



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① N.º de publicación: **ES 2 078 174**

② Número de solicitud: 9302728

⑤ Int. Cl.<sup>6</sup>: C12Q 1/68

C12P 19/34

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **16.12.93**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.12.95**

⑬ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**01.12.95**

⑦ Solicitante/s: **Universidad de Cantabria**  
**Avda. de los Castros, s/n**  
**39005 Santander, ES**

⑦ Inventor/es: **Aguero Balbín, Jesús;**  
**García Lobo, Juan María y**  
**Sangari García, Félix Javier**

⑦ Agente: **No consta**

⑤ Título: **Métodos de diagnóstico molecular para la detección de *Brucella abortus* y en diferenciación de la cepa vacunal B19.**

⑤ Resumen:

Métodos de diagnóstico molecular para la detección de *Brucella abortus* y su diferenciación de la cepa vacunal B19.

Se describen una serie de métodos de diagnóstico molecular que permiten la diferenciación entre la estirpe vacunal *Brucella abortus* B19 y todas las demás estirpes del género *Brucella*.

En un caso se aplica la amplificación de genoma, usando como iniciadores oligonucleótidos derivados de la región que contiene los genes codificantes de la ruta de utilización del eritritol.

Otro grupo de métodos se basa en la hibridación de ADN genómico usando como sondas oligonucleótidos de la mencionada región *eri*.

En este caso pueden aplicarse según la técnica denominada hibridación tipo Southern o alternativamente por el procedimiento del "Dot blot".

Finalmente se aplican estos métodos para la identificación de gérmenes del género *Brucella* en cualquier muestra biológica. Los nuevos procedimientos son ventajosos sobre los métodos tradicionales, inmunológicos o de cultivo, aportando mayor especificidad y rapidez.

## DESCRIPCION

Métodos de diagnóstico molecular para la detección de *Brucella abortus* y su diferenciación de la cepa vacunal B19

### Objeto de la invención

La brucelosis bovina es una enfermedad del ganado vacuno producida por la bacteria *Brucella abortus*. Se trata de una enfermedad de fácil transmisión entre animales y eventualmente al hombre que también puede sufrirla. Es importante como causa de abortos e infertilidad en el ganado. Esto determina un coste económico que se estima en el orden de miles de millones de pesetas anuales. Para combatirla, se llevan a cabo campañas de saneamiento ganadero. Las campañas de prevención contra la brucelosis bovina se basan en la vacunación de animales jóvenes con la vacuna viva atenuada conocida como B19. Se trata de una variante espontánea, no virulenta de *Brucella abortus* que genera inmunidad protectora. A veces la cepa vacunal puede persistir en animales vacunados. En este caso no resulta fácil distinguir dicho animal de otro que sufre una infección por cepas virulentas, ya que las pruebas diagnósticas al uso de la brucelosis, basadas en la serología, no permiten diferenciar estos animales vacunados de los animales enfermos. Esta imprecisión genera un coste económico adicional ya que se produce el sacrificio de animales que no lo requerirían. La cepa vacunal B19 además de ser avirulenta presenta ciertas características diferenciales con otras brucelas. Algunas de estas son la sensibilidad al eritritol, y a ciertos colorantes. Estos caracteres solo se harían patentes tras el cultivo, que en el caso de las brucelas es un proceso lento y tedioso. Hasta ahora se desconocían diferencias a nivel genético entre B19 y otras cepas de *Brucella*.

Nosotros aportamos un método nuevo que permite diferenciar entre cepas ambientales de *Brucella abortus* y la cepa atenuada B19, usada esta última prácticamente en todo el mundo como vacuna contra la brucelosis bovina. Dicho método se fundamenta en la diferencia que hemos encontrado entre los genes que codifican la utilización del eritritol en ambos tipos de gérmenes. Gracias a estos métodos sería posible distinguir con seguridad y rapidez entre animales realmente infectados con cepas ambientales de *Brucella abortus* y aquellos que muestran una persistencia de la cepa vacunal B19.

### Estado de la técnica

Se han descrito métodos que permiten, en determinados casos, diferenciar entre animales vacunados con persistencia de B19 y animales infectados por estirpes patógenas. Estos métodos son serológicos, y se basan en detectar anticuerpos específicos para los denominados Hapteno Nativo (HN) o polisacárido B, antígenos que se suponen derivados del metabolismo celular del lipopolisacárido de *Brucella*. Consecuentemente, los anticuerpos frente a estos componentes antigénicos deberían de estar únicamente presentes en animales infectados (R. Díaz et al. J Clin Microbiol 10: 37 -41). Sin embargo esto no siempre es así y las técnicas diferenciales basadas en la detección de anticuerpos frente al HN o al polisacárido B no

son definitivas.

La introducción de las técnicas de amplificación exponencial por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) descritas por Saiki et al (Nature, 324:163 y Science 230:1250) y por Mullis en la patente U.S. N° 4.683.195 se han aplicado para el diagnóstico molecular en *Brucella* (A. Fekete et al. J Vet Diagn Invest 4:79-83; L. Herman y H. De Ridder. Appl Environ Microbiol 58:2099-2101).

Bricker y Halling han descrito ensayos para la detección rápida por PCR de estirpes pertenecientes al género *Brucella* y para la diferenciación de *Brucella abortus* y *Brucella ovis*, haciendo uso de iniciadores relacionados con una secuencia de inserción específica del género *Brucella* (S.M. Halling et al. Gene 133:123-127 y U.S. pat N°670.602). Sin embargo hasta el momento no existen técnicas diferenciales entre B19 y otras brucelas basadas en la estructura genética de estas bacterias.

Nuestros estudios sobre la biología molecular de *Brucella abortus* (F. Sangari y J. Agüero. Microbial Pathogen 11:443 -446) nos han permitido obtener un conocimiento detallado de la región del cromosoma de esta especie implicada en el metabolismo del eritritol (región eri), tanto a partir de una cepa prototipo de cepas virulentas (*B. abortus* 2308) como de la cepa vacunal B19.

En una primera etapa hemos clonado y obtenido un mapa físico de la región eri de ambas estirpes (*B. abortus* 2308 y B19), que se recoge en la figura 1, y posteriormente hemos determinado la secuencia de nucleótidos de la citada región, tanto de *B. abortus* 2308 como de B19 (figura 2). Como resultado más sobresaliente para el desarrollo del invento que se describe, cabe mencionar la ausencia en el genoma de B19 de una región de 702 pares de bases comprendida entre las posiciones 2.153 y 2.854 en la secuencia de *B. abortus* 2308 (Figura 2a). Esta delección es la base de nuestro invento.

### Descripción de la invención

En primer lugar, la presente invención propone un proceso de diagnóstico molecular que permite la diferenciación entre cepas virulentas de *B. abortus* y la cepa vacunal B19 por la técnica de amplificación en cadena por la polimerasa (PCR), utilizando como iniciadores oligonucleótidos derivados de la secuencia que se muestra en la figura 2.

