



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 222 061**

⑫ Número de solicitud: 200200012

⑮ Int. Cl.
C12Q 1/68 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

⑫ Fecha de presentación: **03.01.2002**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **16.01.2005**

Fecha de la concesión: **16.01.2006**

Fecha de modificación de las reivindicaciones:
02.12.2005

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **01.02.2006**

⑮ Fecha de publicación del folleto de la patente:
01.02.2006

⑰ Titular/es: **Universidad de Cantabria
Avenida de los Castros, s/n
39005 Santander, Cantabria, ES**

⑱ Inventor/es: **Navas Méndez, Jesús y
Ladrón Boronat, Néstor**

⑳ Agente: **No consta**

②④ Título: **Método de diagnóstico molecular para la detección e identificación de *Rhodococcus equi*.**

②⑤ Resumen:

Método de diagnóstico molecular para la detección e identificación de *Rhodococcus equi*.

Método de diagnóstico molecular para la detección e identificación de *Rhodococcus equi* el cual se refiere a un procedimiento de análisis molecular, por PCR, que permite la detección e identificación de *Rhodococcus equi*, un microorganismo de interés en patología animal y humana, a partir de aislamientos obtenidos en el laboratorio y/o muestras clínicas. El método se fundamenta en una reacción de amplificación que utiliza unos cebadores específicos para esta bacteria, basados en la secuencia del gen *choE*, codificante para la colesterol oxidasa. El procedimiento discrimina *Rhodococcus equi* de otras bacterias próximas, como micobacterias y otros actinomicetos patógenos. El procedimiento permite reconocer cualquier aislamiento de *Rhodococcus equi* con independencia de su origen, presenta una especificidad del 100%, es muy sensible y su ejecución es muy rápida.

ES 2 222 061 B2

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

DESCRIPCIÓN

Método de diagnóstico molecular para la detección e identificación de *Rhodococcus equi*.

El objeto de esta invención es un método de diagnóstico molecular aplicado a la identificación de patógenos bacterianos.

Rhodococcus equi es un microorganismo Gram (+) perteneciente al grupo taxonómico Mycolata, en el que se incluyen bacterias que contienen ácidos micólicos en su pared. Es un parásito intracelular causante de procesos patológicos en el hombre y en varios animales. La mayoría de los casos descritos en humanos corresponden a pacientes con algún tipo de inmunodeficiencia, principalmente afectados por el virus de inmunodeficiencia humana (V.I.H.), aunque puede afectar también a individuos inmunocompetentes. Produce neumonías cavitarias con signos clínicos similares a los que se observan en las infecciones por *Mycobacterium tuberculosis*. En Medicina Veterinaria *Rhodococcus equi* es un patógeno reconocido como agente causante de neumonías y enteritis en potros jóvenes e infecciones de distinta localización en otras especies animales (rumiantes, cerdos, carneros, perros, gatos, aves, llamas, monos, etc).

El hábitat natural de *Rhodococcus equi* es el suelo. El principal reservorio animal es el intestino de los caballos. De ahí que el estiércol contaminado constituya la principal fuente de infección. Las principales vías de entrada en el hospedador son la digestiva y, sobre todo, la respiratoria, lo que explica su rápida diseminación entre animales que viven en condiciones de hacinamiento. En el ganado equino produce pérdidas cuantiosas, ya que no se dispone de una vacuna eficaz y no siempre se produce una respuesta positiva al tratamiento con antibióticos.

