

105



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

05-33793

21. EXPEDIENTE N° _____

54. TÍTULO "METODOS DE ENSAYO PARA LA DETECCION DE UN VIRUS EN UNA MUESTRA DE
TEJIDO AVIARIO"

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL C12Q 1/68 _____

71. SOLICITANTE WYETH _____

DOMICILIO MADISON, ESTADO DE NEW JERSEY, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA _____

74. REPRESENTANTE LEGAL ALICIA LLOREDA RICAURTE _____

T.P. 53.215

22. BOGOTÁ,D.C. 12 ABR 2005 _____

PETITORIO



SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
 Radicación: 05033793. 00000000 Folios: 86
 Fecha (AND): 2005-04-12 16:44:45
 Trámite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTAC
 Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

15-05-2005

①

SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención

☐ Patente de Modelo de Utilidad

☐ Capítulo I.

☒ Capítulo II.

②

SOLICITANTE (71)

Nombre: WYETH

Dirección: Five Giralda Farms, Madison,
 Estado de New Jersey 07940, Estados
 Unidos de América.

Nacionalidad o Domicilio: Madison,
 Estado de New Jersey, Estados Unidos
 de América.

Lugar de Constitución: Estado de
 Delaware, Estados Unidos de América.

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

IDENTIFICACION

C.C. ☐ NIT ☐
 C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

③

REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: ALICIA LLOREDA RICAURTE

Dirección: Calle 72 No. 5-83 Piso 5º,
 Bogotá, Colombia

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

C.C. ☒ NIT ☐
 C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 39.690.713 TP 53.215

④

INVENTOR(ES) (72)

Nombre: NAIR, Venugopal, K.; BAIGENT, Susan, Jean y CURRIE, Richard,
 John, William.

Dirección: Institute for Animal Health, Compton, Berkshire RG20 7NN y 6 River
 Gore View, Gorebridge, Midlothian EH123 4GE.

Nacionalidad o Domicilio: Gran Bretaña.

⑤

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/EP2003/011360

Fecha: 14/10/03

Publicación Internacional No. WO 2004/035821 A1

Fecha: 29/04/04

⑥

Título (54) "METODOS DE ENSAYO PARA LA DETECCION DE UN VIRUS EN
 UNA MUESTRA DE TEJIDO AVIARIO"

⑦

Clasificación Internacional (51) C12Q 1/68

⑧

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

GB
 GB

(32) Fecha

15/10/02
 29/05/03

(31) Número de Solicitud

0223960.6
 0312241.3

⑨

Comprobante de Pago No. 05 - 21.789

Fecha: 29-03-05

10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Documento de Representación Legal.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☒ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ Arte Final 12X12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: Reporte de Búsqueda Internacional con su traducción, Publicación con su traducción y Listado de secuencias.

11

FIGURA CARACTERISTICA:

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: ALICIA LLOREDA RICAURTE

FIRMA: 

C.C. 39.690.713

T.P. 53.215

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicacion : 05333793 00000000

Folios: 86

Fecha (AMD): 2005-04-12 16:44:45

Tramite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 05 - 21,789
FECHA : MARZO 29 DE 2005

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
LLOREDA Y CIA S. A	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	29721117	29/03/2005	3,004,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
1		TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	443,000.00
		TOTAL :	\$ 443,000.00

SON: CUATROCIENTOS CUARENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ANEXO

El documento que acredita la calidad de REPRESENTANTES LEGALES en Bogotá de los doctores **ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ** para TODOS LOS ASUNTOS RELACIONADOS CON LA PROPIEDAD INDUSTRIAL de la sociedad peticionaria, que faculta a cada uno de dichos abogados para actuar individualmente, se está presentando con esta solicitud. En consecuencia, ruego a usted reconocer la personería de cada uno de dichos Representantes Legales para actuar dentro del presente expediente, a fin de que cualquiera de ellos pueda intervenir en cualquier tiempo respecto de la solicitud en él contenida.



ALICIA LLOREDA RICAURTE

T.P. No. 53.215

4

TRADUCCION OFICIAL No. 2004-11-09-582
DE UN DOCUMENTO PRESENTADO EN INGLES

PODER

Legalización de un Poder de Representación Legal, documento escrito en inglés y en español.

Certificado Notarial (sociedad), documento también escrito en inglés y en español.

Marilyn L. Mitchell
Notario Público, Estado de New Jersey
Mi Comisión Expira el 6 de febrero de 2005

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
 2. Este documento público ha sido firmado por Marilyn L. Mitchell
 3. actuando como Notario Público de New Jersey
 4. lleva el sello/estampilla de Marilyn L. Mitchell, Notario
- NOV 2004
JANUARY 2005
NOTARY PUBLIC
NEW JERSEY

CERTIFICADO

5. en Trenton, New Jersey
 6. el día 7 de octubre de 2004
 7. por John E McCormac, CPA, Tesorero de New Jersey
 8. No. A210247
 9. Sello/Estampilla
 10. Firma: (ilegible)
- Hay un sello dorado.

Traducido según mi mejor saber y entender, este día 9 de noviembre de 2004, en la ciudad de Bogotá, D.C., por Anita Escobar de Tamayo, Traductora Oficial, Res. 2177 de 1989, Ministerio de Justicia, República de Colombia.