En segundo lugar proponemos un proceso de diagnóstico molecular que permite la diferenciación entre cepas virulentas de *B. abortus* y la cepa vacunal B19 usando como técnica la hibridación de ADN con sondas moleculares derivadas de la región eri que se ha descrito en las Figuras 1 y 2.

Finalmente proponemos un proceso de diagnóstico molecular, tanto por PCR como por hibridación, basado en la exclusividad de la región eri, que permite identificar bacterias del género *Brucella* en muestras biológicas obtenidas de personas o animales usando iniciadores derivados de la secuencia de la figura 2 o sondas derivadas de la misma secuencia o del mapa presentado en la figura 1.

Para los procedimientos basados en la PCR,

se utilizan como iniciadores dos oligonucleótidos. Uno de ellos tiene un tamaño que oscila entre 2 y 1000 nucleótidos siendo lo más habitual entre 10 y 25, y su secuencia o parte de su secuencia es una subsecuencia contenida en la cadena superior de las mostradas en la figura 2 en cualquier posición comprendida entre 1 y 2.152. El otro oligonucleótido, tiene las mismas consideraciones de tamaño, pero su secuencia o parte de su secuencia es una subsecuencia contenida en la cadena inferior de las de la figura 2 en cualquier posición de las comprendidas entre 2.855 y 3.162, en el caso de la secuencia de la figura 2a, o entre las posiciones 2.153 y 2.460 de la secuencia que se muestra en la figura 2b. Sean cualesquiera los oligonucleótidos empleados, cumpliendo los requisitos descritos, cuando ADN, obtenido bien de un cultivo o de una muestra biológica (sangre, leche, fluidos vaginales, etc), sin necesidad de separación de otros ADNs contaminantes, se somete a un proceso de PCR estándar usando ADN polimerasa termoestable, y de 20 a 30 ciclos consistentes en una desnaturalización por 2 minutos a 95°C, una hibridación con los iniciadores por minuto y medio a 59°C y una elongación a 72°C durante 2 minutos, y los productos obtenidos se analizan por electroforesis en agarosa y tinción con bromuro de etidio, se observa en el caso de la cepa vacunal B19 una banda que en todos los casos será 702 pares de bases más pequeña que la que se obtiene en el caso de todas las demás cepas del género *Brucella*.

La caracterización de las regiones eri de *B. abortus* tipo salvaje y de B19 permite otra manera de llevar a cabo la diferenciación entre los dos organismos mencionados utilizando hibridación de ADN en vez de la PCR. Al existir una delección de 702 pares de bases en el cromosoma de B19, la digestión del ADN cromosómico y posterior análisis por hibridación según la técnica de Southern con una sonda adecuada, dará lugar a un polimorfismo con valor diagnóstico. Dado que existen muchas endonucleasas de restricción con numerosísimos puntos de corte en la región eri, y cualquier subsecuencia comprendida en la secuencia que se muestra en la Figura 2 pudiera usarse como sonda, resulta imposible hacer una enumeración exhaustiva de las posibilidades para llevar a cabo este procedimiento. En general tras la hibridación se observará una banda que será 702 pares de bases menor en B19 que en el resto de las estirpes de *Brucella*. Si la endonucleasa utilizada para fragmentar el ADN genómico tiene un sitio en los 702 pb delecionados en B19, se observará en esta última una sola banda, mientras que en las demás brucelas se observarán dos bandas, de modo que la suma de su tamaño excede en 702 pb a la banda observada en B19.

Otra posibilidad interesante es el uso de una sonda comprendida dentro de los límites de los 702 pb delecionados en B19. En este caso no se observará señal en B19, mientras que el resto de cepas de *Brucella* hibridarán en alguna banda. Este caso puede ser utilizado en un proceso más sencillo de hibridación que no necesita la digestión del ADN genómico bacteriano ni la separación de los fragmentos por electroforesis, técnica habitualmente conocida como "dot blot".

### Descripción de las figuras.

Figura 1. Mapa de restricción de la región del cromosoma de *Brucella abortus* implicada en el metabolismo del eritritol (región eri). En la parte superior se muestra el fragmento EcoRI de 7,75 kb obtenido de *B. abortus* 2308 que es común a las demás cepas salvajes de *Brucella*. Se muestran los sitios de reconocimiento para algunas endonucleasas de restricción disponibles comercialmente, con la coordenada de su posición entre paréntesis.

En la parte inferior se muestra el mismo mapa del fragmento EcoRI obtenido de *B. abortus* B19, con un tamaño de 7,05 kb. Si comparamos el mapa de B19 con el de 2308 notamos la ausencia en B19 de una región de 0,7 kb que se señala con trazo discontinuo. El segmento negro entre ambos mapas indica la escala y corresponde a 1 kb.

Figura 2. Secuencia de nucleótidos alrededor de las regiones eri de *B. abortus* 2308 (2a) y de *B. abortus* B19 (2b). Se muestran las dos cadenas de ADN según la notación estándar. La cadena superior discurre en sentido 5'→3' y la inferior en sentido 3'→5'. Las secuencias de 2308 y B19 son idénticas desde la posición 1 hasta la posición 2.152. La secuencia comprendida entre las posiciones 2.153 y 2.854 de 2308 está ausente en B19. Finalmente la secuencia comprendida entre las posiciones 2.855 y 3.162 de 2308 es idéntica a la comprendida entre 2.153 y 2.460 de B19.

### Maneras de realizar la invención

#### Ejemplo 1

Diferenciación entre *B. abortus* B19 y otras brucelas por PCR, usando como iniciadores los oligonucleótidos #11: TTGGCGGCAAGTCCGTCGGT y #12: CCCAGAAGCGAGACGAAACG. Estos oligonucleótidos derivan de la secuencia descrita en la Figura 2a. El primero está contenido en la cadena superior, entre las posiciones 1.965 y 1.984 y el segundo deriva de la cadena inferior entre las posiciones 3.027 y 3.008.

Cuando una muestra de cualquier origen, conteniendo ADN, se somete a un proceso de PCR estandar usando ADN polimerasa termoestable, y de 25 a 30 ciclos consistentes en una desnaturalización por 2 minutos a 95 °C, una hibridación con los iniciadores por minuto y medio a 59°C y una elongación a 72°C durante 2 minutos, y los productos obtenidos se analizan por electroforesis en agarosa y tinción con bromuro de etidio, se observa en el caso de encontrarse en la muestra la cepa vacunal B19 una banda de 361 pares de bases y de 1.063 pares de bases en el caso de todas las demás cepas del género *Brucella*.

