



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 205 967**

② Número de solicitud: 200100946

⑤ Int. Cl.7: **C12Q 1/68**

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

② Fecha de presentación: **19.04.2001**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **01.05.2004**

Fecha de la concesión: **15.06.2005**

④ Fecha de anuncio de la concesión: **16.07.2005**

④ Fecha de publicación del folleto de la patente:
16.07.2005

⑦ Titular/es: **Universidad de León
Avda. de la Facultad, 25
24071 León, ES
Universidad de Cantabria**

⑦ Inventor/es: **Rodríguez Ferri, Elías Fernando;
Navas Méndez, Jesús y
Fuente Redondo, Víctor A. de la**

⑦ Agente: **No consta**

⑤ Título: **Procedimiento para la detección, identificación y tipado de *Haemophilus parasuis* (Sistema DITPAR).**

⑤ Resumen:

Procedimiento para la detección, identificación y tipado de *Haemophilus parasuis* (Sistema DITPAR).

Se refiere un procedimiento de análisis molecular, por PCR-RFLP, que permite la detección, identificación y tipificación de *Haemophilus parasuis*, un microorganismo de interés en patología porcina, a partir de muestras clínicas y/o de aislamientos obtenidos en el laboratorio. El método se fundamenta en las peculiaridades de los genes *tbp* en esta bacteria cuando se compara con otras próximas, como *Actinobacillus suis* y *Actinobacillus pleuropneumoniae*. El procedimiento discrimina *H. parasuis* de *A. pleuropneumoniae*; de igual modo también diferencia otros miembros, no patógenos, de la familia *Pasteurellaceae*, presentes en el aparato respiratorio del cerdo, como *A. minor*, *A. porcinus* y *A. indolicus*. El producto de la amplificación por PCR, sometido a restricción con distintas nucleasas (AvaI, TaqI y RsaI) permite clasificar los serotipos de *H. parasuis* en un total de 28 tipos genéticos diferentes, lo que representa una alternativa de mucho interés al sistema tradicional de tipificación serológica.

ES 2 205 967 B1

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

ES 2 205 967 B1

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la detección, identificación y tipado de *Haemophilus parasuis* (Sistema DITPAR).

5 Sector de la técnica

Diagnóstico de Procesos Respiratorios Bacterianos en el Cerdo. Métodos de Diagnóstico Molecular.

Estado de la técnica

10 En el sector ganadero, la producción porcina intensiva que, a nivel mundial, se concentra en países como EE.UU., Canadá, Holanda, Alemania, Rusia y algunos países de Europa del Este, posee una gran importancia económica que alcanza anualmente billones de dólares. España es a la vez que un reputado país consumidor, un exportador tradicional. En cualquier caso, el grado de tecnificación de la porcicultura solo admite comparación con la avicultura.

15 En las modernas granjas “saneadas” se han producido cambios estructurales (aumento del tamaño, compartimentación de las naves, producción en múltiples sitios) y funcionales (destete precoz, sistemas de producción “todo dentro-todo fuera”, etc.) que a la vez que mejoras zootécnicas (índices de reproducción y crecimiento) han sido la causa de progresos 5 sanitarios evidentes, en particular, la práctica desaparición de las diarreas por *Escherichia coli*, salmonelosis (*Salmonella choleraesuis*) o disentería (*Serpulina hyodysenteriae*). Sin embargo, estas mejoras, han coincidido con una auténtica explosión de problemas de naturaleza septicémica post-destete, en cuyo origen se encuentran *A. suis*, *H. parasuis* y *E. coli*, a la vez que con un aumento en el número de casos de epidermitis exudativa y septicemias por *A. suis* durante la fase de maternidad. En los cebaderos se han incrementado los problemas por *Lawsonia intracelularis*, por *Serpulina pilicosa*, por *A. suis* y *H. parasuis*, con una transformación de los cuadros clínicos originados por los 20 mycoplasmas que pasan de procesos crónicos a manifestaciones agudas e intensas. También se observan problemas de naturaleza vírica, como es el caso del PRSS (síndrome respiratorio y reproductivo porcino) y otros.

25 *H. parasuis* se presenta solo en el cerdo. Morfológicamente se presentan como bacilos pleomórficos, de tamaño variable, que tienen en el tracto respiratorio superior del cerdo, su lugar de residencia habitual, aunque puede permanecer algún tiempo en el ambiente exterior, en el que sobrevive escasamente. Su población es extremadamente heterogénea, según se desprende de los estudios llevados a cabo con procedimientos fenotípicos (reacciones bioquímicas), inmunológicos (serotipado) o moleculares (tipado por restricción del DNA -ácido desoxirribonucleico- y SDS-PAGE electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico).

30 La introducción de *H. parasuis* en explotaciones sin experiencia inmunológica por ausencia de contacto anterior con el agente, puede ser la causa de brotes de gravedad extraordinaria, auténticamente devastadores, en animales de cualquier edad. Otras veces se asocia a los cambios de manejo u otras causas de estrés en los lechones. Los signos clínicos incluyen muerte súbita, signos neurológicos, anorexia, inflamación articular, claudicaciones y cojeras con resistencia al desplazamiento, reclinación lateral, dificultad respiratoria, fiebre, descarga nasal, abortos, inflamación 40 auricular, tos corta (por lo general, 2-3 episodios) y cianosis. Macroscópicamente, las lesiones incluyen artritis, pleuritis, pericarditis, peritonitis, meningitis, poliserositis, rinitis y periorquitis. En brotes agudos, se han descrito estados septicémicos, sin poliserositis fibrinosa.