TRADUCTOR OFICIAL
RESOLUCION 2177
Anita Escobar de Tamayo
ANITA ESCOBAR DE TAMAYO

4

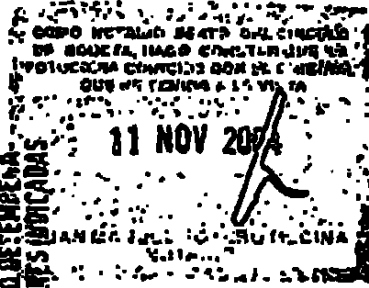
MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

283161
Anita Escobar
Cuya firma aparece en el
DOCUMENTO DE EMBAJADA
LAS FUNCIONES INDICADAS

1000 NOV 10 P 10 40

1003
JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTA D.C.



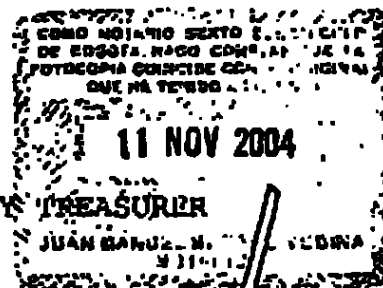
APOSTILLE

(CONVENTION DE LA HAYE DU 5 OCTOBRE 1961)

1. COUNTRY: UNITED STATES OF AMERICA
2. THIS PUBLIC DOCUMENT HAS BEEN SIGNED BY:
MARILYN L MITCHELL
3. ACTING IN THE CAPACITY OF:
NOTARY PUBLIC OF NEW JERSEY
4. BEARS THE SEAL/STAMP OF:
MARILYN L MITCHELL, NOTARY

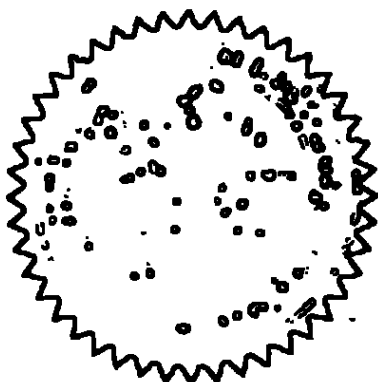
CERTIFIED

5. AT TRENTON, NEW JERSEY
6. THE 7TH DAY OF OCTOBER 2004
7. BY: John E McCormac, CPA, NEW JERSEY
8. NO. A210247
9. SEAL/STAMP:



10. SIGNATURE

John E McCormac



Los abajo firmados, WYETH, una sociedad organizada y existente de conformidad con las leyes del Estado de Delaware, Estados Unidos de América.

con domicilio en Five Giralda Farms, Madison,
Estado de New Jersey 07940,
Estados Unidos de América

nombramos por el presente a ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, domiciliados en Bogotá, Colombia, con oficinas en dicha ciudad, Calle 72 No. 5-83, piso 6o., nuestros representantes legales y verdaderos en Bogotá, con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales, con el fin de dar cumplimiento al parágrafo 1o. del artículo 543 del decreto 410 de 1971.

Los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, o los apoderados que cualquiera de ellos designe, quedan especialmente facultados para representarnos ante las autoridades colombianas, administrativas, judiciales o de policía, en todos los trámites relativos a la propiedad industrial, a cuyo efecto los facultamos para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al objeto indicado; elevar solicitudes, declaraciones, reclamos, recursos y presentar desistimientos; formular descripciones, enmiendas, limitar el alcance de las solicitudes, presentar oposiciones y apelaciones; instaurar cancelaciones, renunciar total o parcialmente a los registros, abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar todo otro pago determinado por la ley; recibir todos los documentos y valores, dando el descargo respectivo; tomar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de nuestros intereses; y en caso de producirse oposición, pasando los antecedentes a los tribunales, quedan facultados para tomar intervención como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo transar, someter a árbitros, desistir, perorar y apelar, con todas las demás facultades que resulten necesarias, y por el presente declaramos desde ahora válido y bueno cuanto dichos representantes y/o los apoderados que cualquiera de ellos nombre hicieren en nuestro beneficio.

Asimismo, facultamos a los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, para solicitar en la Oficina de Propiedad Industrial la protocolización de este documento y de cualquier poder que cualquiera de ellos otorgue a nombre nuestro.

Dado y firmado

The undersigned, WYETH, a corporation organized and existing under the laws of the State of Delaware, United States of America.

domiciled at Five Giralda Farms, Madison,
State of New Jersey 07940,
United States of America

hereby appoint ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, of Bogotá, Colombia, with offices in said town, Calle 72 No. 5-83, Sixth Floor, our true and legal representatives in Bogotá, with power to receive notifications and to appoint judicial or extrajudicial agents, so as to comply with paragraph 1o. of article 543 of decree 410 of 1971.

Doctors ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, or the agents by any one of them appointed, are especially empowered to represent us before the administrative, judicial or police authorities of Colombia, in all proceedings pertaining to industrial property, for which purpose we authorize them to take before the said authorities all the necessary steps for the said end; to file petitions, declarations, claims, recourses and withdrawals, to draw up specifications; to file amendments, to limit the scope of applications, file oppositions; file cancellations total or partially waive registrations, to pay all installments and effect all other payments prescribed by law; to receive proper receipts, to comply with all other requirements, and, in short, to take all those measures which they may deem fit for the protection of our interests; and in case of opposition, where the proceedings be passed over to the courts, we authorize said agents to act on our behalf, as complainants as well as defendants, before the competent judges, with full powers to make arrangements, to submit to arbitration, to desist to collect, to appeal and, in short, with all such further powers as may be required, and we hereby declare from now on as valid and good all that said representatives and/or the agents by any one of them appointed may do for our benefit.

We also authorize doctors ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, to apply for protocolization of this document and of any power of attorney by any one of them conferred in our name, before the Office of Industrial Property.