#### Ejemplo 2

Diferenciación entre *Brucella spp.* y *Brucella abortus* B19 u otros géneros bacterianos por PCR utilizando los oligos #13: CAGGATCGGCTCACCGCC y #14: GAAATGAAGCCAGGC-GGCG derivados de la secuencia que se muestra en la figura 2a de las posiciones 2.177-2.194 de la cadena superior y 2.650-2.632 de la cadena inferior respectivamente.

En este caso y llevando a cabo el proceso según se ha descrito en el ejemplo 1 se obtendría una molécula de ADN amplificada de 474 pares de bases en todos los casos en los que en la muestra esté presente ADN de cualquier especie de *Brucella*, pero no se obtendría ninguna amplificación

en el caso de que estuviera presente B19 o cualquier otra bacteria de diferente género.

#### Ejemplo 3

Diferenciación entre *B.abortus* B19 y otras brucelas mediante un experimento de hibridación de ADN por la técnica de Southern, usando como sonda el fragmento de restricción BalI de 1kb que se localiza entre las coordenadas 2,85 y 3,85 del mapa de la figura 1.

Cuando usamos esta sonda marcada con un isótopo radiactivo, o de otra manera (biotina, digoxigenina, fluoresceína, etc) y digerimos los ADNs cromosómicos con EcoRI (endonucleasa que no presenta ningún sitio dentro de los 702 pb delecionados en B19), observamos tras la separación de los fragmentos EcoRI por electroforesis, transferencia del ADN a nitrocelulosa o nylon y posterior hibridación con la sonda, una banda de 7 kb en B19 y de 7,7 kb en las demás brucelas. Nótese  $7,7 = 7 + 0,7$  Si usamos HindIII (endonucleasa que presenta un sitio de corte dentro de

los 702 pb) para digerir el cromosoma, obtenemos tras la hibridación con la misma sonda una banda de 5,1 kb en el caso de B19 y dos bandas de 3,1 y 2,7 kb en el caso de las demás brucelas. Nótese  $5,1 = 3,1 + 2,7 - 0,7$ .

#### Ejemplo 4

Diferenciación entre *Brucella spp* y *Brucella abortus* B19 u otros géneros bacterianos mediante una hibridación de ADN por la técnica del "dot blot", usando como sonda el fragmento de ADN de 0,6 kb obtenido por digestión del ADN genómico de *B. abortus* entre los sitios ClaI y HindIII en las coordenadas 3,1 y 3,7 del mapa de la figura 1, y marcado por cualquiera de las maneras mencionadas en el ejemplo 3.

Al hibridar el ADN obtenido de una muestra biológica cualquiera, fijado en una membrana según la técnica conocida como "dot blot", sólo se observará hibridación en el caso de que en la muestra esté presente cualquier microorganismo del género *Brucella* que no sea B19.

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65

## REIVINDICACIONES

1. Un método de diagnóstico molecular que permite la diferenciación entre cepas virulentas de *Brucella abortus* y la cepa vacunal B19, que se **caracteriza** por utilizar como base diferencial la delección de material genético que ocurre en la región eri de la cepa vacunal B19.

2. Un método de diagnóstico molecular que permite la diferenciación entre cepas virulentas de *Brucella abortus* y la cepa vacunal B19 según la reivindicación 1, que además se **caracteriza** por realizarse por amplificación de ADN genómico bacteriano por PCR usando oligonucleótidos iniciadores derivados de la secuencia de la región eri de *Brucella* descrita en la figura 2.

3. Un oligonucleótido individual o una mezcla de ellos derivados de la secuencia de la región eri de *Brucella* descrita en la figura 2, que puedan ser usados como iniciador en un proceso según las reivindicaciones 1 y 2.

4. Un método de diagnóstico molecular que permite la diferenciación entre cepas virulentas de *Brucella abortus* y la cepa vacunal B19 según las reivindicaciones 1, 2 y 3, **caracterizado** además por aplicarse a muestras biológicas obtenidas de animales o a cultivos bacterianos.

5. Un método de diagnóstico molecular que permite la diferenciación entre cepas virulentas de *Brucella abortus* y la cepa vacunal B19 según la reivindicación 1, que además se **caracteriza** por realizarse por un proceso de hibridación de ADN usando como sonda molecular una región de cualquier tamaño derivada de la región eri de *Brucella*.

6. Un oligonucleótido individual o una mezcla de ellos derivados de la región eri de *Brucella* descrita en las figuras 1 y 2, que puedan ser utilizados como sonda en un proceso según las reivindicaciones 1 y 5.

7. Un método de diagnóstico molecular que permite la diferenciación entre cepas virulentas de *Brucella abortus* y la cepa vacunal B19 según las reivindicaciones 1, 5 y 6, que además se **caracte-**

**riza** por aplicarse a muestras biológicas obtenidas de animales o a cultivos bacterianos.

8. Un método de diagnóstico molecular que permite la detección e identificación de bacterias del género *Brucella*, **caracterizado** por estar basado en la secuencia de nucleótidos de la región eri de *Brucella*.

9. Un método de diagnóstico molecular que permite la detección e identificación de bacterias del género *Brucella*, según la reivindicación 8, que se **caracteriza** además por realizarse por amplificación de ADN genómico bacteriano por PCR usando oligonucleótidos iniciadores derivados de la secuencia de la región eri de *Brucella* descrita en la figura 2.

10. Un oligonucleótido individual o una mezcla de ellos derivados de la secuencia de la región eri de *Brucella* descrita en la figura 2, que puedan ser utilizados como iniciador en un proceso según las reivindicaciones 8 y 9.

11. Un método de diagnóstico molecular que permite la detección e identificación de bacterias del género *Brucella*, según las reivindicaciones 8, 9 y 10, que se **caracteriza** además por aplicarse a muestras biológicas obtenidas de animales o personas o a cultivos bacterianos.

12. Un método de diagnóstico molecular que permite la detección e identificación de bacterias del género *Brucella*, según la reivindicación 8, que además se **caracteriza** por realizarse por un proceso de hibridación de ADN usando como sonda molecular una región de cualquier tamaño derivada de la región eri de *Brucella*.

13. Un oligonucleótido individual o una mezcla de ellos derivados de la región eri de *Brucella* descrita en las figuras 1 y 2, que puedan ser utilizados como sonda en un proceso según las reivindicaciones 8 y 12.

14. Un método de diagnóstico molecular que permite la detección e identificación de bacterias del género *Brucella*, según las reivindicaciones 8, 12 y 13, que además se **caracteriza** por aplicarse a muestras biológicas obtenidas de animales o personas o a cultivos bacterianos.