45 *H. parasuis* se aísla, con regularidad, de lesiones neumónicas, aunque no se conoce bien su patogénesis en ellas. En condiciones experimentales, con cerdos SPF (specific pathogen free) obtenidos por cesárea y privados de calostro, no es fácil reproducir los cuadros respiratorios.

Desde el punto de vista antigénico, mediante el uso del sistema de Kielstein y Rapp-Gabrielson (KRG) se admiten hasta la fecha, un total de 15 serotipos en *H. parasuis*. El procedimiento se basa en la presencia de antígenos termoestables entre los que, al menos en teoría, se incluyen proteínas de membrana externa, cápsula y LPS (lipopolisacárido). A nivel mundial, se describe el predominio generalizado de algunos tipos; en los EE.UU., por ejemplo, el 4% de los aislamientos pertenecen a los serotipos 4 y/o 5, mientras que los serotipos 2, 12, 13 y/o 14, se reparten otro 35% y el resto incluye un 15% de cepas no tipables y, aproximadamente, un 10% en el que puede aparecer cualquiera de los serotipos restantes. Los resultados de otros países, como es el caso de Alemania, no varían sustancialmente, y en Japón, se mantiene el predominio del serotipo 5, con abundancia (68'3%) de cepas no tipables, mientras que en Australia la 55 incidencia más alta corresponde a los serotipos 4, 5 y 13.

60 No existe una idea clara que relacione serotipo con virulencia pues, aunque en los primeros estudios se señaló que los serotipos 1 y 5 eran los más virulentos mientras que los serotipos 2, 3, 4, 6 y 7 eran avirulentos, otras veces se incluyen entre los primeros, también, a los serotipos 10, 12, 13 y 14, mientras que los serotipos 2, 4, 8 y 15 serían capaces de producir poliserositis, pero no la muerte, y los serotipos 3, 6, 7, 9 y 11, se mantendrían como avirulentos. Aunque no resulta fácil interpretar estas variaciones en los datos señalados, la mayoría se inclina por responsabilizar de los mismos a variaciones de distinto alcance que afectarían al ambiente o, por el contrario, a la propia cepa microbiana, el hospedador o la presencia de otros agentes (bacterias o virus).

65 Hasta la fecha no se ha descrito ningún factor de virulencia de carácter tóxico. Se ha señalado una transferrina con especificidad de especie y una neuraminidasa que se expresa *in vitro*, en cultivo, al final de una larga fase logarítmica y que parece pudiera estar relacionada con la exposición de puntos de adherencia o como ligando, para la provisión

de nutrientes. También se especula con el interés del LPS como factor de virulencia, cuya presencia en sangre parece que se relacionaría con la aparición de trombos (trombosis) y estados de coagulación intravascular diseminada.

Hasta ahora no se dispone de métodos que separen las cepas patógenas de *H. parasuis* pues, como se ha señalado, las relaciones descritas entre serotipos y patogenicidad no son homogéneas y, además, no se puede asegurar la base del tipado y el número de cepas no tipables es muy elevado en todos los estudios.

Tampoco se dispone de métodos comerciales para la detección y diagnóstico de la enfermedad. Con carácter interno, algunos laboratorios japoneses y daneses, utilizan una prueba de fijación del complemento que presenta el inconveniente del poder pro y anticomplementario natural del suero porcino, además de la existencia de numerosas reacciones cruzadas entre serotipos. Por otra parte, como en la mayoría de las granjas están presentes de forma habitual muchos serotipos de *H. parasuis* sin relación con enfermedad clínica, desde el punto de vista epidemiológico, la utilidad de un sistema de diagnóstico basado en la respuesta inmune (serológico) es muy discutible.

No se dispone de vacunas específicas. A título individual, en una granja concreta, el uso del antígeno de la cepa que predomina y a la que se relaciona con la patología podría ser utilizado con fines vacunales. Cuando se introducen animales nuevos en granjas infectadas con cepas virulentas de *H. parasuis*, los animales deberían ser vacunados antes de la introducción e incluso recibir tratamiento antibiótico previo a la llegada, justo antes de la recepción, bien por vía parenteral o por vía oral. El problema podría aliviarse, también, con el aislamiento de los animales a la llegada y la introducción gradual en las naves,

Actinobacillus minor, *A. porcinus* y *A. indolicus* antes conocidos, respectivamente, como grupo minor, taxones D y E y, taxón F, comparten localización pulmonar con *H. parasuis*, *A. pleuropneumoniae* y *A. suis* pero, al contrario que ellas, no son patógenas y forman parte de la flora respiratoria normal. Su presencia, sin embargo, puede adquirir gran importancia práctica pues interfieren con facilidad en la detección e identificación debido a su carácter de dependencia del factor V, que comparten con los dos primeros. Los criterios microbiológicos que se utilizan habitualmente en la detección e identificación de estos microorganismos, resultan insuficientes para resolver la asignación de una cepa aislada a *H. parasuis* o a las cepas apatógenas, puesto que las características bioquímicas son idénticas. En rigor, solo se han clasificado mediante el análisis del gen del ARN ribosomal 16S. Puede afirmarse que, en general y en todos los ámbitos, las técnicas de diagnóstico molecular están sustituyendo progresivamente a los métodos convencionales, tanto por su rapidez, como su sensibilidad, fiabilidad y reproductibilidad.

Debe quedar claro, por tanto, el interés de disponer de herramientas o reactivos para el diagnóstico y prevención, tanto en el caso de *H. parasuis* como de *A. suis*.

