microbiol Infect Dis* 59:425-432). Debido a este notable incremento de las infecciones causadas por *A. baumannii*, y la emergencia de cepas altamente resistentes, se requiere en la actualidad el desarrollo de nuevas estrategias para controlar estas infecciones, entre  
20 ellas una detección precoz de la bacteria.

Los métodos actuales para determinar el agente causante de infecciones bacterianas requieren el cultivo de muestras clínicas y test bioquímicos, un proceso que puede tardar entre 48 y 72 horas para llegar a una identificación definitiva de la  
25 bacteria. Dados los problemas inherentes que presentan los sistemas de identificación fenotípicos (no todas las cepas de una misma especie muestran características homogéneas, una misma cepa puede generar diferentes patrones en ensayos repetidos y también las limitaciones en las bases de datos, entre otros), los métodos moleculares se han erigido como procedimientos complementarios,  
30 alternativos o incluso de referencia a los fenotípicos. En la década de los 80, comenzó la búsqueda de candidatos que, siendo genes estables, permitieran establecer relaciones filogenéticas entre las bacterias, como los genes que codifican para las subunidades ribosómicas 5S, 16S, 23S y sus espacios intergénicos.

Sin embargo, no todas las regiones empleadas de forma general resultan útiles en la identificación de todos los géneros y especies bacterianos. Así, aunque en muchos casos se considera que la secuenciación de la fracción 23S puede ser una buena alternativa en los casos en los que la fracción 16s no proporciona resultados concluyentes, presenta una serie de inconvenientes que han sido evaluados por algunos autores, como dificultades para la amplificación de fragmentos más grandes de forma rutinaria con propósitos taxonómicos o la existencia de abundantes secuencias de inserción (IS). Otras regiones, como la subunidad  $\beta$  de la ARN polimerasa, presentan el inconveniente de que no se pueden utilizar cebadores universales para su amplificación. Y en algunos casos, las regiones empleadas no son adecuadas, debido a que están sometidas a transferencia horizontal genética, y dan lugar a identificaciones erróneas.

Es necesario, por tanto, encontrar una región adecuada para la identificación clínica de bacterias del orden *Pseudomonadales*, más concretamente de la familia *Moraxellaceae*, y aún más concretamente del género *Acinetobacter*, así como un método específico, eficiente y validado, de alta repetitividad y reproducibilidad, que permita la detección de distintas cepas del patógeno *Acinetobacter baumannii* en muestras clínicas que presentan una baja contaminación, pudiendo incluso detectar ADN libre, presente en el ambiente.

## 25 DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Los autores de la presente invención han identificado la región del gen que codifica para la proteína de membrana externa A (gen *ompA*), como una región útil para la detección clínica de bacterias gram negativas, concretamente especies del orden *Pseudomonadales*, y en especial del género *Acinetobacter*.

Tal y como se entiende en la presente invención, la región útil (gen *ompA*) para la detección clínica de especies del orden *Pseudomonadales*, y en especial del género *Acinetobacter*, se define por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que

constituye la secuencia codificante de la proteína recogida en la SEQ ID NO: 2, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 2,

5 b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria hibrida con la secuencia polinucleotídica de a),

c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,

10 d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 2, y en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína ompA.

15 En una realización particular de la invención, la región útil para la detección clínica de especies del orden *Pseudomonadales*, y en especial del género *Acinetobacter*, se define por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido que comprendería diversas variantes procedentes de:

20 a) las moléculas de ácido nucleico que se encuentra entre las posiciones 300-1200 de la SEQ ID No 1, más preferiblemente la región 550-1000 de la SEQ ID No 1, y aún más preferiblemente, la región 774-859 de la SEQ ID No 1

b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria hibrida con la secuencia polinucleotídica de a),

25 c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,

30 d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la secuencia polinucleotídica de a), y en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína ompA.

Por tanto, un primer aspecto de la invención se refiere al uso de la secuencia nucleotídica localizada en el gen *ompA* o una región de la misma, para la identificación de bacterias gram negativas, concretamente las pertenecientes al

orden *Pseudomonadales*. En otra realización preferida de este aspecto de la invención, las bacterias del orden *Pseudomonadales* pertenecen a la Familia *Moraxellaceae*. En una realización preferida de este aspecto de la invención, las bacterias del orden *Pseudomonadales* pertenecen al Género *Acinetobacter*. En una  
5 realización particular, las bacterias del orden *Pseudomonadales* pertenecen a la especie *A. baumannii*.

En microbiología, se denominan bacterias Gram negativas a aquellas bacterias que no se tiñen de azul oscuro o violeta por la tinción de Gram, y lo hacen de un color rosado tenue: de ahí el nombre de "Gram-negativas" o también "gramnegativas".  
10 Esta característica está íntimamente ligada a la estructura de la envoltura celular, por lo que refleja un tipo natural de organización bacteriana. Son uno de los principales grupos de bacterias y cuando se tratan como taxón se utiliza también el nombre de *Negibacteria* (Cavalier-Smith, 2006. *Biol Direct.* 1: 19)

15 En esta memoria, la especie *Acinetobacter baumannii* Bouvet and Grimont 1986, (*Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1986, **36**, 228-240), se refiere a una especie de bacterias Gram-negativas que pertenece al filo Proteobacteria. Las especies de *Acinetobacter* son bacilos estrictamente aerobios no fermentadores, no móviles, oxidasa-negativos  
20 que se presentan en pares al microscopio. Se distribuyen ampliamente en la naturaleza, son importantes en el suelo y contribuyen a su mineralización. *Acinetobacter baumannii* es un organismo celular, del Superreino *Bacteria*; Phylum *Proteobacteria*; Clase *Gammaproteobacteria*; Orden *Pseudomonadales*; Familia *Moraxellaceae* y género *Acinetobacter*.

25 Un segundo aspecto de la presente invención, se refiere a cebadores y sondas TaqMan capaces de hibridar en la región genómica que codifica para la proteína de membrana externa A (gen *ompA*) útiles para la detección clínica de bacterias gram negativas, concretamente especies del orden *Pseudomonadales*, y en especial del  
30 género *Acinetobacter*.

En esta memoria se entiende por "cebador" o "primer" 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 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, un fragmento que pueda ser detectado y/o cuantificado.