Figura 1

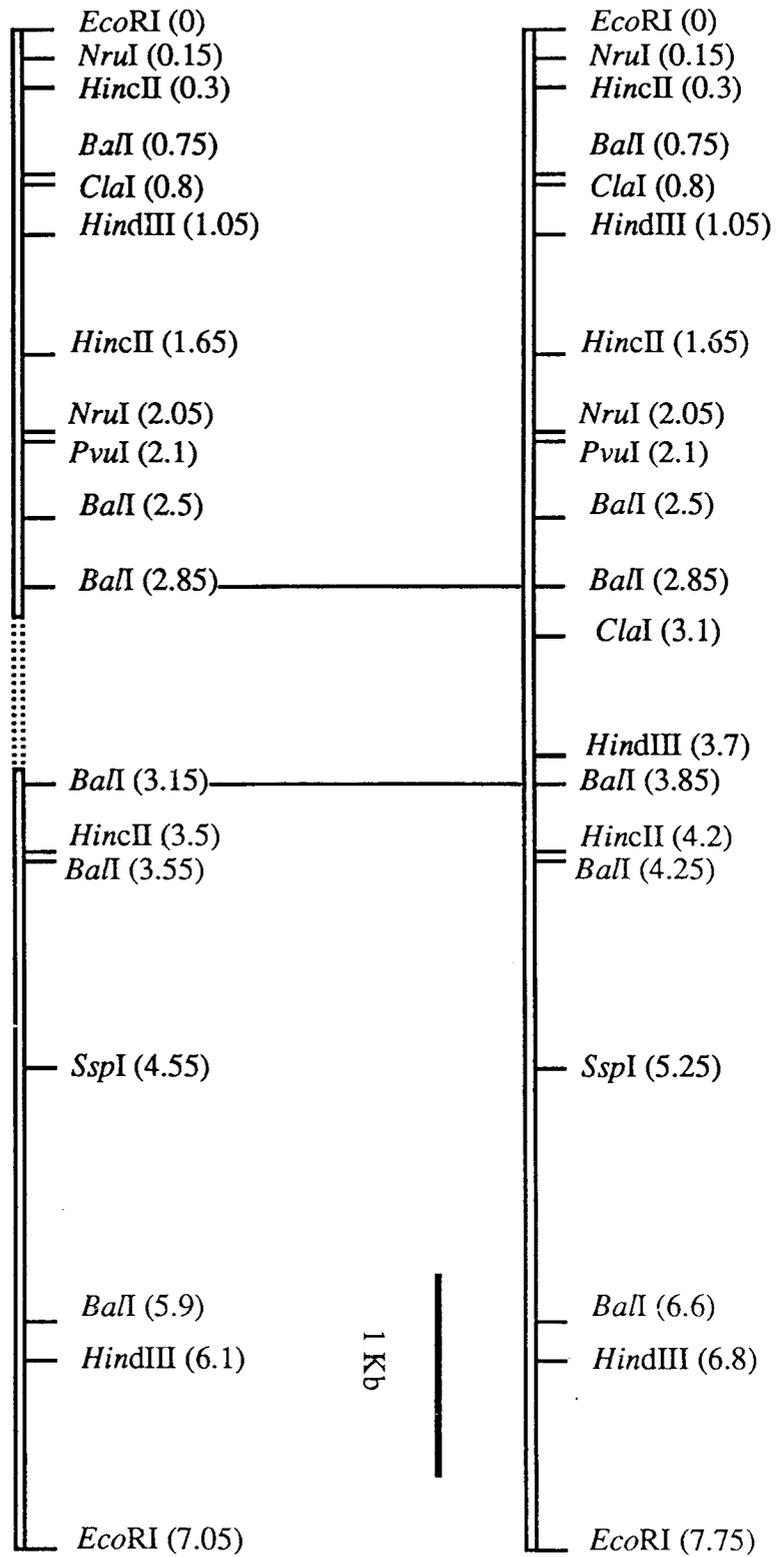


Figura 2 a

Secuencia completa de 2308

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
AAGCGAAGCC CGGATCGCGC GCGGGCGCAC CAATATGAAG AACTTTTCGT TGCCTATCGG GAAGCGCGGC TGGCTCTTGC GCCAGTCTGG GACAAACTCG
TTGGCTTCGG GCCTACGCGC CGCCCGCGTG GTTATACTTC TTGAAAAGCA ACGGATAGCC CTTCCGCCCC ACCGAGAAGC CGGTACAGACC CTGTTTGAGC

110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
CTTCCGCAAA ATAAGGAAGC ATTGAAATGG CTGAACCGGA AACCTGCGAC CTGTTTGTA A TTGGCGCGCG CATCAACGGT GCGGGCGTGG CCCCGGACGC
GAAGGCCGTT TATTCCTTTG TAACITTTACC GACTTGGCCG TTGGACGGTG GACAAACATT AACCCGCGCC GTAGTTGCCA CGCCCGCACC GGGCGCTGCG

210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
GGCCGGCGCG GGCCTCAAGG TGGTGTGGG AGAAAAGGAC GATCTGGCGC AAGGCACATC ATCGGCTTCC GGCAAGCTGG TGCATGGCGG TTTCCGCTAT
CCGGCCCGCG CCGGAGTTC ACCACGACCG TCTTTTCCG CTAGACCGGG TTCGGTGTAG TAGCCGAAGG CCGTTGACCC ACGTACCGCC AAACGGGATA

310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
CTCGAATATT ATGAGTTCGG CCTTGTGGCG GAAGCGGTGA TCGAGCGCGA AGTGTCTTTG AATGCGGCAC CCCATATCAT CTGGCCGATG CGCTTCGTGC
GAGCTTATAA TACTCAAGGC GGAACACGCG CTTCCGCACT AGCTCGCGCT TCACGAAAAC TTACGCCGTG GGGTATAGTA ACCGGGTACC GCGAAGCAGC

410     420     430     440     450     460     470     480     490     500
TGCCGCACAG CCCCGAGTA CGCCCGCCCT GGCTGGTGGG GCCTGGCCCTG TTTCTCTATG ACCATCTGGG CCGGCGCAAA AAATCTCCCG GCACCGGTAC
ACGGCGGTTC GGGCGTCTAT CCGGCGCGGA CGACCCAGC CGAACCGGAC AAAGAGATAC TGGTAGACCC GCGCGCTTTT TTTGAAGGGC GCGCGGATG

510     520     530     540     550     560     570     580     590     600
GCTCGATCTG AAGCGCGACC CCGAAGGCAC GCGGATCCTC GACCACTACA CCAAGGGTTT TGAATATTCG GATTGTCTGG TGGACGATGC GCGCCTCGTG
CGAGCTAGAC TTCCGCGTGG GCCTTCCGTG CGGCTAGGAG CTGGTCACTG GGTTCGCAAA ACTTATAAGC CTAACGACCC ATCTGCTACG CCGCGGACAC

610     620     630     640     650     660     670     680     690     700
GCGCTCAATG CGGTGGTGGC CGCCGGAATA GGCTCGACCA TTCTCACCAG TACACCGGTC GTCTCCGCAC GCGCGCAAAA TGGCGGCTGG ATCTGGAAA
CGGAGTTTAC GCCACCCAGC GCGCGCTTTT CCGAGCTGGT AAGAGTGGCC ATGTGGCCAG CAGAGGCGTG CCGCGCTTTT TTTGAGGGC GCGCGGATG