En lo que se refiere a la detección, identificación y tipificación de *H. parasuis* mediante procedimientos moleculares, hasta la fecha se carece de métodos disponibles, ni a nivel de laboratorios especializados ni, por supuesto, comercializados por empresa alguna, en nuestro conocimiento. Hasta la fecha, la detección se realiza mediante el cultivo de las muestras de material clínico del animal enfermo o, más frecuentemente, el cadáver, utilizando procedimientos convencionales de bacteriología. La identificación se lleva a cabo mediante pruebas bioquímicas y, el tipado (tipificación) mediante un sistema de clasificación serológico que adolece de problemas de diferenciación e interpretación en su significado real, al menos, desde el punto de vista clínico.

Explicación de la invención

Se describe un procedimiento para la detección, identificación y tipificación de *H. parasuis*, el agente de la enfermedad de Glässer del ganado porcino. Brevemente, el procedimiento se basa en la amplificación, por una técnica de PCR, de una región del genoma de la bacteria con homología a los genes *tbpA*, que codifican para una proteína receptora de transferrina sérica porcina. Cuando el procedimiento se aplica directamente a la bacteria de referencia (*H. parasuis*) se obtienen, mediante electroforesis en gel de agarosa, un producto de amplificación de 1'9 Kb, distinto al de 2'8 Kb, que se obtiene cuando se procede a la amplificación del mismo gen a partir de otras bacterias de la misma familia *Pasteurellaceae* que se aíslan en los mismos medios que *H. parasuis* y que no se diferencian por otros procedimientos, además de que otras especies de este grupo no amplifican. El método puede aplicarse, indistintamente, a un cultivo puro de las bacterias, a cultivos mixtos o muestras clínicas, incluyendo tanto líquidos o secreciones biológicas (exudados nasales) como a tejidos sólidos (muestras de tejido pulmonar).

La especificidad del procedimiento se basa, por tanto, en el diferente resultado de la amplificación por PCR después del uso de la pareja de primers (cebadores) DITPAR-*tbpA*-55 y DITPAR-*tbpA*-33 sobre *H. parasuis* y otras especies de la familia *Pasteurellaceae*, habitualmente colonizadores del tracto respiratorio superior del cerdo, relacionadas o no con procesos patológicos. Las variaciones en la secuencia de los genes *tbpA* permiten el diseño de primers adecuados para el fin que se propone y en las condiciones de amplificación

Como se ha señalado, mientras que en *H. parasuis* se obtiene un producto de 1'9 Kb, en *A. pleuropneumoniae* y *A. suis* se obtiene un producto de 2'8 Kb y en el caso de *A. minor*, *A. porcinus* y *A. indolicus*, no se obtiene amplificación.

Modo de realización de la invención

Existen diversos protocolos que permiten obtener los resultados deseados. El aspecto crítico es la utilización de los

ES 2 205 967 B1

primers descritos mediante los protocolos de PCR que proporcionan la amplificación adecuada. A modo de ejemplo se describe a continuación un protocolo general que conduce a resultados satisfactorios.

Muestras

El sustrato de la reacción está representado por cultivos, lisados de cultivos y/o extractos de tejidos. En todo caso, estos materiales representan la fuente de DNA bacteriano.

Preparación de la muestra

Incluye todo protocolo de procesamiento de muestras para el diagnóstico por PCR de enfermedades bacterianas. En el caso particular de los cultivos puros, para su obtención, se utiliza la metodología convencional para el cultivo, en el laboratorio, de los aislamientos, tanto de *H. parasuis*, como de los otros microorganismos con los que, el método propuesto, consigue la diferenciación. Pueden utilizarse los siguientes medios de cultivo comercializados o cualquier modificación de los mismos que mejore los rendimientos, en términos de cultivo.

Agar TSA (ágar de soja tripticaseína). Puede utilizarse la fórmula que comercializa la firma "Biolife", aunque sirve cualquiera. Incluye por litro, 15 g de peptona de caseína, 5 de peptona de soja, 5 de cloruro sódico y 15 de ágar Bios LL. El pH final es de 7.3. La preparación se ejecuta siguiendo las indicaciones del fabricante.

Agar PPLO (ágar "pleuro pneumoniae like organisms"). Puede utilizarse la fórmula que comercializa la firma "Difco", aunque sirve cualquiera. Incluye, por litro, 5 g de extracto de corazón de ternera, 10 g de tripton, 5 g de cloruro sódico y 15 g de ágar. El pH final de ser de 7.6. Se prepara siguiendo las instrucciones del fabricante.

Agar Infusión de Cerebro y Corazón (BHIA). Puede utilizarse cualquier fórmula de las disponibles en el mercado. Por regla general, por litro, incluye 20 g de infusión de cerebro de ternera, 25 g de infusión de corazón de bovino, 10 g de mezcla de peptonas, 5 g de cloruro sódico, 2.5 g de fosfato dipotásico, 2 g de dextrosa y 15 g de ágar. El pH final debe ser de 7.4 y en la preparación, se sigue las instrucciones del fabricante.