El diagnóstico de la infección por *Rhodococcus equi* se realiza por aislamiento y detección del agente causal. Se pueden utilizar muestras de heces y estiércol, nódulos linfáticos, fluido traqueal y abscesos. Como criterios de diferenciación se utilizan las características morfológicas de las colonias y sus propiedades bioquímicas. Sin embargo la eventual administración previa de antibióticos como tratamiento de la infección puede impedir el crecimiento. También pueden darse casos de co-infección con otros agentes patogénicos. En muchos casos se identifican por error como *Rhodococcus equi* otras bacterias, principalmente del orden *Actinomycetales* (*Nocardia*, *Mycobacterium*, etc.) y también especies de otros grupos taxonómicos de bioquímica similar. Se han propuesto métodos de diagnóstico molecular basados en la detección de la denominada proteína Vap (Virulence Associated Protein) o de su gen codificante (*vapA*). El gen *vapA* se encuentra en un plásmido presente en la mayoría de las cepas de *Rhodococcus equi* aisladas de caballos. Sin embargo, en los aislamientos procedentes de humanos o de otros animales y en los aislados de suelos no siempre está presente el gen *vapA*, debido a que contienen plásmidos de menor tamaño que carecen del gen o simplemente porque no contienen plásmidos.

La presente invención propone un método molecular que permite la correcta identificación de todos los aislamientos de *Rhodococcus equi*, cualquiera que sea su origen (humano, animal o ambiental). El método consiste en la amplificación por PCR de una región del gen *choE*, codificante para el enzima colesterol oxidasa, que fue clonado y secuenciado en nuestro laboratorio.

Antecedentes

La detección de *Rhodococcus equi* como agente causal de una infección puede hacerse cultivando la bacteria a partir de una muestra de fluido biológico o tejido o por métodos serológicos. El cultivo presenta el inconveniente de su baja sensibilidad y la mayoría de los métodos serológicos tienen poca especificidad. Una vez aislado el microorganismo causante de la infección, la identificación se realiza en base a la morfología de las colonias y se confirma estudiando las propiedades bioquímicas. Los estudios bioquímicos son laboriosos y lentos, por lo que se han desarrollado sistemas que facilitan su ejecución, como la galería "API Coryne" o el sistema "Biotype 100", ambos fabricados por Biomerieux. El kit "API Coryne" permite diferenciar hasta 20 bacterias corineformes, entre las que se incluye *Rhodococcus equi*. Sin embargo, los estudios sobre la fiabilidad de este sistema han concluido que no es mayor del 60-65%. El sistema "Biotype-100" (BioMerieux) permite distinguir varias especies de *Rhodococcus*, *Gordonia* y *Dietzia* en base a la utilización de distintas fuentes de carbono.

Una de las principales aplicaciones de las técnicas de amplificación de ADN por reacción en cadena de la polimerasa es el diagnóstico microbiológico. En muchos casos estas técnicas son las de elección en el laboratorio clínico por la rapidez de su ejecución y porque proporcionan mayor sensibilidad y especificidad que las técnicas tradicionales. Muchos métodos de PCR para la identificación de microorganismos se basan en la amplificación de regiones variables del gen codificante para el ARN ribosómico 16S. Es conveniente disponer de un "target" de amplificación alternativo al ARNr 16S, ya que en especies próximas sus secuencias son muy homólogas, incluso en las zonas variables, lo que puede conducir a errores en la identificación. Además, al ser un ADN codificante para una molécula con función estructural, puede acumular más mutaciones que un gen que codifique para un enzima (como es el caso de la colesterol oxidasa) o para un regulador. De esta manera, diferentes aislamientos de una misma especie pueden presentar hasta un 4% de variación en la secuencia del ADN 16S.

Se propone un método de PCR que permite la identificación de todos los aislamientos de *Rhodococcus equi*, cualquiera que sea su origen (animal, humano o ambiental). El método está basado en la presencia en el genoma de *Rhodococcus equi* del gen *choE*, codificante para la colesterol oxidasa. Este gen fue aislado en nuestro laboratorio y el proceso de aislamiento y caracterización está recogido en un artículo publicado por Jesús Navas *et al.* en el número

183 de la revista Journal of Bacteriology, páginas 4796-4805 y titulado "Identification and mutagenesis by allelic exchange of *choE*, encoding a cholesterol oxidase from the intracellular pathogen *Rhodococcus equi*". Utilizando dos cebadores denominados COX se obtiene un producto de amplificación de 955 bp. Como sustrato de amplificación puede usarse ADN purificado o una muestra de fluido broncoalveolar, sangre o tejido pulmonar.