710     720     730     740     750     760     770     780     790     800
CCAGAAACAG CGATACCGGC GAAACCCGCA CCTTCCGCGC CCGCTGCATC GTCAATTGCG CCGGACCATG GGTACCGGAC GTCATCCACA ATGTCCGCTC
GGTCTTTGTC GCTATGGCCG CTTTGGCCGT GGAAGGCGCG GCGCAGCTAG CAGTTAACCC GGCCTGGTAC CCAAGTCCCTG CCAAGTCCCTG TACAGCGAGC

810     820     830     840     850     860     870     880     890     900
CTCCACCTCG TCGCGCAATG TGGCGCTCGT CAAGGGCAGC CACATCATCG TTCCGAAAIT TGGTCCGGGC GCAAACCGCT ATCTCGTACA GAACCCAGC
GAGGTGGAGC AGCGGTTTAC ACGCGGAGCA GTTCCCGTGC GTGTAGTAGC AAGGCTTTAA GACCAGCCCG CGTTTGGCGA TAGAGCAAGT TTTGGCTG

910     920     930     940     950     960     970     980     990     1000
AAGCGCGTGA TCTTTCATCA TCCATATGAA GGTGACAAAG CGCTGATCGG CACCACCGAC ATTGCCTATG AAGCCCGGGC GGAAGACGTT GCGGCGGATG
TTCCGCACTC AGAAGTACTT AGGTATACTT CCACTGTTCG CCGACTAGCC GTGGTGGCTG TAACGGATAC TTCCGGCCCG CCTTCTGCAA ACGCGGCTAC

1010    1020    1030    1040    1050    1060    1070    1080    1090    1100
AGAAGCAAGT CGACTATCTC ATCACCAGCG TAAACCGGTA TTTCAAGGAA AAGTCCCGGC GCGAAGACGT GCTGCACCTC TTCTCCGGCG TGCCCGCGCT
TCTTCTTTTA GCTGATAGAG TAGTGGCGCC ATTTGGCCAT AAAGTTCCTT TTCCGAGCGC CGCTTCTGCA CGACCTGAGG AAGAGGCGCG ACGCGGCGCA

1110    1120    1130    1140    1150    1160    1170    1180    1190    1200
GTTTGACGAC GCAAGGGGCA ATCTTCCCGC CGTACCAGCG GATTACGTGT TCGATCTGGA CGAAACCGGC GGTGCACCGC TGCTCAACGT CTTTGGCGGC
CAAACCTGCT CGTTCGCCGT TAGGAAGGCG GCAATGGGCG CTAATGCACA AGCTAGACCT CCTTGGCCCG CCACTGCGCG AAGAGGCGCG ACGCGGCGCA

1210    1220    1230    1240    1250    1260    1270    1280    1290    1300
AAGATCACCA CTTTCCCGCA ACTGGCGGAG CCGCGGATGC ATCGGCTCAA GCACATTTTC CCGCAATGCG GCGGCGACTG GACCCACGAC GCGCGCTGCG
TTCTAGTGGT GGAAGGCGCT TGACCGCTCG CGCCCTACG TAGCCGAGT CBTGTAAAG CBTGTAAAG GCGCTTTACC CCGCGCTGAC CTGGGCTGCG CCGCGGAGC

1310    1320    1330    1340    1350    1360    1370    1380    1390    1400
CCGGCGGCGA GAITTGCATC GCGGATTATG AAACCTTCGC CAATACCTTA CCGCACACCT ATCCATGGAT GCGCGGCACA CTCGTTTATC ATTATGAGCC
GGCGCGGCT CTAACGGTTA CCGCTAATAC TTTGGAAGCG GTTATGAAAT GCGCTGTGGA TAGGTACCTA CCGCGCGTGT GAGCAAGTAG TAATACCTG

1410    1420    1430    1440    1450    1460    1470    1480    1490    1500
GCTCTATGGT GCGCGCACAA AGSATGTGGT GCGTGGCGCG CAGAACCTCG AAGGCTTGG CCGTCACTTC GCGCGCGATT TCCATGAGCG GGAAGTGGCG
CGAGATACCA CCGCGGTGTT TCTTACACCA CCGACCGCGC GTCCTGGAGC TTCCCGAACC GGCAGTGAAG CCGCGCTAA AGGTACTTCC CTTTACCGC

1510    1520    1530    1540    1550    1560    1570    1580    1590    1600
TATCTGTGGG CCAAGAAATG GGCAAAGAGC GCAGAAAGCA TTTCTATCG CCGCACCAAG CATTACCTGC ATTTGACCGA AGCCGAACCG GCGCGTTTCC
ATAGACCACC GGTCTCTTAC CCGTTTCTGC GCTTCTTGT AAGAGATAGC GCGGTGGTTC GTAATGGAGC TAAACTGGCT TCGGCTTGGC CCGCGAAAGC

1610    1620    1630    1640    1650    1660    1670    1680    1690    1700
TGGAAATGGT CGACAAGCCC AATCTAGTTG CTTGAGGAGC ATATGGCCCT GCAGCTTTCG CTCAACACCA ATCCGCTGGT CAACCGCTTT GCGGAGCCCG
ACCTTACCAA GCTGTGCGG TTAGATCAAC GAACCTCTGC TATACCGGA CCGTGAALGC GAGTTGTGGT TAGCGGACA GTTGGCGAAA CCGCTCGGC

1710    1720    1730    1740    1750    1760    1770    1780    1790    1800
ACGACCTGAT CAAACCGGTT GCGCGGACC TGCGCCTGGG TGACCTCCAG CTTACCCATG AGTTTATCAA TCCAAGCTGG CAGGCCTCGA CCATCCGCGC
TGCTGACTA GCTTTGCCAA CCGGCGCTGG ACGCGGACCG ACTGGAGTTC GAATGGGTAC TCAAATAGTT AGGTTCCGACC GTCCGGAGCT GTTAGCGGC

1810    1820    1830    1840    1850    1860    1870    1880    1890    1900
CCTCACCGCC GACATGGACA GGGCCTTCCA GCGCACCGGT GTCCGCGTCA CCTCCGGCAT GACCGGCCCC TATGGCCGCC TCAACCATTT TGGCCATACC
GGAGTGGGCG CTGACTCTGT CCGGAAAGT CCGGTGGCCA CAGGCGCAT GGAGGCGGTA CTGGCCGGG ATACCAGCGG AGTTGGTAAA ACCGGTAGGG

1910    1920    1930    1940    1950    1960    1970    1980    1990    2000
GACCGGACCG TGCGCCGCTA TTATGTGGAC TGGTTCAAGA CCTTGGCGCA TAITATCGCG GATCTTGGCG GCAAGTCCGT CCGTACCGAG TTTGCAATG
CTGGCCCTGC ACGCGCGGAT AATACACCTG ACCAAGTTCT GGAACCGCT ATATAGCGC CTAGAACCGC CGTTACAGCA GCCATGGCTC AAACCTTAGA