Agar Chocolate. Se utiliza una base de las varias disponibles en el mercado, en cuya preparación se siguen las instrucciones del fabricante. Por ejemplo, puede utilizarse como base el Agar GC, de la firma "Difco". Después de la esterilización en el autoclave, se mantiene en baño maría a 50°C, hasta que alcanza esa temperatura. Después se añade un 5% de sangre desfibrinada, estéril, de caballo (obtenida directamente o a partir de un proveedor, por ejemplo, la firma Oxoid), subiendo la temperatura del baño hasta 80°C y manteniéndola estable durante 5 minutos, hasta provocar la lisis de los eritrocitos. Después de un nuevo enfriamiento a 45-50°C, se añaden los suplementos nutritivos (factores de crecimiento) para las especies V-dependientes de los géneros *Haemophilus* y *Actinobacillus* (*H. parasuis* y las *Actinobacillus* spp citadas), en particular, 0.025% de NAD (nicotinamida adenina dinucleótido). Con carácter general se añade, también, 0.1% de glucosa.

Agar Sangre. Se utiliza una base común para ágar sangre, por ejemplo, la proporcionada por "Difco", a la que una vez preparada siguiendo las instrucciones del fabricante, se le añade un 5% de sangre desfibrinada estéril de carnero (obtenida directamente, o a partir de un proveedor, por ejemplo Oxoid).

En el caso de muestras clínicas, tienen tal consideración las muestras de fluidos obtenidos a partir de secreciones nasales (fosas nasales) o los obtenidos del parénquima pulmonar, o de cualquier otro tejido, mediante la impregnación de hisopos estériles. Con los hisopos se obtiene una suspensión en un buffer fosfato (PBS) estéril, que se procesa inmediatamente. Las muestras de tejidos sólidos se obtienen de los pulmones de los animales; con ese propósito, una vez extraídos los órganos de la cavidad torácica, y elegida la zona de muestreo por la presencia de lesiones sospechosas, se cauteriza directamente con una espátula calentada al rojo en la llama de un mechero y se procede a realizar uno o dos cortes en el tejido con ayuda de un instrumento cortante y estéril (cuchillo, bisturí, etc.) Penetrando en la hendidura con el hisopo estéril, se obtienen muestras líquidas, a las que nos hemos referido antes. Además, se practican cortes para obtener pequeños fragmentos en forma de cubo, de aproximadamente 2 x 2 x 2 mm de largo, ancho y alto, que son trasladados a bolsas, placas o morteros estériles, donde son completamente machacados, hasta formar una pasta, que después se homogeneiza con PBS. Después de una centrifugación suave (2.000 rpm durante 5 minutos), la muestra está lista para su utilización en el paso siguiente.

Obtención del DNA genómico

Se incluye aquí, con validez, cualquier protocolo de utilidad en la extracción de DNA genómico. Con carácter particular, a partir de cultivos bacterianos puros se obtuvo DNA de alta calidad y limpieza mediante un protocolo de lisis con proteinasa K y lisozima, con limpieza posterior mediante un procedimiento de extracción fenol-cloroformo. Brevemente, se resuspende el crecimiento bacteriano obtenido en los medios de cultivo, señalados antes, después de 10 horas de incubación a 37°C (fase logarítmica tardía), en tampón TE (10mM TrisCl y 1 mM EDTA, de pH 8.0). La suspensión se incuba 3 h a 37°C en una mezcla de SDS (dodecil sulfato sódico) al 0.5% y 100 µg/ml de proteinasa K, con una pequeña cantidad, no definida, de lisozima en polvo. Al término de ese periodo, se lleva a cabo una segunda incubación a 65°C durante 10 minutos, después de haber añadido 100 µl de 5M NaCl y 80 µl de CTAB (bromuro de hexadecil-trimetil amonio)/NaCl (10% de CTAB en 0.7 M NaCl). A partir de aquí, el DNA se purifica mediante extracciones sucesivas en fenol-cloroformo-isoamílico, hasta que la interfase esta desprovista de residuos, punto en

ES 2 205 967 B1

el que se aplica una última extracción, ahora con cloroformo- isoamílico, para asegurar la eliminación completa del fenol. La fase acuosa resultante se precipita manteniéndola a -80°C durante 30 minutos, con dos volúmenes de etanol absoluto, en frío. El DNA se sedimenta centrifugando a 15.000 rpm durante 30 minutos y, después de un lavado en etanol al 70%, se resuspende en agua destilada estéril. Puede utilizarse, también, una variante de este método, más simplificada, en base al uso de un tampón de lisis en el que se resuspenden varias colonias, precalentando a 56°C 1 h, al término de la cual se calienta hasta ebullición (100°C) en baño de agua durante 15 minutos. En cualquier caso, el producto final se conserva a -20°C .

En el caso de muestras clínicas (sólidas y líquidas), se utiliza la resina comercial Gene Clean (Biorad Lab.) en la que se resuspende el sobrenadante procedente de su procesado (ver antes).

Primers (cebadores)

Se diseñaron en base al análisis de las secuencias del gen *tbpA* de *H. parasuis*, serotipos 2, 3 y 5 (resultados propios; datos sin publicar). La secuencia de los cebadores es, en el caso del DITPAR-*tbpA*-55: “5'-TTA GCC TTC CTC TTC TTA GCC-3'”, mientras que en el caso del DITPAR-*tbpA*-33, la secuencia es: “5'-AAG CTT GAA ACT AAG GTA CTC TAA-3'”.