Para el diseño de cebadores es necesario hacer una serie de predicciones, como la temperatura de fusión ( $T_m$ ) o la posibilidad de formación de horquillas que puedan reducir, por competencia, la efectividad de la hibridación con la secuencia de ADN diana. Las variables a tener en cuenta en el diseño de los cebadores son fundamentalmente: Tamaño del oligonucleótido, temperatura de fusión ( $T_m$ ), especificidad con el ADN de la región *ompA* de los ADN ribosómicos de las bacterias que se pretenden amplificar, secuencias complementarias, contenido en G/C y fragmentos de pirimidinas (T, C) o purinas (A, G), secuencia 3' terminal y secuencia 5' terminal y regiones centrales

Además, para la síntesis del ADN es necesaria la presencia de nucleótidos trifosfato dNTPs, es decir, dATP, dTTP, dCTP y dGTP, ADN polimerasa termoresistente, cloruro de magnesio en una concentración determinada así como tampones que mantengan las condiciones físico-químicas adecuadas para el funcionamiento de todos los componentes y se consiga con ello la amplificación.

Las sondas pueden ser de varios tipos conocidos en el estado de la técnica, por ejemplo, pero sin limitarnos, pueden ser sondas TaqMan, que permiten medir la producción de productos de PCR mediante un sistema de sondas marcadas mediante dos fluorocromos. Su utilidad radica en que poseen un fluoróforo en su extremo 3' y una molécula en el 5' que bloquea su emisión de fluorescencia (denominada en inglés «quencher»); esta sonda marcada hibrida específicamente en la parte central del producto de PCR a obtener. De este modo, cuando se efectúa la PCR (con la sonda más el par de cebadores específicos), la sonda hibrida en el amplicón, pero, debido a la cercanía del fluoróforo al quencher, no se emite fluorescencia; cuando la polimerasa se topa con la sonda la hidroliza mediante su actividad exonucleasa 5'-3', lo cual provoca la separación del quencher del fluorocromo y, por tanto, la emisión de fluorescencia. Fluorescencia que está

relacionada con la cantidad de amplicón producido. Otros tipos son, por ejemplo, las sondas tipo Molecular Beacons o las sondas Scorpion. En una realización preferida de la invención, los fluoróforos que se emplean son 6-carboxyfluoresceína y 6-carboxytetramethylrhodamina.

5

Por lo tanto, una realización preferida de la presente invención se refiere al uso de un set de cebadores/sonda capaces de hibridar en condiciones astringentes, preferiblemente capaces de hibridar a una temperatura de entre 56 °C y 66°C, aún más preferiblemente entre 58 °C y 64°C, y aún más preferiblemente a 62°C durante un tiempo de entre 30 segundos y 1 minuto y medio, y más preferiblemente durante 10 1 minuto, con una región del gen *ompA*, para la determinación de bacterias gram negativas, más concretamente del orden *Pseudomonadales*. En una realización preferida de este aspecto de la invención, las bacterias del orden *Pseudomonadales* pertenecen a la Familia *Moraxellaceae*. En una realización preferida de este aspecto de la invención, las bacterias del orden *Pseudomonadales* pertenecen al Género *Acinetobacter*. En una realización aún más preferida, las bacterias del orden *Pseudomonadales* pertenecen a la especie *A. baumannii*.

15

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de al menos una secuencia nucleotídica de entre 12 y 28 bases (los primers y sondas son ADN de solo una 20 cadena), de ahora en adelante secuencia de la invención, capaz de hibridar con la secuencia de una región del gen *ompA*, para la detección específica de una bacteria del orden *Pseudomonadales*, o de la presencia de ADN genómico de una bacteria del orden *Pseudomonadales*. Preferiblemente, para la detección específica de *A. baumannii*, o de la presencia de ADN genómico de *A. baumannii*.

25

En una realización preferida de este aspecto de la invención, la secuencia tiene entre 14 y 26 bases. Más preferiblemente tiene entre 16 y 24 bases, aún más preferiblemente entre 18 y 22 bases, y mucho más preferiblemente entre 19 y 21 30 bases. En una realización particular, tiene 20 bases.

30

Los autores de la presente invención han creado cebadores frente a regiones del gen *ompA* altamente conservadas entre las distintas cepas de *A. baumannii* que se han secuenciado, pero altamente específicas de dicha especie, y no de otras

filogenéticamente próximas. Por lo tanto otro aspecto de la invención se refiere a un set de cebadores/sonda, de ahora en adelante set de cebadores/sonda de la invención, donde la secuencia de los cebadores son las SEQ ID NO: 3 y la SEQ ID NO: 4, y la secuencia de la sonda es la SEQ ID NO: 5.

5

Otro aspecto de la invención se refiere a una secuencia o un polinucleótido aislado, de ahora en adelante primer polinucleótido de la invención, de secuencia SEQ ID NO: 3, o a cualquiera de sus variantes o fragmentos biológicamente activos.

10 Otro aspecto de la invención se refiere a una secuencia o un polinucleótido aislado, de ahora en adelante segundo polinucleótido de la invención, de secuencia SEQ ID NO: 4, o a cualquiera de sus variantes o fragmentos biológicamente activos.

Otro aspecto de la invención se refiere a una secuencia o un polinucleótido aislado, de ahora en adelante tercer polinucleótido de la invención, de secuencia SEQ ID NO: 5, o a cualquiera de sus variantes o fragmentos biológicamente activos.

15

En el sentido utilizado en esta descripción, el término "variante" de una secuencia se refiere a una secuencia sustancialmente homóloga a dicha secuencia, bien sea nucleotídica o aminoacídica. En general, una variante incluye adiciones, deleciones o sustituciones de nucleótidos o de aminoácidos. El término "variante" incluye también a las proteínas o las secuencias aminoacídicas resultantes de modificaciones postranslacionales como, por ejemplo, pero sin limitarse, fosforilación glicosilación, sumoilación, metilación o acilación.

20

25

En otra realización preferida, la secuencia de la invención puede tener, además, un compuesto marcador.

30

El término "compuesto marcador", tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a un compuesto capaz de dar lugar a una señal cromogénica, fluorogénica, radiactiva y/o quimioluminiscente que permita la detección y/o cuantificación de la cantidad de secuencias diana, y en correlación, de bacterias del orden *Pseudomonadales*, preferentemente de la Familia *Moraxellaceae*, más preferentemente del Género *Acinetobacter*, y más preferentemente de la especie *A.*

*baumannii*.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método para la detección específica de *A. baumannii*, o de la presencia de ADN genómico de *A. baumannii*. que comprende  
 5 emplear al menos dos secuencias de la invención que son dos cebadores. En una realización más preferida, además se emplea otra secuencia de la invención (la secuencia TaqMan). Aún más preferiblemente, los cebadores son las secuencias SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 , y la secuencia TaqMan es la SEQ ID NO: 5, respectivamente.