2010    2020    2030    2040    2050    2060    2070    2080    2090    2100
TCACCTATAA GGATTTTCAT GATCCGCGCG GCGCGGAGA ACTTATCAAG ATCGCCATCG ACTGCTGGG CAGGTTGGCC GAACATCGCG CAGGTGCGGG
AGTGGATATT CCTAAGCTA CTAGCCCGCG CCGGCTTCT TGAATAGTTC TAGCGGTAGC TGACGACCCG GCTCCACCGG CTTGTACGCG GTCCACCGCC

2110    2120    2130    2140    2150    2160    2170    2180    2190    2200
CCTCGACTAT GTGTTCTGGG AGCGGATGG CATCGGCGCG GAATTTGGCG AGACGATTCG CGAATGCATG AAGCTTCAGG ATCGGCTTAC CCGCGCTAAC
GGAGCTGATA CACAGACCC CCGGCTACTC GTAGCCCGCG CTTAAACCGC TCTGCTAACG GCTTACGTC TTGGAAGTCC TAGCCGAGTC GCGCGGATG

2210    2220    2230    2240    2250    2260    2270    2280    2290    2300
ATGGCGATCC CCAATGGATG GATGGCCGAT ATCGACCATG GTGACGTGAC ATCCGCTAAC CCGGACGACT ACGATCCTTA CGCATGGGCC CCGACCGTCC
TAGCGCTAGG GGTACACCTA CTACCGGCTA TAGCTGGTAC CACTGCCTG TAGCGGATG GGCCTGCTGA TGCTAGGAAT GCGTACCCGG CCGTGGCAGC

```

ES 2 078 174 A1

2310 2320 2330 2340 2350 2360 2370 2380 2390 2400  
 CGAAAGTCTC GCCCATCATC CATATCAAGC AAAGCCTGAT GGACAAGGGC GGGCATCGTC CTTTCACAGC CGCGTTCAAT GCCAAGGGCC GCATCCAGCC  
 GCTTTCAGAG CCGGTAGTAG GTATAGTTCC TTTCCGACTA CCTGTTCCCG CCCGTAGCAG GAAAGTGTCC GCGCAAGTTA CGGTTCCCGG CGTAGGTCGG  
  
 2410 2420 2430 2440 2450 2460 2470 2480 2490 2500  
 GGAACCGCTT TTGAAAGCCT TTGCCGACGG CGCGGTGGAT AATGAAATCT GTCTTGAAC TTCGTTCAAG GAGCGCGAGC CGAACGACCG TGAAGTCATT  
 CTTTGGCGAA AACTTTTCGA AACGGCTGCC GCGCCACCTA TTACTTTAGA CAGAACTGA AAGCAAGTTC CTCGCGCTCG GCTTCTGGC ACTTCAGTAA  
  
 2510 2520 2530 2540 2550 2560 2570 2580 2590 2600  
 CCACAGATTG CAGAAAGTGT GGCTTTCTGG GCGCCGCACA TTGACACCGG CGCTAAGGAC TTGAAGATAT AGGAAATTC CAGAACCGGA CCGCGTTCAA  
 GGTGTCTAAC GTCTTTCACA CCGAAAAGCC CGCGCGGTGT AACTGTGGCC GCGATTCTCG AACTTCTATA TCCTTTAAAG GTCTTGGCTT GCGCAAGTT  
  
 2610 2620 2630 2640 2650 2660 2670 2680 2690 2700  
 TGGCAGATGC AGACGATTCT CTGGCGCTTC GCGCCGCCTG GCTTCATTTC GTCCCGGCA TGACTCAGTC TGCCGTTGCC AAGCGCCTTG GCCTGCCTTC  
 ACCGTCTACG TCTGCTAAGA GACCGCGAAG CCGCGCGGAC CGAAGTAAAG CAGCGGCCGT ACTGAGTCAG ACGGCAACGG TTCGCGGAAC CGGACGGAAG  
  
 2710 2720 2730 2740 2750 2760 2770 2780 2790 2800  
 GGTGAAAGCG CATCGTCTCA TCGCCAAGGC CGTTGCCGAC GGCGCGGTGA AAGTGACCAT CGACGGTGAC ATCACCAGAT GCATCGATCT GGAACCCGT  
 CCACTTTCCG GTAGCAGAGT AGCGGTTCCG GCAACGGCTG CCGGCCACT TTCACTGGTA GCTGCCACTG TAGTGGCTTA CGTAGCTAGA CCTTTTGGA  
  
 2810 2820 2830 2840 2850 2860 2870 2880 2890 2900  
 CTGGCCGATC TTACCGCCT CGATTATTGC GAGGTCCGAC CCGATATTGG CGAGGAAGGC CTGCCGCTGA TGGCGCTTGG CCATGCGGGC GCGAATTCA  
 GACCGGCTAG AAATGCCGGA GCTAATAACG CTCCAGCGTG GGCTATAACC GTCTCTCCG GACGGCGACT ACCCGAACC GGTACGCCCG CGCTTAAAGT  
  
 2910 2920 2930 2940 2950 2960 2970 2980 2990 3000  
 TGCCCGCGA AATCGAACAT GCGGATCATG AGGTCATCGG CATCGGCCAT GGCCGCACAC TTTCCGCGAGC GGTGGTTAT ATGCCGCGTG TCATGGCCAA  
 ACGCGGCGCT TTAGCTTGT CCGCTAGTAC TCCAGTAGCC GTAGCCGGTA CCGCGGTGTG AAAGCCGTCG CCAACCAATA TACGCGCGAC AGTACCGGTT  
  
 3010 3020 3030 3040 3050 3060 3070 3080 3090 3100  
 TGATCTCGGT TTCGTCTCGC TTCTGGGCGG CCTCACGCGC AATTTTGGCG CCAACCCGCA TGACGTGATG CACCGCATCG CGGAAAAAC CGGAATGCC  
 ACTAGACGCA AAGCAGAGCG AAGACCCGCC GGAGTGCGCG TTAACACGGC GGTGGGCGT ACTGCACTAC GTGGCGTAGC GCCTTTTTTTG GCCTTACGGG  
  
 3110 3120 3130 3140 3150 3160  
 GCTTATGTGA TGCCGGTGCC CTTCTTACGC CAATACGGCG GAAGACCGCG AAGTGTGTCT GG  
 CGAATACACT ACGGCCACGG GAAGATGCG GTTATGCCG CTTCTGGCGG TTCACGACGA CC

Figura 2 b.

Secuencia completa de B19

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
AAGCGAAGCC CGGATCGCGC GCGGGCGCAC CAATATGAAG AACTTTTCGT TGCCTATCGG GAAGCGCGGC TGGCTCTTGC GCCAGTCTGG GACAACTCG
TTGGCTTCGG GCGTACGCGG CGCCCGCGTG GTTATACTTC TTGAAAAGCA ACGGATAGCC CTTGCGCCCG ACCGAGAACC CGGTGAGACC CTGTTTGAGC

110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
CTTCCGCAAA ATAAGGAAAC ATTGAAATGG CTGAACCGGA AACCTGCGAC CTGTTTGTAA TGGCGCGCG CATCAACGGT GCGGGCGTGG CCCCGGACCC
GAAGGCCGTT TATTCCCTTG TAACCTTTACC GACTTGGCCT TTGAGCGCTG GACAAACATT AACCGCGCCG GTAGTTGCCA CGCCCGCACC GGGCGCTGCG

210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
GGCCGGCGCG GGCCTCAAGG TGGTGTGGC AGAAAAGGAC GATCTGGCGC AAGGCACATC ATCGGCTTCC GGCAAGCTGG TGCATGGCGG TTTGGCTAT
CGCGCCCGCG CCGGAGTTCC ACCACGACCG TCTTTTCCCT CTAGACCAGC TTCGGTGTAG TAGCCGAAGG CCGTTCGACC ACGTACCAGC AAACGCGATA

310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
CTCGAATATT ATGAGTTCCG CCTTGTGGC GAAGCGCTGA TCGAGCGCGA AGTGTCTTTG AATGCGGCAC CCCATATCAT CTGGCCGATG CGCTTCGTGC
GAGCTTATAA TACTCAAGG GSAACACGCG CTTGCGACT AGTGTGCGCT TCACGAAAAC TTACGCGGTG GGGTATAGTA GACCCGGTAC GCGAAGCAGC

410     420     430     440     450     460     470     480     490     500
TCCCGCACAG CCCGCAATA CGCCCGGCGT GGCTGGTGGC GCTTGGCGT TTTCTCTATG ACCATCTGGG CCGGCGCAAA AAACCTTCCG GCACGCGTAC
ACGGCGTGTG GGGCGTCTAT GCGGCGCGGA CCGACCAGCG CGAACCGGAC AAAGAGATAC TGGTAGACCC GCCCGCGTTT TTTGAAGGGC CGTGCAGATG

510     520     530     540     550     560     570     580     590     600
GCTCGATCTG AACCGCGACC CGGAAGGCGC GCGGATCCTC GACCACTACA CCAAGGGTTT TGAATATTCC GATTGCTGGG TGGACGATGC GCGCCTCGTG