Condiciones de amplificación

Las de cualquier protocolo de amplificación por PCR, entre las que se cuentan la presencia de polimerasa termoestable, dNTPs (desoxirribonucleosido trifosfato) y condiciones de fuerza iónica [ClMg^{+2}] y pH adecuados para la acción de la enzima. A modo de ejemplo, por cada $5\ \mu\text{l}$ de DNA genómico se utilizan 4 U de Taq polimerasa de DNA, $2.5\ \text{mM}$ MgCl_2 , $10\ \mu\text{l}$ de buffer de amplificación a concentración $10\times$ ($160\ \text{mM}$ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $670\ \text{mM}$ Tris-HCl de pH 8.8 a 25°C , y 0.1% de Tween-20). Se utilizan, además, 50 picomoles (πM) de cada primer, $0.2\ \text{mM}$ de cada dNTP y agua bidestilada, hasta un volumen final de $100\ \mu\text{l}$.

Las condiciones óptimas de ejecución incluyen:

1. Desnaturalización previa a 94°C durante 5 min
2. Desnaturalización en cada ciclo a 94°C durante 1 min
3. Alineamiento (hibridación) a 50°C durante 1 minuto
4. Elongación (extensión) en cada ciclo a 72°C durante 3 min
5. Elongación final a 72°C durante 10 min
6. Mantenimiento a 4°C hasta el análisis
7. Número de ciclos: 35

El protocolo de PCR, cuando se lleva a cabo la detección directa a partir de las muestras clínicas, se modifica ligeramente: Se utilizan 5 U de Taq polimerasa de DNA, $1.85\ \text{mM}$ de MgCl_2 y una temperatura de desnaturalización previa de 95°C durante 6 minutos. El resto de los pasos es similar al descrito.

Detección

La detección del producto y el cálculo de su tamaño molecular, se lleva a cabo mediante un procedimiento de electroforesis en gel con 1% de agarosa en tampón Tris-borato-EDTA con $0.5\ \mu\text{g}$ de bromuro de etidio por ml. En cualquier caso, es necesario incluir un patrón de peso molecular, como referencia, para el cálculo del tamaño.

Sensibilidad

En el caso de cultivos bacterianos, en los que el manipulado y procesado de la muestra influye de modo importante, la sensibilidad del método oscila entre 5 y 50 UFC (unidades formadoras de colonias). Para su determinación se utilizan diluciones decimales de cultivos de *H. parasuis* (serotipo 2), desde 1.11×10^8 hasta 1.11×10^3 UFC/ml diluidas en DMEM (GibcoBRL, referencia 21969-027), procesando $100\ \mu\text{l}$ de cada dilución y utilizando $5\ \mu\text{l}$ de cada muestra como plantillas para la amplificación por PCR. Las células viables (UFC) se contaron, por triplicado, sobre agar TSA con 0.025% de NAD, llevando a cabo los recuentos después de 24 horas de incubación a 37°C . Todas las determinaciones de sensibilidad se han llevado a cabo por duplicado.

La determinación de la sensibilidad llevada a cabo a partir de diluciones de una suspensión inicial de DNA genómico de alta calidad y concentración conocida ha permitido establecer, en el caso de los serotipos 1, 2 y 5 de *H. parasuis* los límites mínimos detectables en valores de 4.800, 675 y 636 pg, respectivamente. En el caso de *A. suis*, el mínimo valor de DNA detectable, mediante este procedimiento, es de 812 pg.

ES 2 205 967 B1

Análisis por restricción (RFLP) de los productos PCR

El uso de tres enzimas de restricción, que se señalan, permite la diferenciación de tipos genéticos en *H. parasuis*.

Enzima	Sitio de corte (restricción)	Temperatura de actuación (°C)
AvaI	C↓PiCGPuG	37
TaqI	T↓CGA	65
RsaI	GT↓AC	37

↓ sitio de corte; Pi: cualquier base pirimidinica; Pu: cualquier base púrica

El volumen de utilización del producto PCR se condiciona al rendimiento de la reacción, alto o bajo (3 μ l en el caso del rendimiento alto y 5 μ l en el caso de rendimiento bajo), mientras que las digestiones se llevan a cabo siempre con 1 μ l de la enzima en 20 μ l de volumen total. Las condiciones específicas de uso de cada enzima (temperatura, concentración de solutos, etc.) son fijadas por el proveedor (por lo general New England Biolabs).

Los genes *tbpA* de los 15 serotipos se distribuyeron en 12 grupos en función de los perfiles de restricción. Solo se repite, en más de una cepa de referencia (serotipos 5, 12, 14 y 15), el perfil combinado EDBE. La mayor diversidad individual se obtiene con la enzima *RsaI* (9 tipos) y la menor con *AvaI* (3 tipos). Los resultados más fáciles de interpretar se obtienen con las enzimas *AvaI* y *TagI*. En las digestiones con *AvaI* se obtienen entre 1 y 3 fragmentos dependiendo de que en la secuencia existan 0, 1 ó 2 puntos de corte. En la tabla, se recogen los resultados obtenidos con las 15 cepas de referencia de los serotipos de *H. parasuis*.

Serotipo	TaqI	AvaI	RsaI	TagI-RsaI	TagI-AvaI	AvaI-RsaI	TaqI-AvaI-RsaI
1	A	A	A	AA	AA	AA	AAAA
2	B	B	B	BB	BB	BB	BBBB
3	C	C	C	CC	CC	CC	CCCC
4	B	A	D	BD	BA	AD	DBAD
5	D	B	E	DE	DB	BE	EDBE
6	B	A	F	BF	BA	AF	DBAF
7	E	C	G	EG	EC	CG	FECG
8	B	A	H	BH	BA	AH	DBAH
9	B	A	I	BI	BA	AI	DBAI
10	B	A	A	BA	BA	AA	DBAA
11	E	A	F	EF	EF	AF	AEAF
12	D	B	E	DE	DB	BE	EDBE
13	B	B	E	BE	BB	BE	BBBE
14	D	B	E	DE	DB	BE	EDBE
15	D	B	E	DE	DB	BE	EDBE

Ventajas sobre la técnica anterior

Con carácter general y, en primera instancia, las ventajas de la adaptación de un sistema molecular en el diagnóstico de problemas patológicos, cualquiera que sea el caso, son comunes a las de cualquier otra técnica de PCR. Básicamente el menor coste, rapidez y facilidad de ejecución representan los tres pilares clásicos de éste tipo de métodos, que les diferencian sobre otro tipo de alternativas. En el caso presente, la ausencia de otras alternativas moleculares para el mismo fin, convierten la propuesta en especialmente interesante.