Given and signed this: 6th day of October 2004
Wyeth


William H. Calnan
Assistant Secretary

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Estados Unidos de América
Estado de New Jersey (ss
Condado de Morris

Hoy 6 de Octubre de 2004 compareció
William H. Calnan a quien conozco y
de quien me consta que firmó el anterior documento,
y quien debidamente juramentado declaró y dijo que
él es
de WYETH la compañía nombrada en el documento
que antecede, una sociedad debidamente organizada
y existente conforme a las leyes del Estado de
Delaware, Estados Unidos de América, domiciliada
en la ciudad de Madison, Condado de Morris,
Estado de New Jersey, Estados Unidos de América,
legalmente constituida para un período de duración
que aún no ha terminado; que ejerce su objeto social;
conforme a las leyes del Estado de Delaware,
Estados Unidos de América; que el declarante está
autorizado por dicha Compañía para conferir este
poder; que el sello estampado por él al pie de tal
poder, en nombre y en representación de la
expresada Compañía, es el sello oficial de ella; y que
el objeto para el cual se confiere este instrumento
está comprendido dentro del de la sociedad.
El suscrito Notario ha visto los Estatutos de
Incorporación firmados en Madison, Estado de New
Jersey, con fecha 4 Febrero, 1926 y
certifica que de conformidad con la legislación de
dicho Estado la anterior declaración juramentada es
prueba suficiente de que los hechos sobre que ella
versa son ciertos o verdaderos, de lo cual da fe.

Notary Public (Notario Público).

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

United States of America
State of New Jersey (ss
County of Morris

On this 6th day of October 2004, personally
came, William H. Calnan
to me known, and known to me to be the person who
signed the foregoing instrument, who being by me
duly sworn did depose and say that he is the
Assistant Secretary of WYETH the company named
within, a Corporation organized and existing under
the laws of State of Delaware, United States of
America, domiciled at the City of Madison, County of
Morris, State of New Jersey, United States of
America, legally constituted for a period of tenure not
yet expired, which exercises its corporate purposes
according to the laws of State of Delaware, United
States of America; that the deponent is authorized by
said Company to confer this power of attorney; that
the seal affixed hereunto by the deponent in the
name and on behalf of said Corporation is the
corporate seal thereof; and that the purpose for which
this instrument is granted is included within the
corporate purposes of the Company.
The undersigned Notary Public has seen the articles
of Incorporation of said Corporation executed at
Wilmington, Delaware U.S.A. under date of
February 4, 1926, and hereby certifies that under the
laws of said State the foregoing acknowledgment is
sufficient proof that the facts therein contained are
true, which he attests.

Marilyn L. Mitchell

MAFILYN L MITCHELL
NOTARY PUBLIC STATE OF NEW JERSEY
My Commission Expires February 6, 2005

Extracto de publicación Folio 7

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/EP 03/011360

A. CLASIFICACION DE MATERIA IPC 7: C12Q 1/68

Según la Clasificación de Patentes Internacional (CPI) o según la clasificación nacional y/o (CPI)

B. CAMPOS BUSCADOS

Documentación relativa buscada (sistema de clasificación seguido de abreviaturas de clasificación)

IPC 7 C12Q

Documentación buscada fuera de clasificación: ninguna base donde dichos documentos se incluyan en los campos buscados

Bases de datos electrónicas consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, donde sea pertinente, buscar términos relacionados)

EPO-Interno, Data WPI, PAJ, MIDLINE, EMBASE, BIOSIS, BUSQUEDA DE SECUENCIA

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría "	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiada, de los textos relevantes	Referencia a la solicitud No.
A	IRIT DAVIDSON ET AL.: "Las puntas de las plumas de gallinas comerciales son una fuente invocable de ADN para la amplificación del virus de la enfermedad de Marek y el virus de la leucosis avícola, subgrupos J" AVIAN PATHOLOGY vol. 31, 2002, páginas 237-240, XP009025513 página 237 - página 239	1-21
A	NOVAK R ET AL.: "Hibridación in situ por la detección del virus de anemia de gallina en frotis de sangre periférica" MOLECULAR AND CELLULAR PROBES, ACADEMIC PRESS LONDON, GB, vol. 11, No. 2, Abril 1997 (1997-04), páginas 135-141, XP004459915 ISBN: 0890-8508 página 135 -137	1-21

☒ En el terreno o se encuentran más documentos.

☒ En el área en que son miembros de la familia de patentes.

* Categorías especiales de documentos citados

A documento que define el estado general de la técnica el cual no se considera de relevancia particular

B documento anterior pero publicado en o después de la fecha de presentación internacional

C documento que puede arrojar dudas sobre reivindicaciones de prioridad o que se cita para establecer la fecha de publicación de una invención y una razón especial (según se especifica)

D documento que se refiere a una revelación oral, uso, exhibición o como materia

E documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero después de la fecha de prioridad reivindicada

F documento posterior publicado después de la fecha de presentación internacional o fecha de prioridad y que no está en conflicto con la solicitud pero citado para eliminar el principio o aclarar que sustenta la invención

G documento de relevancia particular; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se considera como el documento de prioría sola

H documento de relevancia particular; la invención reivindicada no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se considera con uno o más documentos, siendo dicha combinación nueva para una persona experta en la técnica

I documento miembro de la misma familia de patentes

Fecha de la presentación oral de la búsqueda internacional

10 de Marzo de 2004

Fecha de envío por correo del reporte de búsqueda internacional

05/04/2004

Nombre y dirección del cliente de ISA

European Patent Office, P.B. 5518 Patents 2
NL-2280 HY Rijswijk
Tel. No. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl
Fax No. (+31-70) 340-2016

Fuente de información

BROCHADO GARGANTA, M

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/EP 03/11360

C. (Continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría *	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiada, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
A	EP 0 884 382 A (PFIZER PROD IN) 16 de Diciembre de 1998 (1998-12-16) todo el documento	1-21
A	US 6 221 362 B1 (RIVIERE MICHEL ET AL.) 24 de Abril de 2001 (2001-04-24) todo el documento	1-21

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL
Informe sobre miembros de familia de patentes