10

Otro aspecto de la invención se refiere a un método para detectar *Acinetobacter baumannii* en una muestra, donde dicho método comprende los pasos de:

a) obtener una muestra biológica donde se quiere testar si existe la secuencia diana de *Acinetobacter baumannii*,

15

b) preparar una mezcla de reacción que comprenda el set de cebadores/sonda de la invención, y la muestra biológica a testar de (a),

20

c) someter la mezcla de reacción de (b) a condiciones de amplificación, para generar al menos una copia de una secuencia nucleotídica complementaria a la secuencia diana,

25

d) hibridar la sonda a la secuencia nucleotídica complementaria a la secuencia diana, de manera que se forme un híbrido que comprenda la sonda y la secuencia nucleotídica complementaria a la secuencia diana de manera que la detección de la hibridación es un indicativo de la presencia de *Acinetobacter baumannii* en la muestra.

Las posición en el gen *ompA* de la cepa ATCC 19606 (número de acceso: AY485227, SEQ ID No 1) del set de cebadores/sonda de la invención se muestran en la Tabla 1.

30

| Nombre                      | Posición en el gen <i>ompA</i> |
|-----------------------------|--------------------------------|
| SEQ ID NO: 3 (OmpA Forward) | 774                            |

|                                |     |
|--------------------------------|-----|
| SEQ ID NO: 4 (OmpA Reverse)    | 840 |
| SEQ ID NO: 5 OmpA TaqMan Probe | 812 |

**Tabla 1.** Cebadores y sonda, y sus secuencias, diseñados para la amplificación de 86 nucleótidos del gen *ompA* de *A. baumannii*.

- 5 Una “muestra biológica aislada” incluye, pero sin limitarnos a, células, tejidos y/o fluidos biológicos de un organismo, obtenidos mediante cualquier método conocido por un experto en la materia. También incluye muestras “ambientales” entendiéndose por tales (muestras recogidas de superficies, por ejemplo superficies del entorno hospitalario). Así, la muestra biológica del paso (a) puede ser fluidos de
- 10 los pacientes, o bien una solución acuosa recogida de las superficies ambientales. Más preferiblemente, la muestra biológica del individuo del paso (a) se selecciona de la lista que consiste en lavados broncoalveolares, frotis nasofaríngeos, muestras de esputo, muestras recogidas de la piel, o cualquiera de sus combinaciones.
- 15 Los pasos (b), (c) y/o (d) del método descrito anteriormente pueden ser total o parcialmente automatizados, por ejemplo, por medio de un equipo robótico.

Otro aspecto de la presente invención es el método descrito en los párrafos precedentes como herramienta para la monitorización de la respuesta a un

20 tratamiento de infección por bacterias de la especie *A. Baumannii* donde se realizan tomas de muestras seriales de pacientes que han recibido un tratamiento. El análisis del ascenso o del descenso de la cuantificación del ADN bacteriano permitirá evaluar si la respuesta al tratamiento es negativa o positiva, respectivamente.

25 El procedimiento de monitorización comprende una serie de pasos que comienzan por la toma de muestras seriales. Se entiende por toma de muestras seriales a la extracción de cualquier tipo de muestras biológicas, incluidas las mencionadas en esta invención. La toma de muestras se realiza a diferentes tiempos desde que se administra el tratamiento, de forma que la cuantificación de la amplificación de los

30 fragmentos del gen *ompA* 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, por valores de amplificación en un mismo individuo, previos al tratamiento, supondría que el tratamiento está surtiendo efecto en el sentido de disminuir el nivel  
5 de microorganismos causantes de las enfermedades.

Otro aspecto de la presente invención es un kit que comprende pares de cebadores capaces de amplificar, de forma simultánea y en una sola reacción, mediante la técnica de la PCR, un fragmento de la región o gen *ompA* de bacterias del orden  
10 *Pseudomonadales*, preferentemente de la Familia *Moraxellaceae*, más preferentemente del Género *Acinetobacter*, y más preferentemente de la especie *A. baumannii*.

Los reactivos incluidos en este kit pueden ser otros cebadores específicos de la  
15 región o gen *ompA*, sondas específicas marcadas con dos fluoróforos diferentes así como con un quencher.

El término “quencher” hace referencia a un desactivador o apagador de la fluorescencia, es decir, una molécula capaz de absorber los fotones emitidos por el  
20 fluoróforo y disipar la energía en forma de calor, por lo que no se produce emisión de fluorescencia.

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  
25 los reactivos suministrados en el mismo. La naturaleza de los controles depende de la propia naturaleza de los reactivos, así pues, un control positivo puede ser, por ejemplo, una construcción genética que incluya las secuencias de de la región o gen *ompA* objeto de estudio en la presente invención, que pueden ser amplificadas por los pares de cebadores descritos anteriormente y, el control negativo puede ser una  
30 construcción que carece de los fragmentos de la región o gen *ompA* presentes en el control positivo. Otros controles positivos y negativos pueden ser incluidos este kit para evaluar el funcionamiento del mismo.

El kit además puede incluir, sin ningún tipo de limitación, tampones, agentes para prevenir la contaminación, inhibidores de la degradación de las proteínas, etc. Por otro lado el kit puede incluir todos los soportes y recipientes necesarios para su puesta en marcha y optimización. Preferiblemente, el kit comprende además las instrucciones para llevar a cabo cualquiera de los métodos de la invención.

5

En una realización preferida, el kit comprende los cebadores SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 para amplificar un fragmento de la región o gen *ompA* del ADN de las bacterias, mediante PCR.

10

En una realización más preferida, el kit comprende la secuencia de la sonda marcada que hibrida con la región del gen *ompA*. Más preferentemente, la sonda tiene la secuencia SEQ ID NO: 5.

15

Otro aspecto de la invención se refiere al uso del kit de la invención para la detección de bacterias del orden *Pseudomonadales*, preferentemente de la Familia *Moraxellaceae*, más preferentemente del Género *Acinetobacter*, y más preferentemente de la especie *A. baumannii*, en una muestra biológica, ambiental o en un cultivo microbiológico.

20

Otro aspecto de la invención se refiere al uso del kit de la invención para la monitorización de la respuesta a un tratamiento de una enfermedad causada por bacterias del orden *Pseudomonadales*, preferentemente de la Familia *Moraxellaceae*, más preferentemente del Género *Acinetobacter*, y más preferentemente de la especie *A. baumannii*.

25

Tanto el método descrito en la presente invención como el kit pueden emplear para su labor de identificación bacteriana la técnica PCR cuantitativa. La técnica de la PCR cuantitativa, qPCR, Q-PCR (del inglés *quantitative polymerase chain reaction*) o también conocida como PCR en tiempo real permite cuantificar en tiempo real la amplificación de los fragmentos de interés es una variante de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizada para amplificar y simultáneamente cuantificar de forma absoluta el producto de la amplificación de ácido desoxirribonucleico (ADN). Para ello emplea, del mismo modo que la PCR convencional, un molde de ADN, al

30

menos un par de cebadores específicos, dNTPs, un tampón de reacción adecuado, y una ADN polimerasa termoestable; a dicha mezcla se le adiciona una sustancia marcada con un fluoróforo que, en un termociclador que albergue sensores para medir fluorescencia tras excitar el fluoróforo a la longitud de onda apropiada, permita  
5 medir la tasa de generación de uno o más productos específicos. Dicha medición, se realiza luego de cada ciclo de amplificación y es por esto que también se le denomina PCR en tiempo real.