Aplicación industrial

Aunque es aplicable a cualquier condición que tenga que ver con el diagnóstico, se desarrollará su posible aplicación en un supuesto. El Servicio de Microbiología de la Unidad de Microbiología e Inmunología (Departamento de Patología Animal. Sanidad Animal) que asiste al Hospital Clínico y Servicios Externos, ha recibido, por distintos conductos, un total de 438 cepas de microorganismos aislados de cerdos, sospechosos de pertenecer a especies de la familia *Pasteurellaceae*. En la tabla siguiente se resumen los resultados de la aplicación del sistema DITPAR-*tbpA* a una colección de cepas clínicas de diversas procedencias que incluye distintas especies.

Especie	DITPAR-A	DITPAR-A (kb.)	Núm. de cepas
<i>Haemophilus parasuis</i>	+	1.8	114
<i>Haemophilus parasuis</i>	+	1.8	2
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	+	2.6	248
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	+	2.6	1
<i>Actinobacillus suis</i>	+	2.6	29
<i>Actinobacillus minor</i>	-	-	10
<i>Actinobacillus porcinos</i>	-	-	8
<i>Actinobacillus indolicus</i>	-	-	2
Otras especies (total 19)	-	-	21

N: número de cepas ensayadas

En la tabla que sigue, se relacionan 31 identificaciones mediante el sistema DITPAR-PCR *tbpA* en el que se comparan los resultados con los obtenidos mediante identificación bioquímica. El resultado se valida con 12 cepas previamente identificadas.

Identificación	Origen geográfico	Hemólisis	Catalasa	NAD	Ureasa	Indol	Especie bioquímica	PCR <i>tbpA</i>
23 cepas	Segovia	-	-	+	-	-	<i>H. parasuis</i>	+
PR 12316	Segovia	-	+	-	-	-	Otros	-
PR 12605/2	Segovia	-	-	+	-	-	<i>A. porcinos</i>	-
PR 12597	Segovia	-	-	+	+	-	<i>A. minor</i>	-
PR 12004	Segovia	-	-	+	+	-	<i>A. minor</i>	-
PR 12313	Segovia	-	-	-	-	-	Otros	-
PR 12450	Segovia	-	-	+	-	-	<i>A. porcinos</i>	-
PR 12506	Segovia	-	-	+	+	-	<i>A. minor</i>	-
PR 12486	Segovia	-	-	+	+	-	<i>A. minor</i>	-
H-425	Barcelona	-	-	+	-	-	<i>A. porcinos</i>	-
H-169	Lérida	-	-	+	+	-	<i>A. minor</i>	-
H-133	Castellón	-	-	+	+	-	<i>A. minor</i>	-
H-103	Barcelona	-	-	+	-	-	<i>A. porcinos</i>	-
H-136	Castellón	-	+	+	-	+	<i>A. indolicus</i>	-
H-137	Teruel	-	-	+	-	-	<i>A. porcinos</i>	-
H-927	Lérida	-	-	+	-	-	<i>A. porcinos</i>	-
AUS 487	Australia	-	-	+	+	-	<i>A. minor</i>	-
AUS 883	Australia	-	-	+	+	-	<i>A. minor</i>	-
AUS 228	Australia	-	-	+	+	-	<i>A. porcinos</i>	-
NM 305	Dinamarca	-	-	+	+	-	<i>A. minor</i>	-
NM 319	Dinamarca	-	-	+	-	-	<i>A. porcinos</i>	-

ES 2 205 967 B1

En la siguiente tabla se resumen los resultados del análisis, mediante PCR-RFLP, de un grupo de cepas de *H. parasuis* procedentes de Canadá y EE.UU.

Identificación	Resultado análisis RFLP del producto PCR	Combinación del resultado de las digestiones						
		<i>TagI</i>	<i>AvaI</i>	<i>RsaI</i>	<i>TagI-RsaI</i>	<i>TagI-AvaI</i>	<i>AvaI-RsaI</i>	<i>T-A-R</i>
CA HP 587	+ E	A	I	EI	EA	AI	EAI	
CA HP 587 B	+ E	A	I	EI	EA	AI	EAI	
CA HP 663	+ D	B	F	DF	DB	BF	DBF	
CA HP 9480-1	+ B	B	F	BF	BB	BF	BBF	
CA HP 646 A	+ C	C	C	CC	CC	CC	CCC	
CA HP 504	+ B	B	E	BE	BB	BE	BBE	
CA HP 3609	+ D	B	E	DE	DB	BE	DBE	
CA HP 9321-213	+ B	B	E	BE	BB	BE	BBE	
CA HP 672	+ B	A	M	B	BA	A	BA	
CA HP 646 B	+ C	C	C	CC	CC	CC	CC	
CA HP 9551-1	+ B	B	F	BF	BB	BF	BBF	

En la tabla siguiente se resumen los resultados de análisis mediante PCR-RFLP, de cepas de *H. parasuis* procedentes de explotaciones porcinas de la provincia de Segovia.