Solicitud Internacional No.
PCT/EP 03/11360

Documento de patente citado en el reporte de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
BP 0884382 A	16-12-1998	AU 753963 B2	31-10-2002
		AU 699829R A	17-12-1998
		BR 9801992 A	11-01-2000
		CA 2234423 A1	10-12-1998
		CN 1203275 A,B	30-12-1998
		EP 0884382 A2	16-12-1998
		JP 11009290 A	19-01-1999
		NZ 330643 A	29-11-1999
		US 6475770 B1	05-11-2002
		ZA 9804970 A	09-12-1999
US 6221362 B1	24-04-2001	FR 2751225 A1	23-01-1998
		AU 735184 B2	05-07-2001
		AU 3773697 A	10-02-1998
		BR 9710495 A	17-08-1999
		CA 2261343 A1	29-01-1998
		CN 1225685 A	11-08-1999
		EP 0914442 A1	12-05-1999
		WO 9803659 A1	29-01-1998
		ID 19475 A	16-07-1998
		JP 2001503019 T	06-03-2001
		NZ 333779 A	28-07-2000
		US 2003124145 A1	03-07-2003
		US 2002037292 A1	28-03-2002

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 03/11360

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C1201/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C120

Inventive data have been examined during the international search phase of data base and, where practical, search terms used

Inventive data have been examined during the international search phase of data base and, where practical, search terms used

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, EMBASE, BIOSIS, SEQUENCE SEARCH

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	IRIT DAVIDSON ET AL.: "The feather tips of commercial chickens are a favorable source of DNA for the amplification of Marek's disease virus and avian leukosis virus, subgroup J" AVIAN PATHOLOGY, vol. 31, 2002, pages 237-240, XP009025513 page 237 -page 239 ---	1-21
A	NOYAK R ET AL: "In situ hybridization for detection of chicken anaemia virus in peripheral blood smears" MOLECULAR AND CELLULAR PROBES, ACADEMIC PRESS, LONDON, GB, vol. 11, no. 2, April 1997 (1997-04), pages 135-141, XP004459918 ISSN: 0890-8508 page 135 -page 137 ---	1-21
-/-		

☒ Further documents are listed in the continuation of box C☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"I" document which may throw doubts on priority, clarity or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is compared with one or more other such documents, such comparison being obvious to a person skilled in the art.

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 March 2004

Date of mailing of the international search report

05/04/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P. M. 54-8, Postfach 7
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. 1-31-70 340-2000, Te. 31 851 99 00 01,
Fax. 1-31-70 340-3016

Authorized officer

BROCHADO BARGANTA, N

International Application No
PCT/EP 03/11360

PCT/EP 03/11360

Category	Category of documents with indication, where appropriate, of the relevant passages	Reference to document
A	EP 0 884 382 A (PFIZER PROD INC) 16 December 1998 (1998-12-16) the whole document ---	1-21
A	US 6 221 362 B1 (RIVIERE MICHEL ET AL) 24 April 2001 (2001-04-24) the whole document -----	1-21

[illegible]

44.

12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 03/11360

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0884382	A	16-12-1998	AU 753963 B2 31-10-2002
			AU 6998298 A 17-12-1998
			BR 9801992 A 11-01-2000
			CA 2234423 A1 10-12-1998
			CN 1203275 A ,B 30-12-1998
			EP 0884382 A2 16-12-1998
			JP 11009290 A 19-01-1999
			NZ 330643 A 29-11-1999
			US 6475770 B1 05-11-2002
			ZA 9804970 A 09-12-1999
US 6221362	B1	24-04-2001	FR 2751225 A1 23-01-1998
			AU 735184 B2 05-07-2001
			AU 3773697 A 10-02-1998
			BR 9710495 A 17-08-1999
			CA 2261343 A1 29-01-1998
			CN 1225635 A 11-08-1999
			EP 0914442 A1 12-05-1999
			MD 9803659 A1 29-01-1998
			ID 19475 A 16-07-1998
			JP 2001503019 T 06-03-2001
			NZ 333779 A 28-07-2000
			US 2003124145 A1 03-07-2003
			US 2002037292 A1 28-03-2002

15

(17) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA SEGUN EL TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES (PCT)

(18) Organización Mundial de Propiedad Intelectual
Oficina Internacional



(43) Fecha de Publicación

29 de Abril de 2004 (29.04.2004)

PCT

(19) Número de Publicación Internacional

WO 2004/035821 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes: C12Q 1/68

(21) Número de Solicitud Internacional PCT/EP2003/011360

(22) Fecha de Registro Internacional: 14 de Octubre de 2003
(14.10.2003)

(25) Idioma de registro: INGLÉS

(26) Idioma de Publicación: INGLÉS

(30) Información de Prioridad:

0223968.6 15 de Octubre de 2002 (15.10.2002) (GB)
0312241.3 29 de Mayo de 2003 (29.05.2003) (GB)

(71) Solicitante: (para todos los estados designados, excepto República Unión de América): WYETH [US/US]; Five Circles Farm, Madison, NJ 07940 (US).

(72) Inventores:

(73) Inventor (para los Estados Unidos de América únicamente): NAIR, Venugopal, K. [IN/IN]; Institute for Animal Health, Pirbright, Berkshire RG20 7NN (GB). BAILEY, Susan, Jean [GB/GB]; Institute for Animal Health, Pirbright, Berkshire RG20 7NN (GB). CURRIE, Richard, John, William [GB/GB]; 6 River Gate View, Corebridge, Midlothian EH21 4QR (GB).

(74) Agente: INGHAM, Stephen, Howard et al.; Wyeth Pharmaceuticals, Havercombe Lane South, Macclesfield Cheshire, SK16 6PH (GB).

(11) Estados Designados (nacionales): AE, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, FR, GB, GR, GU, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(12) Estados Designados (regionales): Patente ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SI, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Patente Europea (AM, AZ, BY, BG, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), Patente OAPI (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).