La expresión "funcionalmente equivalente", tal como aquí se utiliza, significa que las  
10 secuencia/s nucleotídicas/aminoacídicas o el/los fragmento/s de la/s secuencias nucleotídicas/aminoacídicas en cuestión mantiene/n esencialmente las propiedades biológicas o inmunológicas descritas en este documento. Dicha capacidad se puede determinar mediante métodos convencionales.

15 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 desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención.

20 Los términos "polinucleótido" y "ácido nucleico" se usan aquí de manera intercambiable, refiriéndose a formas poliméricas de nucleótidos de cualquier longitud, tanto ribonucleótidos (ARN ó RNA) como desoxiribonucleótidos (ADN ó DNA).

25 Los términos "secuencia aminoacídica", "péptido", "oligopéptido", "polipéptido" y "proteína" se usan aquí de manera intercambiable, y se refieren a una forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud, que pueden ser codificantes o no codificantes, química o bioquímicamente modificados.

30 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 desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de

la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

## DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

5

**Fig 1.** Recta de regresión obtenida a partir de los resultados de la PCR a tiempo real con las diluciones seriadas del ADN aislado del plásmido pGEM-OmpA. Se muestra la ecuación que define la línea de tendencia así como el coeficiente de correlación,  $R^2$ .

10

**Fig. 2.** Límite de detección calculada a partir de 20 repeticiones de la dilución más alta detectada con las condiciones de la reacción optimizadas.

## 15 EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la especificidad y efectividad 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.

20

### 1. Diseño de cebadores y sondas.

Para la detección de *A. baumannii* se utilizó PCR en tiempo real basado en sondas TaqMan que emplea una pareja de cebadores (SEQ ID No 3 y SEQ ID No 4) y una sonda (SEQ ID No 5) marcada con el fluoróforo FAM y el quencheador TAMRA.

25

La diana seleccionada para la amplificación fue el gen *ompA* de *A. baumannii* ya que se encuentra presente en todos los genomas de las cepas de *A. baumannii* secuenciadas hasta la fecha, entre ellos se incluyen numerosos aislados clínicos. Los cebadores se diseñaron frente a regiones del gen *ompA* altamente conservadas entre las distintas cepas. La especificidad de los primers se verificó a través del alineamiento con la base de datos de secuencias del NCBI utilizando la herramienta BLAST, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

30

Las secuencias de los cebadores y su posición en el gen *ompa* de la cepa ATCC 19606 (número de acceso: AY485227) se muestran en la Tabla 1 y en el listado de secuencias.

5

## 2. Optimización de las condiciones de la reacción.

La amplificación por PCR en tiempo real del gen *ompa* se realizó en un termociclador Stratagene Mx3005P utilizando la enzima TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems).

10

Se determinaron las condiciones óptimas de la reacción de PCR a tiempo real relativas a la temperatura de alineamiento de los cebadores y sonda, las concentraciones de los cebadores y la concentración de la sonda (Tabla 2). Se utilizó como molde el ADN genómico aislado de la cepa ATCC 19606.

15

Cada reacción consistió en la siguiente mezcla:

25 µl Master Mix 2x.

15 µl Mezcla de los cebadores (SEQ ID No 3 y 4) y la sonda (50-300 nM)  
(SEQ ID No 5)

20 10 µl ADN genómico de la cepa ATCC ( $2,9 \times 10^{-3}$  ng, correspondiente a 720 copias)

Las condiciones de la reacción fueron las siguientes:

1 ciclo: 50 °C 2 minutos

25 1 ciclo: 95 °C 10 minutos

38 ciclos: 95 °C 30 segundos, 58-62 °C 1 minuto.

Las condiciones óptimas que resultaron en un ciclo de amplificación (Ct) más bajo fueron las siguientes: 300 nM Cebador OmpA Forward, 300 nM Cebador OmpA Reverse, 100 nM Sonda OmpA Taqman sonda; 62°C de temperatura de

30

alineamiento de los cebadores (Tabla 2). Estas condiciones fueron utilizadas para todos los ensayos siguientes.

| Condiciones de la reacción      | Media Ct (dR)  | Desviación Estándar |
|---------------------------------|----------------|---------------------|
| <b>Temperatura de annealing</b> |                |                     |
| 58°C                            | 34,40          | ±0,35               |
| 60°C                            | 31,47          | ±0,39               |
| 62°C                            | → <b>29,80</b> | <b>±0,30</b>        |
| <b>Sonda</b>                    |                |                     |
| 50 nM                           | 36,08          | ±0,37               |
| 100 nM                          | → <b>29,80</b> | <b>±0,32</b>        |
| 300 nM                          | 31,42          | ±0,23               |
| <b>Primer Forward (nM)</b>      |                |                     |
| 50 nM                           | 34,13          | ±0,12               |
| 100 nM                          | 33,01          | ±0,34               |
| 300 nM                          | → <b>29,80</b> | <b>±0,32</b>        |
| <b>Primer Reverse (nM)</b>      |                |                     |
| 50 nM                           | 38,66          | ±0,42               |
| 100 nM                          | 37,40          | ±0,19               |
| 300 nM                          | → <b>29,80</b> | <b>±0,32</b>        |

5 Nota: Se señala con flechas las condiciones óptimas de la reacción.

**Tabla 2.** Condiciones de la reacción ensayados para la optimización de la reacción de amplificación por PCR en tiempo real de *A. baumannii*.

### 3. Desarrollo de un plásmido estándar para cuantificación.

10

Para cuantificar el número de copias de ADN genómico de *A. baumannii* se diseñó un DNA estándar. Para ello se amplificó por PCR el gen *ompA* de la cepa ATCC 19606. El producto de amplificación fue insertado en el vector pGEM-T Easy (Promega) siguiendo las indicaciones del fabricante. La construcción estándar fue nombrada como pGEM-T-OmpA.

15

#### 4. Determinación de las características de la PCR en tiempo real.

##### 4.1 Rango dinámico:

5 Para el cálculo del rango dinámico se utilizó como molde en la reacción de PCR un total de 10 concentraciones crecientes en base 10 del plásmido estándar pGEM-T-OmpA correspondiente a número de copias entre  $6,2 \times 10^{10}$  y 6,2 copias. Cada una de las concentraciones se testó por triplicado.

10 Los resultados mostraron que el rango dinámico de concentraciones detectables en la reacción de PCR fue entre  $6,2 \times 10^8$  copias a 62 copias totales. Los ciclos en los que se detectó producto de amplificaciones correspondientes a este rango fueron desde 10,5 hasta 38,0.