Descripción de la invención

La presente invención propone un proceso de diagnóstico molecular que permite la detección de *R. equi* por la técnica de amplificación en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando como iniciadores oligonucleótidos derivados de la secuencia del gen que codifica para la colesterol oxidasa. Se amplifica una región del gen *choE* delimitada por dos oligonucleótidos, denominados COX. Uno de ellos, denominado COX-F, tiene un tamaño de 21 bp, y su secuencia es SEQ ID NO1. El otro oligonucleótido (COX-R) tiene también un tamaño de 21 nucleótidos, y su secuencia es SEQ ID NO 2. El ADN, obtenido a partir de un cultivo de bacterias o de una muestra biológica, se somete a un proceso de PCR estándar utilizando una ADN polimerasa termoestable, y de 20 a 30 ciclos consistentes en una desnaturalización durante 1 minuto a 95°C, una hibridación con los cebadores por 1 minuto a 55°C y una elongación a 72°C durante 1 minuto. Los productos obtenidos se analizan por electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio. En el caso de las cepas de *Rhodococcus equi* se observa siempre una banda que en todos los casos tiene un tamaño de 955 pb. El método es 100% específico. Cuando se aplica a otras bacterias, algunas de ellas filogenéticamente muy próximas a *Rhodococcus equi*, no se observa ningún producto de amplificación. La lista completa de especies bacterianas utilizadas como controles negativos se recoge en la Tabla 1. Se trata de 29 especies del orden Actinomycetales, la mayoría de ellas patógenas. A la vista de estos resultados se concluye que el método es muy específico. Otra propiedad del método es su alta sensibilidad. Los estudios de sensibilidad con ADN purificado demuestran que se obtiene amplificación cuando se utiliza un mínimo de 0.2 ng de ADN genómico muy puro de *Rhodococcus equi*. Cuando se amplifica el lisado crudo bacteriano obtenido a partir de un cultivo se observa amplificación a partir de 30 unidades formadoras de colonia (U.F.C.) por mililitro. El método es muy rápido: el proceso completo de preparación del ADN, amplificación y detección del producto se realiza en 4 horas. En definitiva las principales ventajas del método de identificación de *Rhodococcus equi* por PCR usando los cebadores COX son su especificidad, su sensibilidad y su rapidez.

Es posible también realizar la identificación de esta especie por técnicas de hibridación usando como sonda el producto de la amplificación con los cebadores COX.

El método se ha validado aplicándolo a una colección de 130 aislamientos de *Rhodococcus equi* obtenidos en animales (potro, oveja y cabra), pacientes humanos y muestras de suelo, procedentes de varias áreas geográficas. La asignación inicial a la especie *Rhodococcus equi* de estos aislamientos se verificó observando las características morfológicas de las colonias y secuenciando una región variable del ADNr 16S en una muestra de 20 aislamientos de origen y procedencia geográfica diversa. Como control negativo se han utilizado 29 especies bacterianas filogenéticamente relacionadas con *Rhodococcus equi*. Asimismo el método ha permitido la identificación como *R. equi* de la cepa ATCC 21387, la única descrita de la especie *Brevibacterium sterolicum* y que se utiliza en la producción industrial de colesterol oxidasa.

TABLA 1

Cepas bacterianas utilizadas como negativos. CECT: Colección Española de Cultivos Tipo; LSA: Laboratorio de Sanidad Animal, Cantabria; HMV: Hospital Marqués de Valdecilla; HV: Hospital de Vitoria

Especie	Referencia	Origen
<i>Corynebacterium sp</i>	ATCC 14665	CECT
<i>C. urealyticum</i>	ATCC 43042	CECT
<i>C. kitchneri</i>	ATCC 15677	CECT
<i>C. variabilis</i>	ATCC 33010	CECT
<i>C. xerosis</i>	NCIMB 9956	CECT
<i>C. pseudotuberculosis</i>	ATCC 19410	CECT
<i>C. bovis</i>		LSA
<i>C. aquaticum</i>		LSA
<i>Mycobacterium sp</i>	NCIMB 11678	CECT