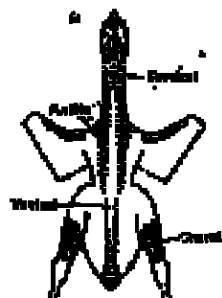
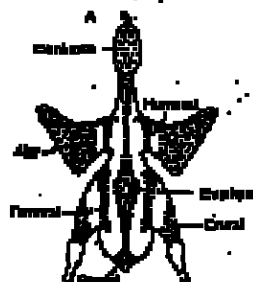
Publicación:

— con resúmenes de la solicitud internacional

— Antes de la expiración del tiempo límite para presentar las reivindicaciones y para ser publicado sucesivamente en el caso de la recepción de las modificaciones

Para los códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase a "Las Notas Gúras sobre Códigos y Abreviaturas" que aparecen al comienzo de cada edición regular de la Gaceta PCT.

(54) Título: "MÉTODOS DE ENSAYO PARA LA DETECCIÓN DE UN VIRUS EN UNA MUESTRA DE TEJIDO AVIARIO"



(57) Resumen: La invención se relaciona con métodos de detección de un virus en una muestra de tejido aviar, en donde el material genético derivado de las plumas es probado para la presencia de material genético del virus.

14 si

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



INTERNATIONAL PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(43) International Publication Date
29 April 2004 (29.04.2004)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2004/035821 A1

(51) International Patent Classification: C12Q 1/68
(21) International Application Number: PCT/US2003/01360
(22) International Filing Date: 14 October 2003 (14.10.2003)
(25) Filing Language: English
(26) Publication Language: English
(30) Priority Data:
02339940 6 15 October 2002 (15.10.2002) GB
01123413 29 May 2003 (29.05.2003) GB
(71) Applicant (for all designated States except US): WYETH
[US/US]: Hov Chakka House, Madison, NJ 07940 (US).

Heretofore RG20 7NN (GB), BAIGENT, Susan, Jean
[GB/GB]: Institute for Animal Health, Pirbright, Heretofore
RG20 7NN (GB), CURRIE, Richard, John, William
[GB/GB]: 6 River Close View, Chesham, Bucks, Heretofore
HP12 3JH (GB).

(74) Agents: INGHAM, Stephen, Howard et al., Wyeth Phar-
maceuticals, Harrogate Lane South, Macclesfield, Ber-
shire SK10 0PL (GB).

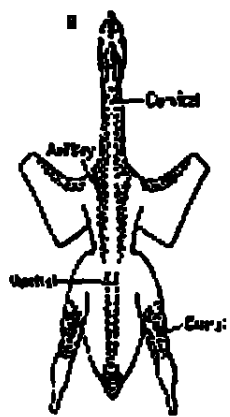
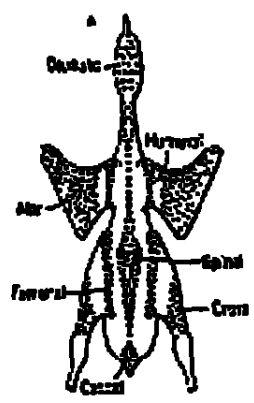
(81) Designated States (national): AE, AG, AI, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CY, CZ, DE,
DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GR, HU, IL, IN,
JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA,
MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PA, PE, PG, PH,
PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TH, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GB, GR,
KE, LS, MW, MY, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TR, TN).

(Continued on next page)

(84) Title: ASSAY METHODS FOR DETECTION OF A VIRUS IN AN AVIAN TISSUE SAMPLE

(57) Abstract: The invention relates to methods of detecting a virus in an avian tissue sample wherein genetic material derived from feathers is tested for the presence of genetic material from the virus



WO 2004/035821 A1

1A

European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LI, MK, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CI, CG, CF, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

— before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

Published:

— with international search report

For prior art, notes and other information, refer to the "Guidelines for Authors" (notes and information) appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

16

TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES
PCT
REPORTE DE EXAMEN PRELIMINAR INTERNACIONAL

(PCT Artículo 36 y Regla 70)

Registro de referencia del solicitante o agente AM101125	PARA FUTURAS ACCIONES Ver Notificación o Transmisión del Reporte de Examen Preliminar Internacional (Formato PCT/PEA/416)	
Solicitud Internacional No. PCT/EP 03/11360	Fecha de registro internacional (día/mes/año) 14.10.2003	Fecha de prioridad (día/mes/año) 15.10.2002
Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o clasificación nacional e IPC: C12Q1/68		
Solicitante WYETH		
1. Este informe de examen preliminar internacional ha sido preparado por esta Autoridad Examinadora Preliminar Internacional y se transmite al solicitante de conformidad con el Artículo 36. 2. Este REPORTE consta de un total de <u>6</u> páginas, incluyendo la carátula. ☐ Este reporte también está acompañado de ANEXOS, es decir, páginas de descripción, reivindicaciones y/o dibujos que han sido modificados y son la base de este informe y/o páginas que contienen rectificaciones hechas ante esta Autoridad (ver Regla 70.16 y la Sección 607 de las Instrucciones Administrativas de conformidad con el PCT). Estos anexos constan de un total de _____ páginas. 3. Este informe contiene indicaciones relacionadas con los siguientes ítems: - I ☒ Bases del Reporte - II ☐ Prioridad - III ☐ No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad Industrial. - IV ☐ Falta de unidad de invención - V ☒ Afirmación razonada de conformidad con el Artículo 35(2) con respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citaciones y explicaciones que sustentan dicha afirmación. - VI ☐ Ciertos documentos citados - VII ☐ Ciertos defectos en la solicitud internacional - VIII ☐ Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional		
Fecha de presentación de la demanda 10.05.2004	Fecha de terminación de este reporte 03.12.2004	
Nombre y dirección de correo de la autoridad internacional de examen preliminar European Patent Office D-80291 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Funcionario autorizado Bruchado Garganta, M Teléfono No. +49 89 2399 - 8935	

Forma PCT/PEA/409 (Portada) (Enero 2004)

17

I. Bases del Reporte

1. Respecto a los elementos de la solicitud internacional: (Carátulas de remplazo que han sido suministradas a la oficina receptora en respuesta a una invitación bajo el artículo 14 están referenciados en este reporte como "presenta originalmente" y no están anexos a este reporte dado que no contienen modificaciones (Reglas 70.16 y 70.17):

Descripción, Páginas

1-37 como se presentaron originalmente

Reivindicaciones, No.