##### 4.2 Eficiencia de la reacción:

15

La eficiencia de la reacción de PCR a tiempo real viene definida por la recta de regresión construida con los resultados obtenidos para el cálculo del rango dinámico, calculada por la ecuación:

$$\text{Eficiencia} = 10^{(-1/m)} - 1,$$

20 donde,  $m$  es la pendiente de la recta de regresión.

El valor de la eficiencia debe encontrarse entre 0,9 y 1,1; la pendiente debe ser entre -3,6 y -3,1; y el coeficiente de correlación debe encontrarse entre 0,99 y 0,999.

En la Figura 1 se muestran la recta de regresión obtenida. Los resultados obtenidos a partir de la fórmula fueron:

25

$$m = -3,58$$

$$\text{Eficiencia} = 0,9$$

$$R^2 = 0,991$$

##### 4.3 Variación inter e intra-ensayo:

30

Para determinar la variación inter e intra-ensayo se midieron por triplicado dos concentraciones de ADN genómico de *A. baumannii* ( $2,9 \times 10^{-4}$  ng/ $\mu$ l y  $2,9 \times 10^{-7}$  ng/ $\mu$ l) por PCR en tiempo real en 5 días diferentes. La variación intra-ensayo se determinó en experimentos hechos en paralelo por triplicado.

- 5 En la tabla 3 se muestran los resultados obtenidos con variaciones inter e intra-ensayo.

| Concentración (ng/ $\mu$ L)/<br>Número de Copias | REPETIBILIDAD<br>(Precisión intra-ensayo) |      | REPRODUCIBILIDAD<br>(Precisión inter-ensayo) |      |
|--|---|------|--|------|
|  | SD  | CV%  | SD   | CV%  |
| $2,9 \times 10^{-4}$ /7200                       | 0,21                                      | 0,80 | 0,34   | 1,32 |
| $2,9 \times 10^{-7}$ /72                         | 0,36                                      | 0,99 | 0,45   | 1,20 |

- 10 **Tabla 3.** Coeficientes de variación intra-ensayo e inter-ensayo. La variación intra-ensayo (repetibilidad) incluyó la medición por triplicado de dos concentraciones en el mismo día. La precisión inter-ensayo (reproducibilidad) incluyó la medición de dos concentraciones por triplicado durante cinco días consecutivos. **SD:** Desviación estándar. **CV%:** Coeficiente de variación (calculado como SD/media Ct).

#### 15 4.4 Límite de detección:

- Para el cálculo del límite de detección se hicieron diluciones seriadas en base 10 del ADN genómico aislado de *A. baumannii* y se determinó la dilución mayor o menor número de copias capaz de amplificar al menos 19 de 20 repeticiones. El límite de detección de la PCR en tiempo real fue de  $68 \pm 2,1$  copias/reacción obtenido en las 20 muestras ensayadas como se muestra la Figura 2.

#### 4.5 Especificidad y detección de cepas clínicas de *A. baumannii*.

- 25 Para comprobar la especificidad de la técnica, se probaron además los genomas de aislados clínicos de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis* y *Pseudomonas aeruginosa* y que fueron negativos para *A. baumannii*.

Para determinar si la técnica fue capaz de detectar genomas de ADN de distintas cepas, se utilizaron 20 aislados clínicos de pacientes intubados en la UCI positivos para *A. baumannii*. A partir de cultivos de las cepas aisladas, se aisló el ADN y fue usado como molde para la PCR en tiempo real, en experimentos por triplicado. Los resultados fueron positivos para *A. baumannii* en todas las cepas aisladas.

## 5. Validación.

Para validar la capacidad de la PCR en tiempo real de cuantificar genomas de *A. baumannii*, se comparó el número de copias obtenido utilizando la técnica de PCR en tiempo real y los resultados de espectrofotometría con dos concentraciones del genoma de la cepa ATCC 19606 obtenidas en tres días distintos (Tabla 4).

|           | PCR tiempo real  |                            | Espectrofotometría             |                            | p    |
|-----------|------------------|----------------------------|--------------------------------|----------------------------|------|
|           | Ct<br>(media±SD) | Nº Copias<br>(media±SD)    | ng/µL±SD                       | Nº Copias<br>(media±SD)    |      |
| <b>C1</b> | 27,01 ±<br>0,37  | 6,1 ± 0,65x10 <sup>3</sup> | 3,3 ±<br>0,11x10 <sup>-4</sup> | 6,8 ± 0,21x10 <sup>3</sup> | 0,24 |
| <b>C2</b> | 33,42 ±<br>0,34  | 8,2 ± 2,7x10 <sup>1</sup>  | 3,3 ±<br>0,11x10 <sup>-6</sup> | 6,8 ± 2,1x10 <sup>1</sup>  | 0,43 |

**Tabla 4.** Comparación del número de copias obtenidas mediante PCR en tiempo real, calculadas a través del Ct correspondiente, y los resultados de espectrofotometría, calculadas a partir de la concentración. Nota. **p**: nivel de significación. **C**: concentración.

Los resultados muestran que la técnica optimizada de PCR en tiempo real es capaz de cuantificar genomas de *A. baumannii* en una muestra desconocida. El número de copias obtenidas utilizando las dos técnicas fueron estadísticamente iguales.

## REIVINDICACIONES

- 1- Método para la detección de *Acinetobacter Baumannii* mediante la identificación de la presencia o ausencia de una secuencia de nucleótidos que comprende cualquiera de las siguientes variantes:
- 5
- a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 2,
  - b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria hibrida con la secuencia polinucleotídica de a),
  - 10 c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,
  - d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 2, y en las que el polipéptido codificado por
  - 15 dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína ompA.;
- en una muestra biológica.
- 20 2- Método para la detección de *Acinetobacter Baumannii* mediante la identificación de la presencia o ausencia de una secuencia de nucleótidos que comprende cualquiera de las siguientes variantes:
- a) molécula de ácido nucleico que se encuentra entre las posiciones 300-1200 de la SEQ ID No 1 o en la región 550-1000 de la SEQ ID No 1 o en la región 774-
  - 25 859 de la SEQ ID No 1
  - b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria hibrida con la secuencia polinucleotídica de a),
  - c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,
  - 30 d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende una secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la secuencia polinucleotídica de a) y/o b) y/o c), y en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína ompA.;

en una muestra biológica.

5 3- Secuencia nucleotídica que consiste en la SEQ ID NO: 3, o cualquiera de sus variantes.

4- Secuencia nucleotídica que consiste en la SEQ ID NO: 4, o cualquiera de sus variantes.

10 5- Secuencia nucleotídica que consiste en la SEQ ID NO: 5, o cualquiera de sus variantes.