CGAGCTAGAC TTCGCGCTGG GCCTTCCGTC CCGCTAGGAG CTGGTCAATG GGTTCGCAAA ACTTATAAGG CTAACGACCC ACCTGCTACG CGCGGAGCAC

610     620     630     640     650     660     670     680     690     700
GCGCTCAATC CCGTGGGTGC CCGCGAAAAG GGCTCGACCA TTCTCACCGC TACACCGGTC GTCTCCGCAC GCGCGAAAAG TGGCGGCTGG ATCGTGGGAA
CGCGAGTTAC GCCACCCACG GGGCGCTTTT CCGAGCTGGT AAGAGTGGGC ATGTGGCCAG CAGAGGCGTG CCGCGCTTTT ACCCGCGACC TAGCACCTTT

710     720     730     740     750     760     770     780     790     800
CCAGAAACAG CGATACCGGC GAAACCGGCA CCTTCCGCGC CCGCTGCATC GTCAAATTGG CCGGACCATG GGTACGAGAC GTCATCCACA ATGTCCGCTG
GGTCTTTGTC GCTATGGCCG CTTTGGGCGT GGAAGGCGCG GCGGACGTAG CAGTTAACCG GGCTGTGTAC CCAGTGCCTG CAGTAGGTGT TACAGCGAGC

810     820     830     840     850     860     870     880     890     900
CTCCACCTCG TCGCGCAATC TGGCGCTCGT CAAGGGCAGC CACATCATCG TTCCGAAATC CTGGTCCGGC GCAAACGCGT ATCTCGTTCA GAACCACGAC
GAGGTGGAGC AGCGCGTTAC ACGCGGAGCA GTTCCCGTGG GTGTAGTAGC AAGGCTTTAA GACCAGCCCG CTTTGCAGGA TAGAGCAAGT CTTGGTGGTG

910     920     930     940     950     960     970     980     990     1000
AAGCGGTAAT TCTTCACTAA TCCATATGAA GGTGACAAGG CGCTGATCGG CACCACCGAC ATTGCCTATG AAGCGCGGGC GGAAGACGTT GCGCGCGGATG
TTGCGGCACT AGAAGTAGTT AGGTATACTT CCACTGTTCG GCGACTAGCC GTGGTGGCTG TAACGGATAC TTCCGGCCCG CCTTCTGCAA CGCCGCTAC

1010    1020    1030    1040    1050    1060    1070    1080    1090    1100
AGAAGGAAAT CGACTATCTC ATCACCGCGG TAAACCGCTA TTTCRAAGAA AAGTCCCGCG GCGAAGACGT GCTGCACCTC TTCTCCGCGC TGCGCCCGCT
TCTTCTTTA SGTATAGAG TAGTGGCGCC ATTTGGCGAT AAGTTCCTT TTGAGGCGCG CGTCTTGCA CGACGTGAGG AAGAGGCGCG ACGCGGCGGA

1110    1120    1130    1140    1150    1160    1170    1180    1190    1200
GTTTGCAGC GCGAAGGGCA ATCTTCCCGC CGTACCCGCG GATTAGCTTG TCGATCTGGA CGAAACCGGC GGTGCACCCG TGCTCAACGT CTTTGGCGCG
CAAACCTGCT CGTTCGCGT TAGGAAGGGC GCATGGGCGC CTAATGCACA AGCTAGACTT GCTTTGGCGC CCACGTGGCG ACCGAGTTGA GAAACCGCGC

1210    1220    1230    1240    1250    1260    1270    1280    1290    1300
AAGATCACCA CTTTCCGCGA ACTGGCGGAG CCGGGGATGC ATCGGCTCAA GCACATTTTC CCGCAAATGG GCGCGCAGCT GACCCACAGC GCGCGCGTGC
TTCTAGTGGT GGAAGGCGCT TGACCCGCTC GCGCCCTACG TAGCCGAGTT CGTGTAAAAG GCGGTTTACC CGCCGCTGAC CTGGGTGTGT CCGCGGAGC

1310    1320    1330    1340    1350    1360    1370    1380    1390    1400
CGCGCGGCGA GATTGCCAAT GCCGATTATG AAACCTTCCG CAATACCTTA CCGGACACCT ATCCATGGAT GCGCGCGACA CTCGTTTATC ATTATGGAGC
GGCGCCGCT CTAACGGTTA CCGCTAATAC TTTGGAAGCG GTTATGAAAT GCGGTGTGGA TAGGTACCTA CCGCGCGTGT GAGCAAGTAG TAATACCTGC

1410    1420    1430    1440    1450    1460    1470    1480    1490    1500
GCTCTATGGT CCGCGCAAA AGGATGTGGT GGCTGGCGCG CAGAACCTCG AAGGGCTTGG CCGTCACTTC GCGCGCGATT TCCATGAGGC GGAAGTGGCC
CGAGATACCA CCGCGCTGTT TCCTACACCA CCGACCCGCG GTCCTGGAGC TTCCGGAACC GGCAGTGAAG CCGCGGCTAA AGGTACTCCG CCTTACCGCG

1510    1520    1530    1540    1550    1560    1570    1580    1590    1600
TATCTGGTGG CCAGAGAATG GGCAAAGAGC GCAGAAGACA TTCTCTAICG CCGCACCAAG CATTACCTGC AITTGACCGA AGCCGAACGC GCGCCTTTCG
ATAGACCACC GGTCTCTTAC CCGTTTCTGC CGTCTTCTGT AAGAGATAGC GCGGTGGTTC GTAATGGAGC TAAACTGGCT TCGGCTTGGC CCGCGAAGC

1610    1620    1630    1640    1650    1660    1670    1680    1690    1700
TGGAAATGGT CGACAACGCC AATCTAGTTG CTTGAGGACG ATATGGCCCT GCAGCTTTTC CTCAACACCA ATCCGCTGGT CAACCGCTTT GCCGAGCCCG
ACCTTACCAA GCTGTTCGCG TTAGATCAAC GAATCCTGCG TATACCGGGA CGTGAAGAGC GAGTTGTGGT TAGGCGACCA GTTGGCGAAA CCGCTCGGCC

1710    1720    1730    1740    1750    1760    1770    1780    1790    1800
ACGACCTGAT CCAAACGGTT GCCCGGCTT GCGCGCTGGC TGACCTCCAG CTTACCCATG AGTTTATCAA TCCAAGCTGG CAGGCTCGA CCAATCCGCG
TCTGGACTA GCTTTGCCAA CCGGCGGTGG ACGCGGACCG ACTGGAGGTC GAATGGGTAC TCAAATAGTT AGGTTGACCC GTCCGGAGCT GGTAGGCGCG

1810    1820    1830    1840    1850    1860    1870    1880    1890    1900
CCTCACCCGC GACATGGACA GGGCCTTGA CCGCACCGGT GTCGCGTCA CCTCCGCAAT GACCGGCGCC TATGGCCGCG TCAACCATTT TGGCCATCCC
GGAGTGGCGC CTGACTCTGT CCCGGAACGT CCGGTGGCCA CAGGCGAGT GGAGCCGTA CTGGCCGGGG ATACCGGCGG AGTTGGTAAA ACCCGTAGG

1910    1920    1930    1940    1950    1960    1970    1980    1990    2000
GACCGGAGC TCGCGCGCTA TATGTGGAC TGGTTCAAGA CCTTGGCGA TATTATCGCG GATCTTGGCG GCAAGTCCGT CCGTACGAGC TTTGCAATCT
CTGGCCCTGC ACGCGCGGAT AATACACCTG ACCAAGTCTT GGAACCGGCT ATAATAGCGC CTAGAACCGC CGTTCAGGCA GCCATGCGTC AAACGTTAGA

2010    2020    2030    2040    2050    2060    2070    2080    2090    2100
TCACCTATAA GGATTTGAT GATCCGCGC GCGCGAAGA ACITATCAAG ATCCGCAATC ACTGCTGGGC CGAGGTGGCC GAACATGCGG CAGGTGGGCG
AGTGGATATT CCTAAGGTA CTAGGCGCGC CCGCGCTTCT TGAATAGTTC TAGCGGTAGC TGACGACCCG GCTCCACCGC CTTGTACGCC GTCCACCCCC

2110    2120    2130    2140    2150    2160    2170    2180    2190    2200
CCTCGACTAT GTGTTCTGGG AGCCGATGAG CATCGGGCGC GAAATTTGGC AGGAAGGCTT GCCGCTGATG GCGCTTGGC CATCGGGCGC CGAATTTGAT
GGAGCTGATA CACAAGACC TCGGCTACTC GTAGCCCGCG CTTAAACCGC TCCTTCCGGA CCGCGACTAC CCGGAACCGC GTACGCGCGC GCTTAAAGTAC