1-21 como se presentaron originalmente

Dibujos, hojas

1/11-11/11 como se presentaron originalmente

2. Respecto al idioma, todos los elementos marcados anteriormente estuvieron disponibles o fueron suministrados a esta Autoridad en el idioma en el cual la solicitud internacional fue presentada, a menos que se indique lo contrario bajo este ítem.

Estos elementos estuvieron disponibles o fueron suministrados a esta Autoridad en el idioma, el cual es:

- ☐ el idioma de una traducción suministrada para una búsqueda internacional (según la Regla 23.1 (b)).
☐ el idioma de una publicación de la solicitud internacional (según la Regla 48.3 (b)).
☐ el idioma de la traducción suministrada para el examen preliminar internacional (según las Reglas 55.2 y/o 55.3).

3. Respecto al nucleótido y/o secuencia amino ácida revelado en la solicitud internacional, se llevó a cabo el examen preliminar internacional según el listado de secuencia:

- ☒ contenido en la solicitud internacional en forma escrita.
☒ registrado junto con la solicitud internacional en forma legible por computador.
☐ proporcionado subsiguientemente a esta Autoridad en forma escrita.
☐ proporcionado subsiguientemente a esta Autoridad en forma legible por computador.
☒ Se ha proporcionado la afirmación respecto a la cual el listado de secuencia escrito proporcionado subsiguientemente no va más allá de la revelación en la solicitud internacional según se presentó.
☒ Se ha proporcionado la afirmación respecto a la cual la información presentada en forma legible por computador es idéntica al listado de secuencia escrita.

4. Las modificaciones han resultado en la cancelación de:

- ☐ la descripción, páginas:
☐ las reivindicaciones, Nos.:
☐ los dibujos, Hojas:

Re Item V

Declaración razonada con respecto a novedad, paso inventivo o aplicabilidad industrial; citas y explicaciones que apoyan dicha declaración.

1 Se hace referencia a los siguientes documentos:

(D1) Int. Davidson et al. Avian Pathology, vol. 31, 2002, páginas 237-240

2 Novedad

El objeto de la reivindicación 1 que hace referencia a un método para detectar un virus en una muestra de tejido aviar es nuevo según el Artículo 33(2) PCT, porque no se revela en la técnica anterior un método en donde la muestra se derive de las plumas del tracto axilar.

Por las mismas razones, las reivindicaciones dependientes 2-16, y las reivindicaciones 17-21, que hacen referencia a una muestra de tejido aviar aislado y un extracto que contiene material genético, también son nuevas (Artículo 33(2) PCT).

3. Paso Inventivo

El D1 revela un método de detección de un virus en una muestra, en donde el material genético es extraído de las puntas de las plumas de las alas, del hígado y del bazo. Se determinó que el uso del DNA tomado desde las puntas de las plumas fue más efectivo para el diagnóstico de gallinas comercialmente infectadas vía natural que usando el hígado y el bazo (ver páginas 237-238) y la tabla 1.

La diferencia entre el objeto de la reivindicación 1 y la revelación en D1 es el hecho que el material genético es extraído de las plumas del tracto axilar.

El problema a resolver por la presente solicitud es proveer un método mejorado para detectar un virus en una muestra de tejido avian.

El virus avian puede ser detectado en las plumas de tracto axilar en niveles más altos que en otras plumas y por lo tanto éste puede ser detectado en las plumas del tracto axilar, según la invención cuando éste no se puede detectar en otras muestras de tejido, incluyendo otras plumas. A los 13 días después de la vacunación, la carga de virus promedio de los pollos es hasta cuatro veces mayor en los trectos que en otros trectos (ver página 3 y 4 y figura 10b de la presente solicitud).

Nada en D1 conduciría a una persona versada en la materia a pensar que la sensibilidad del método podría aumentarse al usar las plumas de otros trectos axilares. Por lo tanto se considera que la reivindicación 1, implica un concepto inventivo, según el Artículo 33(3) PCT.

Lo mismo parece aplicar a las reivindicaciones 2-16 y las reivindicaciones 17-21 que hacen referencia a una muestra de tejido avian separado y un extracto que contenga material genético, que no sea revelado en la técnica anterior y que sean puedan ser usados en el método reivindicado, generando una sensibilidad aumentada del mismo. Estas reivindicaciones pueden también ser consideradas como inventivas (Artículo 33(3) PCT).

4. Claridad

4.1. Las reivindicaciones 15 y 16 no son claras (Artículo 6 PCT), según las características reivindicadas, es decir, el proveer los resultados del método en un formato intangible y la grabación o almacenamiento de los resultados del método en un portador de información, no son propiedades que caractericen el método.

20

4.2. Las reivindicaciones 17 y 18 no son claras (Artículo 6 PCT), porque el tejido *avíar* no está caracterizado a través de propiedades técnicas.

4.3 Las reivindicaciones 20 y 21 no son claras (Artículo 6 PCT), como propiedades reivindicadas, es decir, al almacenar la muestra o extracto en una forma adecuada para transportar a una parte separada y que tenga la muestra o extracto en un contenedor sellado, no son propiedades que caractericen la muestra, ni tampoco el extracto.