15 6- Set de cebadores/sonda, donde la secuencia de los cebadores son las secuencias según las reivindicaciones 3 y 4, y la secuencia de la sonda es la secuencia según se describe en la reivindicación 5.

20 7- Método para la detección específica de *A. baumannii*, o de la presencia de ADN genómico de *A. baumannii* en una muestra biológica, que comprende emplear al menos las secuencias SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4.

25 8- Método para la detección específica de *A. baumannii*, o de la presencia de ADN genómico de *A. baumannii* en una muestra biológica según la reivindicación anterior, que además comprende emplear la secuencia según se describe en la reivindicación 5.

9- Método para la detección específica de *A. baumannii*, o de la presencia de ADN genómico de *A. baumannii* en una muestra biológica, que comprende:

30 a) obtener una muestra biológica donde se quiere testar si existe *Acinetobacter baumannii*,

b) preparar una mezcla de reacción que comprenda el set de cebadores/sonda según se describe en la reivindicación 6, y la muestra biológica a testar de (a),

c) someter la mezcla de reacción de (b) a condiciones de amplificación, para generar al menos una copia de una secuencia nucleotídica complementaria a la secuencia diana,

5 d) hibridar la sonda a la secuencia nucleotídica complementaria a la secuencia diana, de manera que se forme un híbrido que comprenda la sonda y la secuencia nucleotídica complementaria a la secuencia diana.

10- Método para la monitorización de la respuesta a un tratamiento de infección por *A. baumannii in vitro*, que comprende los pasos (a) – (d) según la reivindicación anterior, y además comprende realizar tomas de muestras seriales de pacientes que están recibiendo un tratamiento.

11- Kit que comprende el par de cebadores de secuencias SEQ ID No 3 y SEQ No 4, para amplificar, de forma simultánea y en una sola reacción, mediante la técnica de la PCR, un fragmento de la región o gen *ompA* de una bacteria de la especie *A. baumannii*.

12- Kit según la reivindicación anterior, que además comprende la sonda marcada de SEQ ID No 5.

20 13- Uso del kit según cualquiera de las reivindicaciones 11 o 12, para la detección de bacterias de la especie *A. baumannii*.

14- Uso del kit según cualquiera de las reivindicaciones 11 o 12, para la monitorización de la respuesta a un tratamiento de una enfermedad causada por bacterias de la especie *A. baumannii*.