Identificación	<i>TaqI</i>	<i>AvaI</i>	<i>RsaI</i>	<i>TagI-RsaI</i>	<i>TaqI-AvaI</i>	<i>AvaI-RsaI</i>	<i>Las tres: T-A-R</i>
PR 12540	D	A	I	DI	DA	AI	DAI
PR 12540	D	A	I	DI	DA	AI	DAI
PR 12540	D	A	I	DI	DA	AI	DAI
PR 12546	D	B	F	DF	DB	BF	DBF
PR 12605/1	D	B	F	DF	DB	BF	DBF
PR 12586	D	B	E	DE	DB	BE	DBE
PR 12593	E	C	G	EG	EC	CG	ECG
PR 12614	D	B	F	DF	DB	BF	DBF
PR 12623	B	B	B	BB	BB	BB	BBB
PR 12537	D	B	E	DE	DB	BE	DBE
PR 12287	D	B	E	DE	DB	BE	DBE
PR 11261	D	B	E	DE	DB	BE	DBE
PR 11781	D	B	E	DI	DB	BE	DBE
PR 11797/1	E	C	G	EG	EC	CG	ECG
PR 11797/2	E	C	G	EG	EC	CG	ECG
PR 11797/3	E	C	G	EG	EC	CG	ECG
PR 12181	E	B	G	EG	EB	BG	EBG
PR 12240/1	D	A	E	DE	DA	AE	DAE
PR 12240/2	D	A	E	DE	DA	AE	DAE

ES 2 205 967 B1

(Continuación)

Identificación	TaqI	AvaI	RsaI	TagI-RsaI	TaqI-AvaI	AvaI-RsaI	Las tres: T-A-R
PR 12317	E	C	C	EC	EC	CC	ECC
PR 12689	D	B	B	DB	DB	BB	DBB
PR 12287	D	B	E	DE	DB	BE	DBE
PR 12851	D	B	F	DF	DB	BF	DBF
PR 12952	D	B	F	DF	DB	BF	DBF

En la siguiente tabla se relacionan los resultados del análisis de cepas de origen catalán y relacionados, con el sistema DITPAR *tbpA*.

Identificación	SV	TagI	AvaI	RsaI	TaqI-RsaI	TaqI-AvaI	AvaI-RsaI	Las tres: T-A-R
33	1	D	A	I	DI	DA	AI	DAI
857	1	D	A	I	DI	DA	AI	DAI
258	2	B	A	A	BA	BA	AA	BAA
403	2	D	B	E	DE	DB	BE	BDE
1251	3	C	C	J	CJ	CC	CJ	CGJ
660	4	C	C	G	CG	CC	CG	CCG
744	4	D	B	A	DA	DB	BA	DBA
964	4	D	B	F	DF	DB	BF	DBF
131	4	A	A	A	AA	AA	AA	AAA
1217	4	D	B	E	DE	DB	BE	DBE
1236	4	D	B	E	DE	DB	BE	DBE
185	5	B	B	H	BH	BB	BH	BBH
212	5	D	B	E	DE	DB	BE	DBE
504	5	D	B	E	DE	DB	BE	DBE
645	5	D	B	E	DE	DB	BE	DBE
652	5	C	B	E	CE	CB	BE	CBE
818	5	D	B	E	DE	DB	BE	DBE
878	5	D	B	B	DB	DB	BB	DBB
1180	5	D	B	E	DE	DB	BE	DBE
1183	5	E	A	I	EI	EA	AI	EAI
1132	5	D	B	H	DH	DB	BH	DBH
1203	5	B	B	H	BH	BB	BH	BBH
1235	5	D	B	E	DE	DB	BE	DBE

ES 2 205 967 B1

(Continuación)

5	Identificación	SV	<i>TagI</i>	<i>AvaI</i>	<i>RsaI</i>	<i>TaqI</i> - <i>RsaI</i>	<i>TaqI</i> - <i>AvaI</i>	<i>AvaI</i> - <i>RsaI</i>	Las tres: <i>T-A-R</i>
	191	6	B	A	D	BD	BA	AD	BAD
	321	7	B	A	A	BA	BA	AA	BAA
10	689	7	B	B	H	BH	DB	BH	BBH
	1193	7	C	C	G	CG	CC	CG	CCG
15	956	7	D	B	H	DH	DB	BH	DBH
	178	9	D	B	B	DB	DB	BB	DBB
	936	9	B	F	F	BF	BA	AF	BAF
20	167	9	D	B	H	DH	DB	BH	DBH
	515	12	A	A	A	AA	AA	AA	AAA
25	110	12	D	C	G	DG	DC	DC	DCG
	228	13	E	A	A	EA	EA	AA	EAA
	837	13	D	B	B	DB	DB	BB	DBB
30	745	14	B	B	B	BB	BB	BD	BBB
	1252	15	D	B	E	DE	DB	BE	DBE
35	120	NT	D	B	H	DH	DB	BH	DBH
	172	NT	D	B	E	DE	DB	DE	DBE
	189	NT	E	A	L	EL	EA	AL	EAL
40	385	NT	C	B	E	CE	CB	BE	CBE
	423	NT	D	B	E	DE	DB	BE	DBE
45	426	NT	B	B	BB	BB	BB	BB	BBB
	440	NT	E	A	I	EI	EA	AI	EAI
50	743	NT	D	B	F	DF	DB	BF	DBF
	787	NT	D	B	H	DH	DB	BH	DBH
	830	NT	E	A	B	EB	EA	AB	EAB
55	840	NT	D	B	E	DB	DB	BE	DBE
	912	NT	D	B	E	DE	DB	BE	DBE
60	971	NT	D	B	H	DH	DB	BH	DBH
	976	NT	D	B	B	DB	DB	BB	DBB
	1144	NT	D	B	H	DH	DB	BH	DBH
65	1146	NT	D	B	H	DH	DB	BH	DBH