PATENT COOPERATION TREATY

Docketed

06 DEC 2004

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

PCT

To:

TALBOTT, Dawn Jacqueline
Wyeth Pharmaceuticals
Hunfercombe Lane South
Maidenhead
Berkshire, SL6 0PH
GRANDE BRETAGNE

RECEIVED

06 DEC 2004

PATENTS DEPT.

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF THE INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Rule 71.1)

Date of mailing
(day/month/year)

03.12.2004

Applicant's or agent's file reference
AM-101125

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/EP 03/11380

International filing date (day/month/year)
14.10.2003

Priority date (day/month/year)
15.10.2002

Applicant
WYETH et al.

1. The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority transmits herewith the international preliminary examination report and its annexes, if any, established on the international application.
2. A copy of the report and its annexes, if any, is being transmitted to the International Bureau for communication to all the elected Offices.

3. Where required by any of the elected Offices, the International Bureau will prepare an English translation of the report (but not of any annexes) and will transmit such translation to those Offices.

4. REMINDER

The applicant must enter the national phase before each elected Office by performing certain acts (filing translations and paying national fees) within 30 months from the priority date (or later in some Offices) (Article 39(1)) (see also the reminder sent by the International Bureau with Form PCT/AB/301).

Where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary examination report. It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned.

For further details on the applicable time limits and requirements of the elected Offices, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The applicant's attention is drawn to Article 33(5), which provides that the criteria of novelty, inventive step and industrial applicability described in Article 33(2) to (4) merely serve the purposes of international preliminary examination and that "any Contracting State may apply additional or different criteria for the purposes of deciding whether, in that State, the claimed inventions is patentable or not" (see also Article 27(5)). Such additional criteria may relate, for example, to exemptions from patentability, requirements for enabling disclosure, clarity and support for the claims.

Name and mailing address of the international
preliminary examining authority:



European Patent Office
D-80298 Munich
Tel. +49 89 2369-0 Fax: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2369-4466

Authorized Officer

Digiusto, M
Tel. +49 89 2369-8162



PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT
(PCT Article 36 and Rule 70)

22

Applicant's or agent's file reference AM-101125		FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/PEA/415)	
International application No. PCT/EP 03/11360	International filing date (day/month/year) 14.10.2003	Priority date (day/month/year) 15.10.2002	
International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC C12Q1/68			
Applicant WYETH et al.			
1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36. 2. This REPORT consists of a total of 6 sheets, including this cover sheet. ☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e. sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT). These annexes consist of a total of sheets.			
3. This report contains indications relating to the following items: I ☒ Basis of the opinion II ☐ Priority III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV ☐ Lack of unity of invention V ☒ Reasoned statement under Rule 68.2(a)(II) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement VI ☐ Certain documents cited VII ☐ Certain defects in the international application VIII ☐ Certain observations on the international application			
Date of submission of the demand 10.05.2004		Date of completion of this report 03.12.2004	
Name and mailing address of the international preliminary examining authority:  European Patent Office D-80291 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Telex: 523636 eptm d Fax: +49 89 2399 - 4455		Authorized Officer Brochado Garganta, M Telephone No. +49 89 2399-8035 	

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International application No. **PCT/EP 03/11360**

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rules 70.16 and 70.17)*):

Description, Pages

1-37 as originally filed

Claims, Numbers

1-21 as originally filed

Drawings, Sheets

1/11-11/11 as originally filed

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language: , which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of the international search (under Rule 23.1(b)).
☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
☐ the language of a translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☒ contained in the international application in written form.
☒ filed together with the international application in computer readable form.
☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
☒ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages:
☐ the claims, Nos.:
☐ the drawings, sheets:

Re Item V

Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Reference is made to the following documents:

(D1) Irit Davidson et al. Avian Pathology, vol. 31, 2002, pages 237-240

2. Novelty

The subject-matter of claim 1, relating to a method for detecting a virus in an avian tissue sample, is new in the sense of Article 33(2) PCT, because a method wherein the sample is derived from feathers of the axillary tract is not disclosed in the prior art.

For the same reasons, dependent claims 2-16, and claims 17-21, relating to an isolated avian tissue sample and a genetic material-containing extract, are also novel (Article 33(2) PCT).

3. Inventive step

D1 discloses a method of detecting a virus in a sample, wherein the genetic material is extracted from the tips of wing feathers, liver and spleen. It is determined that using DNA from feather tips was more effective for diagnosis of naturally infected commercial chickens than using the liver and spleen (see pages 237-238 and table 1).

25

The difference between the subject-matter of claim 1 and the disclosure in D1 is the fact that the genetic material is extracted from feathers from the axillary tract.

The problem to be solved by the present application is to provide an improved method for detection of a virus in an avian tissue sample.

Avian virus can be detected in axillary tract feathers at higher levels than in other feathers and therefore it can be detected in axillary tract feathers according to the invention when it cannot be detected in other tissue samples, including other feathers. At 13 days after vaccination, the mean virus load for the chicks is up to four-fold greater in the axillary tracts than in the other feather tracts (see pages 3 and 4, and figure 10b of the present application).

Nothing in D1 would lead the skilled person to think that the sensitivity of the method could be increased by using feathers from the axillary tract. Thus, claim 1 is considered to involve an inventive concept as required by Article 33(3) PCT.

The same seems to apply to dependent claims 2-16, and claims 17-21, relating to an isolated avian tissue sample and a genetic material-containing extract, which are also not disclosed in the prior art and are capable of being used in the claimed method, leading to an increased sensitivity of the same. These claims could also be considered as inventive (Article 33(3) PCT).

4. Clarity

- 4.1 Claims 15 and 16 are not clear (Article 6 PCT), as the claimed features, i.e. furnishing the results of the method in an intelligible format, and recording or storing the results of the method on an information carrier, are not characterising features of the method.