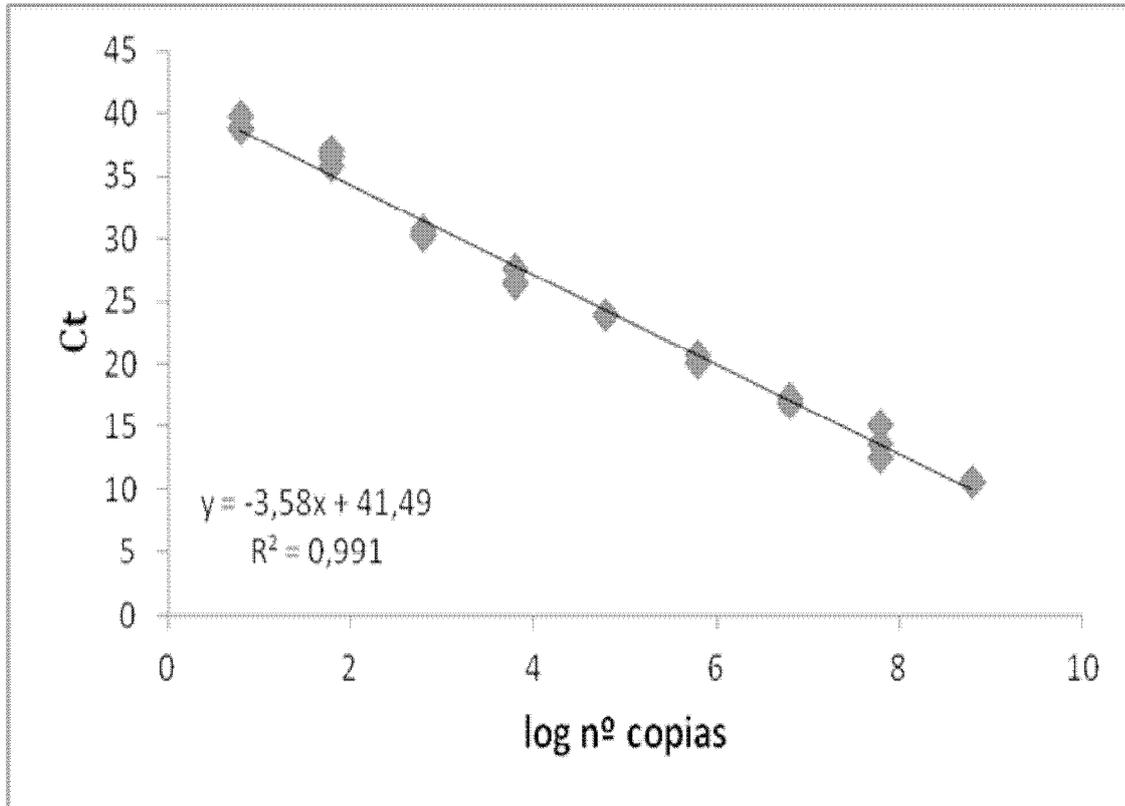


FIG. 1

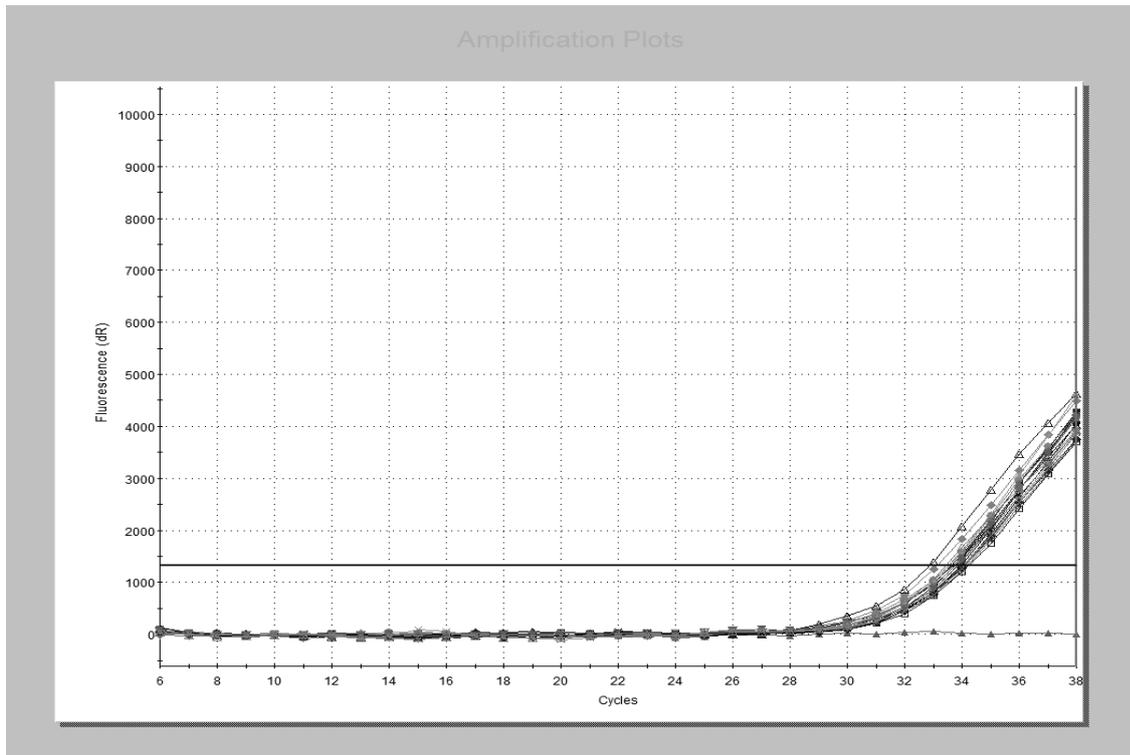


FIG. 2

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> SERVICIO ANDALUZ DE SALUD  
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

<120> METODO DE DETECCION CLINICA ESTANDARIZADA DEL PATOGENO  
ACINETOBACTER BAUMANNII

<130> 152107

<160> 5

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1  
<211> 1317  
<212> DNA  
<213> Acinetobacter baumannii

<220>  
<221> gene  
<222> (1)..(1317)  
<223> Secuencia nucleotidica del gen OmpA

<400> 1

|  |      |
|--|------|
| attacgacgg aaattgtaag taattttgtc aataatttac ttgattaana ttatcaagca  | 60   |
| cttggaaggt ctatcaagtg tttgtatgat tcaaatgtga atagcttaaa aataatactg  | 120  |
| gggtaaaaaa atatctcagg ggccaataaa tttaggctga gcttgaacaa caattggtat  | 180  |
| ctctggagga tatccatgaa attgagtcgt attgcacttg ctactatgct tgttgctgct  | 240  |
| ccattagctg ctgctaagtc tggcgtaaca gttactccat tattgcttgg ttacactttc  | 300  |
| caagacagcc aacacaacaa tggcggtaaa gatggtaact taactaacgg tcctgagtta  | 360  |
| caagacgatt tattcgttgg cgcagctctt ggtatcgagt taactccatg gttagggttc  | 420  |
| gaagctgaat ataaccaagt taaaggcgac gtagacggcg cttctgctgg tgctgaatat  | 480  |
| aaacaaaaac aatcaacgg taacttctat gttacttctg atttaattac taaaaactac   | 540  |
| gacagcaaaa tcaagccgta cgtattatta ggtgctggtc actataaata cgactttgat  | 600  |
| ggcgtaaacc gtggtacacg tggacttctt gaagaaggta ctttaggtaa cgctgggtgt  | 660  |
| ggtgctttct ggcgcttaaa cgacgcttta tctcttcgta ctgaagctcg tgctacttat  | 720  |
| aatgctgatg aagagttctg gaactataca gctcttgctg gcttaaactg agttcttggg  | 780  |
| ggtcacttga agcctgctgc tcctgtagta gaagttgctc cagttgaacc aactccagtt  | 840  |
| gctccacaac cacaagagtt aactgaagac cttaacatgg aacttcgtgt gttctttgat  | 900  |
| actaacaat caaacatcaa agaccaatac aagccagaaa ttgctaaagt tgctgaaaaa   | 960  |
| ttatctgaat accctaacgc tactgcacgt atcgaaggct acacagataa cactggtcca  | 1020 |
| cgtaagttga acgaacgttt atctttagct cgtgctaact ctgttaaact agctcttgta  | 1080 |
| aacgaataca acggtgatgc ttctcgtttg tctactcaag gtttcgcttg ggatcaaccg  | 1140 |
| attgctgaca acaaaaactaa agaaggctcg gctatgaacc gtcgtgtatt cgcgacaatc | 1200 |
| actggtagcc gtactgtagt agttcaacct ggtcaagaag cggcagctcc tgcagcagct  | 1260 |

ES 2 404 483 B1

caataatttg agttcttgaa cagtaaaaaa gcgactcggtt agagtcgctt ttttatg 1317

<210> 2  
 <211> 356  
 <212> PRT  
 <213> Acinetobacter baumannii

<220>  
 <221> PEPTIDE  
 <222> (1)..(356)  
 <223> Secuencia aminoacidica del gen OmpA

<400> 2

Met Lys Leu Ser Arg Ile Ala Leu Ala Thr Met Leu Val Ala Ala Pro  
 1 5 10 15

Leu Ala Ala Ala Asn Ala Gly Val Thr Val Thr Pro Leu Leu Leu Gly  
 20 25 30

Tyr Thr Phe Gln Asp Ser Gln His Asn Asn Gly Gly Lys Asp Gly Asn  
 35 40 45

Leu Thr Asn Gly Pro Glu Leu Gln Asp Asp Leu Phe Val Gly Ala Ala  
 50 55 60

Leu Gly Ile Glu Leu Thr Pro Trp Leu Gly Phe Glu Ala Glu Tyr Asn  
 65 70 75 80

Gln Val Lys Gly Asp Val Asp Gly Ala Ser Ala Gly Ala Glu Tyr Lys  
 85 90 95

Gln Lys Gln Ile Asn Gly Asn Phe Tyr Val Thr Ser Asp Leu Ile Thr  
 100 105 110

Lys Asn Tyr Asp Ser Lys Ile Lys Pro Tyr Val Leu Leu Gly Ala Gly  
 115 120 125

His Tyr Lys Tyr Asp Phe Asp Gly Val Asn Arg Gly Thr Arg Gly Thr  
 130 135 140

Ser Glu Glu Gly Thr Leu Gly Asn Ala Gly Val Gly Ala Phe Trp Arg  
 145 150 155 160

Leu Asn Asp Ala Leu Ser Leu Arg Thr Glu Ala Arg Ala Thr Tyr Asn  
 165 170 175

Ala Asp Glu Glu Phe Trp Asn Tyr Thr Ala Leu Ala Gly Leu Asn Val  
 180 185 190

Val Leu Gly Gly His Leu Lys Pro Ala Ala Pro Val Val Glu Val Ala  
 195 200 205

ES 2 404 483 B1

Pro Val Glu Pro Thr Pro Val Ala Pro Gln Pro Gln Glu Leu Thr Glu  
 210 215 220

Asp Leu Asn Met Glu Leu Arg Val Phe Phe Asp Thr Asn Lys Ser Asn  
 225 230 235 240