ES 2 205 967 B1

(Continuación)

5	Identificación	SV	<i>TagI</i>	<i>AvaI</i>	<i>RsaI</i>	<i>TaqI</i> - <i>RsaI</i>	<i>TaqI</i> - <i>AvaI</i>	<i>AvaI</i> - <i>RsaI</i>	Las tres: <i>T-A-R</i>
	1149	NT	D	B	E	DE	DB	DE	DBE
	1194	NT	D	B	H	DH	DB	BH	DBH
10	1205	NT	B	A	K	BK	BA	AK	BAK
	1219	NT	D	A	I	DI	DA	AI	DAI
15	1145	NT	B	B	E	BE	BB	BE	BBB
	1204	NT	D	B	H	DH	DB	BH	DBH
	1214	NT	E	A	I	EI	EA	AI	EAI
20	1213	NT	C	B	H	CH	CB	BH	CBH
	1175	NT	D	B	B	DB	DB	BB	DBB
25	742	NT	D	B	B	DB	DB	BB	DBB
	424	NT	B	A	I	BI	BI	AI	BAI
	395	NT	D	B	B	DB	DB	BB	DBB
30	384	NT	E	B	I	EI	EB	BI	CBI

35 Se trata de un método de detección, identificación y tipado de aislamientos bacterianos de la especie *Haemophilus parasuis*, mediante técnicas moleculares dirigidas al gen *tbpA*.

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Procedimiento para la detección, identificación y tipado de *Haemophilus parasuis* basado en una reacción de PCR con cebadores específicos, cuya secuencia es SEQ ID NO1 y SEQ ID NO2, que amplifican una región del genoma de la bacteria con homología a los genes *tbpA*, con fines diagnósticos de tipo molecular.

10 2. Procedimiento para la detección, identificación y tipado de *Haemophilus parasuis*, según la reivindicación primera, que se **caracteriza** por la utilización los cebadores específicos que amplifican una región homóloga a los genes *tbpA*, con fines diagnósticos de tipo molecular, para identificación de *H. parasuis*, cualquiera que sea su procedencia, cultivos puros de laboratorio o muestras clínicas de cualquier tipo.

15 3. Procedimiento para la detección, identificación y tipado de *Haemophilus parasuis*, según la reivindicación primera, se **caracteriza** por la utilización de cebadores específicos que amplifican una región con homología a los genes *tbpA*, con fines de diferenciación de *H. parasuis* de otros microorganismos, en particular, de bacterias de origen porcino, implantadas en el tracto respiratorio, patógenas o no, a partir de cualquier tipo de muestra clínica.

20 4. Procedimiento para la detección, identificación y tipado de *Haemophilus parasuis*, según las reivindicaciones anteriores, se **caracteriza** por la utilización de cebadores específicos que amplifican una región con homología a los genes *tbpA*, con fines de tipificación de aislamientos de *Haemophilus parasuis* obtenidos a partir de cultivos o de cualquier tipo de muestra clínica.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 205 967 B1

LISTA DE SECUENCIAS

SEQ ID NO 1

5 <110> Rodríguez Ferri, Elías Fernando; Navas Méndez, Jesús; De la Puente Redondo, Víctor.
<120> Procedimiento para la detección, identificación y tipado de *Haemophilus parasuis* (Sistema DITPAR).
<140> P200100946
<141> 2001-4-23
10 <160> 1
<210> 2
<211> 21
<212> DNA
15 <213> *Haemophilus parasuis*
<400> 2

20 ttagccttcc tcttcttagc c

SEQ ID NO 2

<110> Rodríguez Ferri, Elías Fernando; Navas Méndez, Jesús; De la Puente Redondo, Víctor.
<120> Procedimiento para la detección, identificación y tipado de *Haemophilus parasuis* (Sistema DITPAR).
25 <140> P200100946
<141> 2001-4-23
<160> 1
30 <210> 3
<211> 24
<212> DNA
<213> *Haemophilus parasuis*
35 <400> 3

aagcttgaaa ctaaggctact ctaa

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 205 967

② Nº de solicitud: 200100946

③ Fecha de presentación de la solicitud: 19.04.2001

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.7: C12Q 1/68

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	DE LA PUENTE-REDONDO, V.A.; GARCÍA DEL BLANCO, N.; GUTIÉRREZ-MARTÍN, C.B. et al. Detection and subtyping of <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> strains by PCR-RFLP analysis of the <i>tbpA</i> and <i>tbpB</i> genes. Res. Microbiol., 2000, Vol. 151, páginas 669-681.	1-4
A	RAFIEE, M.; BARA, M.; STEPHENS, C.P.; BLACKALL, P.J. Application of ERIC-PCR for the comparison of isolates of <i>Haemophilus parasuis</i> . Aust. Vet. J., Diciembre 2000, Vol. 78, Nº 12, páginas 846-849.	1-4

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

12.04.2004

Examinador

E. Relaño Reyes

Página

1/1