ES 2 222 061 B2

TABLA 1 (continuación)

Especie	Referencia	Origen
<i>Mycobacterium</i> sp	HV 162	HMV
<i>M. phlei</i>	ATCC 11758	CECT
<i>Msmegmatis</i>	ATCC 14468	CECT
<i>M bovis</i> BCG	ATCC 35744	CECT
<i>M xenopi</i>	HV 78931	HMV
<i>M kansasii</i>	HV 70243	HMV
<i>M tuberculosis</i>	HV 1908	HMV
<i>M terrae</i>	HV 52828	HMV
<i>M chelonae</i>	HV 71765	HMV
<i>M. lentiflavum</i>	HV 33805	HMV
<i>M peregrinum</i>	1941	HV
<i>Nocardia</i> sp	HV 158	HMV
<i>N. asteroides</i>	ATCC 19119	CECT
<i>Rhodococcus</i> sp	NCIMB 9457	CECT
<i>R erythropolis</i>	ATCC 11048	CECT
<i>Gordonia</i> sp	HV93049	HMV
<i>Brevibacterium</i> sp		LSA
<i>D. maris</i>	HV 58063	HMV
<i>T. otitidis</i>	HV62716	HMV
<i>Streptomyces</i> sp	HV 163	HMV

Un modo de realización

Los resultados deseados pueden obtenerse de maneras diversas. Los aspectos determinantes son los cebadores descritos que se utilizan para la amplificación del ADN de *Rhodococcus equi* y la pureza del propio ADN, que debe estar libre de contaminantes que inhiben la reacción de amplificación. A modo de ejemplo se describe un protocolo general que conduce a resultados satisfactorios:

Muestras

El sustrato de la reacción consiste en ADN procedente de cultivos bacterianos, lisados de cultivos o de extractos de fluidos biológicos o tejidos (sangre, fluido traqueal o fluido bronquial).

Obtención del ADN genómico

Las células obtenidas al cultivar *Rhodococcus equi* se lavan con agua destilada y se resuspenden en 0,25 ml de tampón Tris 10 mM EDTA 1mM pH 8 con 20 mg/ml de lisozima y 50 mg/ml de proteinasa K y se incuban a 37°C durante 2 horas. Las células se lisan añadiendo 0,25 ml de Tris 0.1 M pH 8 con 1% de SDS y 400 mg/ml de proteinasa K y se incuban a 55°C durante 1 hora. El lisado se mezcla con 0,1 ml de NaCl 5M y 0,1 ml de CETAB/NaCl y se incuban a 65°C durante 10 minutos. Se extrae entonces el ADN con fenol/cloroformo/isoamilalcohol, se precipita con isopropanol y se resuspende en agua destilada. Por este procedimiento se obtiene ADN de alta pureza. Otro método utilizado para la obtención de ADN genómico es mediante el uso de la resina Instagene Matrix, fabricada por la casa

ES 2 222 061 B2

BioRad. Se parte de una colonia o de un cultivo crecido en fase exponencial. Después de un lavado con agua destilada se añaden 50 microlitros de resina Instagene Matrix y se incuba la mezcla durante 20 minutos a 60°C y 10 minutos a 100°C. Se centrifuga y se recoge el sobrenadante.

5 *Amplificación*

Se somete el ADN, obtenido bien de un cultivo o de una muestra biológica, a un proceso de PCR estándar utilizando ADN polimerasa termoestable, y de 30 ciclos. Estos ciclos consisten en una desnaturalización por 1 minuto a 95°C, una hibridación con los iniciadores por 1 minuto a 55°C y una elongación a 72°C durante 1 minuto.