```

# ES 2 078 174 A1

2210 2220 2230 2240 2250 2260 2270 2280 2290 2300  
CGCCGCGAAA TCGAACATGG CGATCATGAG GTCATCGGCA TCGGCCATGG CCGCACACTT TCGGCAGCGG TTGGTTATA TGCCGCGTGT CATGGCCAATG  
GCGGCGCTTT AGCTTGTACC GCTAGTACTC CAGTAGCCGT AGCCGCTACC GGC GTGTGAA AGCCGTCGCC AACCAATAT ACGGCGCACA GTACCGGTTAC

2310 2320 2330 2340 2350 2360 2370 2380 2390 2400  
ATCTGCGTTT CGTCTCGCTT CTGGGCGGCC TCACGCGCAA TTTTGCCGCC AACCCGCATG ACGTGATGCA CCGCATCGCG GAAAAAACC GAAATGCCCGC  
TAGACGCAA GCAGAGCGAA GACCCGCGG AGTGCCTGTT AAAACGGCGG TTGGGCGTAC TGCACTACGT GCGGTAGCGC CTTTTTTGGC CTTACGGGCG

2410 2420 2430 2440 2450 2460  
TTATGTGATG CCGGTGCCCT TCTTACGCCA ATACGGCGGA AGACCGCGAA GTGCTGCTGG  
AATACACTAC GGCCACGGGA AGAATGCGGT TATGCCGCTT TCTGGCGCTT CACGACGACC



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.<sup>6</sup>: C12Q1/68, C12P19/34

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	US-4358535-A (FALKOW et al.) 09.11.82 *Todo el documento*	1-14
A	US-4683202-A (MULLIS) 28.07.87 *Todo el documento*	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 n.º:

**Fecha de realización del informe**  
23.10.95

**Examinador**  
J.L. Vizán Arroyo

**Página**  
1/1



CORRECCION DE ERRATAS DE FOLLETO DE PATENTE (IET)

- ① N.º de publicación : ES 2 078 174 A1
- ② Número de solicitud: 9302728
- ④ Fecha publicación de la solicitud: 01.12.95
- ⑤ Int. Cl.<sup>6</sup>: C12Q1/68, C12P19/34

Pág./Línea	Errata/Omisión	Corrección
1	Fecha de presentación de la solicitud: 16.02.93	Fecha de presentación de la solicitud: 16.12.93