Ile Lys Asp Gln Tyr Lys Pro Glu Ile Ala Lys Val Ala Glu Lys Leu  
 245 250 255

Ser Glu Tyr Pro Asn Ala Thr Ala Arg Ile Glu Gly His Thr Asp Asn  
 260 265 270

Thr Gly Pro Arg Lys Leu Asn Glu Arg Leu Ser Leu Ala Arg Ala Asn  
 275 280 285

Ser Val Lys Ser Ala Leu Val Asn Glu Tyr Asn Val Asp Ala Ser Arg  
 290 295 300

Leu Ser Thr Gln Gly Phe Ala Trp Asp Gln Pro Ile Ala Asp Asn Lys  
 305 310 315 320

Thr Lys Glu Gly Arg Ala Met Asn Arg Arg Val Phe Ala Thr Ile Thr  
 325 330 335

Gly Ser Arg Thr Val Val Val Gln Pro Gly Gln Glu Ala Ala Ala Pro  
 340 345 350

Ala Ala Ala Gln  
 355

<210> 3  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Acinetobacter baumannii

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(20)  
 <223> Primer

<400> 3  
 tcttgggtggt cacttgaagc 20

<210> 4  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Acinetobacter baumannii

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(20)  
 <223> Primer

<400> 4  
 actccttggtg ttgtggagca 20

ES 2 404 483 B1

<210> 5  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> Acinetobacter baumannii

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(26)  
<223> Sonda

<400> 5  
aagttgctcc agttgaacca actcca

26



- ②① N.º solicitud: 201131753  
 ②② Fecha de presentación de la solicitud: 02.11.2011  
 ③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **C12Q1/68** (2006.01)  
**C07K14/21** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | ⑤⑥ Documentos citados  | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|--|----------------------------|
| X<br>A    | TURTON J F et al. Use of sequence-based typing and multiplex PCR to identify clonallineages of outbreak strains of Acinetobacter baumannii. Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 08.2007 VOL: 13 No: 8 Pags: 807-815, todo el documento. | 1-2<br>3-14                |
| X<br>A    | EVANS B A et al. OXA-51-like beta-lactamases and their association with particularepidemic lineages of Acinetobacter baumannii. Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 03.2008 VOL: 14 No: 3 Pags: 268-275, todo el documento.             | 1<br>2-14                  |
| A         | US 6713062 B1 (MERCHANT JUANITA L) 30.03.2004  | 1-14                       |
| A         | US 6562958 B1 (BRETON GARY et al.) 13.05.2003  | 1-14                       |

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  
21.02.2013

Examinador  
M. Hernández Cuéllar

Página  
1/4

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

C12Q, C07K

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

EPODOC, WPI, CAPLUS, MEDLINE, EMBASE, BIOSIS, EBI NUCLEOTIDE SEQUENCE DATABASES, REGISTRY

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 21.02.2013

**Declaración**

|   |                       |           |
|---|-----------------------|-----------|
| <b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>            | Reivindicaciones 3-14 | <b>SI</b> |
|   | Reivindicaciones 1-2  | <b>NO</b> |
| <b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b> | Reivindicaciones 3-14 | <b>SI</b> |
|   | Reivindicaciones 1-2  | <b>NO</b> |

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       | TURTON J F et al. Use of sequence-based typing and multiplex PCR to identify clonallineages of outbreak strains of Acinetobacter baumannii. Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 08.2007 VOL: 13 No: 8 Pags: 807-815, todo el documento. | 31.07.2007        |
| D02       | EVANS B A et al. OXA-51-like beta-lactamases and their association with particularepidemic lineages of Acinetobacter baumannii. Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 03.2008 VOL: 14 No: 3 Pags: 268-275, todo el documento.             | 29.02.2008        |

**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 invención se refiere al uso de la secuencia nucleotídica localizada en el gen ompA o una región de la misma, para la identificación de bacterias gram negativas, concretamente las pertenecientes al orden Pseudomonadales. En otra realización preferida de este aspecto de la invención, las bacterias del orden Pseudomonadales pertenecen a la Familia Moraxellaceae. En una realización preferida de este aspecto de la invención, las bacterias del orden Pseudomonadales pertenecen al Género Acinetobacter. En una realización particular, las bacterias del orden Pseudomonadales pertenecen a la especie A. baumannii.

**1.- NOVEDAD**

Los documentos D01 y D02 describen un ensayo multiplex-PCR para los genes ompA, csuE and bla(OXA-51-like) para identificar cepas epidémicas de Acinetobacter baumannii. A la vista de estos documentos queda demostrado que el gen ompA ha sido utilizado con anterioridad para la identificación de Acinetobacter baumannii. En consecuencia, en opinión de esta Oficina anticipan el objeto de protección y destruyen la novedad de la reivindicación 1.

En particular, el documento D01 se refiere a una secuencia de 862 nucleótidos del gen ompA que presenta una identidad del 99,5 % con la secuencia nucleotídica objeto de la reivindicación 2 que se encuentra entre las posiciones 300-1200 de la SEQ ID No 1. En consecuencia el objeto de la reivindicación 2 se encuentra anticipado en el estado de la técnica y por tanto carece de la novedad requerida en el Art 6.1 LP 11/1986.

Por su parte las reivindicaciones 3-14 relativas a los cebadores, sonda, método y kit cumplen el requisito de novedad establecido en el Art 6.1 LP 11/1986.

**2.- ACTIVIDAD INVENTIVA**

Las reivindicaciones 1-2 no son nuevas y por tanto no son inventivas según el Art. 8.1 LP 11/1986.

Los documentos D01-D02 describen un ensayo multiplex-PCR para los genes ompA, csuE and bla(OXA-51-like) para identificar cepas epidémicas de Acinetobacter baumannii. La diferencia con el objeto de las reivindicaciones 3-14 reside en que en estas se utiliza un set de cebadores y sonda nuevos en un ensayo de PCR a tiempo real. El uso de este set permite discriminar entre Acinetobacter baumannii y otros aislados clínicos, es capaz de detectar genomas de ADN de distintas cepas de Acinetobacter baumannii, el límite de detección de la PCR en tiempo real fue de  $68 \pm 2,1$  copias/reacción y su capacidad de cuantificación es comparable a la de los resultados obtenidos por espectrofotometría. Ante la imposibilidad de comparar estos resultados con la información aportada en D01 D02, no es posible considerar que el método de detección de la invención constituya una mera alternativa a los métodos descritos en D03-D04. En consecuencia, en opinión de esta Oficina, las reivindicaciones 3-14 cumplen el requisito de actividad inventiva establecido en el Art. 8.1 LP 11/1986