10

Detección

Los productos obtenidos se analizan por electroforesis en geles de agarosa al 0,8% y se visualizan en presencia de bromuro de etidio. El tamaño de las bandas se calcula utilizando como referencia una mezcla de fragmentos de DNA de peso molecular conocido.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Método de diagnóstico molecular para la detección e identificación de *Rhodococcus equi* mediante técnicas de amplificación molecular que utilizan los cebadores COX, cuyas secuencias son SEQ ID NO1 y SEQ ID NO2 respectivamente.

10 2. Método de diagnóstico molecular para la detección e identificación de *Rhodococcus equi*, según la reivindicación primera, **caracterizado** porque permite la identificación específica de *Rhodococcus equi* en base a la amplificación por PCR usando los cebadores COX derivados del gen *choE*, codificante para la colesterol oxidasa.

3. Método de diagnóstico molecular para la detección e identificación de *Rhodococcus equi*, según las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque pueden ser utilizados como iniciadores dos fragmentos de DNA monocatenario cuya secuencia es SEQ ID NO1 y SEQ ID NO2 respectivamente, o sus secuencias complementarias.

15 4. Método de diagnóstico molecular para la detección e identificación de *Rhodococcus equi* según las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque se realiza por un proceso de hibridación de ADN usando como sonda molecular el producto de amplificación obtenido con los cebadores COX, como tal o modificado por cualquier procedimiento de marcaje.

20 5. Método de diagnóstico molecular para la detección e identificación de *Rhodococcus equi* que según las reivindicaciones anteriores se **caracteriza** por incluir entre alguno de sus componentes los cebadores COX, los complementarios y/o la sonda descrita en el método de diagnóstico molecular para la detección e identificación de *Rhodococcus equi*.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 222 061 B2

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Universidad de Cantabria

5 <120> Método de diagnóstico molecular para la detección e identificación de *Rhodococcus equi*

<140> P200200012

10 <141> 2002-01-03

<160> 2

<210> 1

15 <211> 21

<212> DNA

<213> *Rhodococcus equi*

20 <400> 1

gtcaacaaca tcgaccaggc g

25 <210> 2

<211> 21

<212> DNA

30 <213> *Rhodococcus equi*

<400> 2

35 cgagccgtcc acgacgtaca g

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 222 061

⑫ Nº de solicitud: 200200012

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 03.01.2002

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.7: C12Q 1/68

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	NAVAS, J. et al. "Identification and mutagenesis by allelic exchange of choE, encoding a cholesterol oxidase from the intracellular pathogen Rhodococcus equi." J. BACTERIOL., 2001, Vol. 183, Nº 16, páginas 4796-4805. Ver todo el documento.	1-5
A	OHTA, T. et al. "Sequence of gene choB encoding cholesterol oxidase of Brevibacterium sterolicum: comparison with choA of streptomyces sp. SA-COO." GENE, 1991, Vol. 103, Nº 1, páginas 93-96. Ver todo el documento.	1-5
A	BELL, K.S. et al. "Identification of Rhodococcus equi using the polymerase chain reaction." LETT. APPL. MICROBIOL., 1996, Vol. 23, Nº 2, páginas 72-74.	1-5
A	TAKAI, S. et al. "Detection of virulent Rhodococcus equi in tracheal aspirate samples by polymerase chain reaction for rapid diagnosis of R. equi pneumonia in foals." VET. MICROBIOL., 1998, Vol. 61, Nº 1-2, páginas 59-69. Ver todo el documento.	1-5
A	TAKAI, S. et al. "Identification of virulent Rhodococcus equi by amplification of tene coding for 15- to 17-kilodalton antigens." J. CLIN. MICROBIOL., 1995, Vol. 33, Nº 6, páginas 1624-1627. Ver todo el documento.	1-5
A	VIVRETTE, S.L. et al. Clinical application of a polymerase chain reaction assay in the diagnosis of pneumonia caused by Rhodococcus equi in a horse." J. AM. VET. MED. ASSOC., 2000, Vol. 217, Nº 9, páginas 1348-1350.	1-5

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

09.12.2004

Examinador

J.L. Vizán Arroyo

Página

1/1