- 4.2 Claims 17 and 19 are not clear (Article 6 PCT), because the claimed avian tissue sample is not characterised by means of technical features.
- 4.3 Claims 20 and 21 are not clear (Article 6 PCT), as the claimed features, i.e. storing the sample or extract in a form suitable for transport to a separate location, and having the sample or extract in a sealed container, are not characterising features of the sample neither of the extract.

**METODOS DE ENSAYO PARA LA DETECCION DE UN VIRUS EN UNA
MUESTRA DE TEJIDO AVIARIO**

RESUMEN-OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

La invención se relaciona con métodos de detección de un virus en una muestra de tejido aviario, en donde el material genético derivado de las plumas es probado para la presencia de material genético del virus.

METODOS DE ENSAYO PARA LA DETECCION DE UN VIRUS EN UNA MUESTRA DE TEJIDO AVIARIO

La presente invención está relacionada con métodos de ensayo y en particular, con los métodos para detectar la presencia de un virus, especialmente el virus de enfermedad de Marek (MDV), en una muestra de tejido aviar.

Antecedentes

El virus de la enfermedad de Marek (MDV) es un herpesvirus, que causa enfermedad linfoproliferativa en los pollos. Incluso después de la introducción de vacunas contra el MDV, la infección aún causa pérdidas considerables en la industria avícola. El MDV se divide en tres serotipos, todos los cuales establecen infecciones latentes. El serotipo 1 incluye virus oncogénicos, el virus 2 virus no-oncogénicos y el serotipo 3 incluye los herpesvirus de pavo (HTV) (Bülow et al (1976) *Zentralblatt für Veterinärmedizin*, 23B, 391-402).

El diagnóstico tradicional de la enfermedad de Marek se basa en los signos clínicos y alteraciones patológicas. Sin embargo, serían deseables métodos más específicos para la vigilancia del predominio del MVD. La detección del antígeno viral en el epitelio del folículo de la pluma mediante la prueba de precipitación de gel agar ha sido descrita por Haider et al (1970) *Poultry Science*, 49, 1654-1657. Los diferentes serotipos se pueden diferenciar mediante la prueba de precipitación de gel de agar (Lee et al (1983) *Journal of Immunology*, 130, 1003-1006), pero la sensibilidad de esa prueba es inferior a la del inmunoanálisis ligado a enzimas (ELISA) y la hibridación de ADN (Davidson et al (1986) En: *Current Research on Marek's Disease* (pp. 311-316). Tallase: Rose Printing Company, Inc).

Las muestras preferidas para el aislamiento del virus so las células de cubierta amarilla, que pueden ser co-cultivadas con cultivos de células primarios susceptibles. El ensayo inmunofluorescente (Kitamoto et al (1979). *Biken Journal*, 4, 137-142) o ELISA (Cheng et al (1984) *Avian Diseases*, 4, 900-911) se puede usar para la identificación posterior del

serotipo del MDV. Alternativamente, el serotipo puede ser identificado mediante el análisis de endonucleasa de restricción (Ross *et al* (1983). *Journal of General Virology*, 64, 2785-2790) o la reacción en cadena de polimerasa (PCR) (Wang *et al* (1993) *Molecular and Cellular Probes*, 7, 127-131. La hibridación *in situ* se ha usado para la detección del genoma del MDV en tejido infectado (Endoh *et al* (1996) *Journal of Veterinary Medical Science*, 58, 969-976; Ross *et al* (1997) *Journal of General Virology*, 78, 2191-2198), pero esta técnica es probablemente demasiado laboriosa para los diagnósticos de rutina. (Davidson *et al* (1995) *Avian Pathology*, 24, 69-94; y Davidson *et al* (1996) En: *Current research on Marek's disease. Proceedings of the 5th International Symposium on Marek's Disease* (pp. 311-316). Tallahassee: Rose Printing Company, Inc), aplicó técnicas de PCR específicas del serotipo 1 de MDV a muestras de sangre entera y de tejido tumoral de bandadas comerciales de pollo y pavo, la mayoría de las cuales tenían enfermedad neoplásica. Wang *et al* (1993) *Molecular and Cellular Sondas*, 7, 127-131; Young, P. & Gravel, J. (1996) En *Current research on Marek's disease. Proceedings of the 5th International Symposium on Marek's Disease* (pp. 308-310). Tallahassee: Rose Printing Company, Inc.; y Silva, R.F. & Witter R.L. (1996) En *Current research on Marek's disease. Proceedings of the 5th International Symposium on Marek's Disease* (pp. 308-310). Tallahassee: Rose Printing Company, Inc., aplicó un protocolo de PCR específica del serotipo 1 de MDV a varios tejidos de pollos inoculados experimentalmente con la cepa JM/102.

Handberg *et al* (2001) *Avian Pathology* 30: 243-249 describe el uso de PCR específica de serotipo 1- y serotipo 3- para la detección del MDV en pollos. Las muestras de tejido fueron tomadas de la sangre (células de cubierta amarilla), bazo, hígado, piel, extremos de plumas y ovarios.

Descripción de la Invención

La presente invención provee métodos adicionales para la detección de un virus, especialmente MDV, en muestras de tejido aviar.

En un primer aspecto la invención provee un método para la detección de un virus en una muestra de tejido aviar que comprende: extraer material genético de una muestra de tejido aviar; y probar el material genético

extraído para detectar cualquier material genético del virus; caracterizado en que la muestra de tejido aviar se deriva de una o más plumas del tracto axilar.

Usando muestras de plumas la prueba se puede realizar en animales vivos. El muestreo de plumas es simple, rápido y práctico en condiciones de campo. Las muestras de plumas se pueden colocar en un contenedor adecuado y se pueden probar inmediatamente o almacenar para futuras pruebas, según se desee. En contraste, el muestreo de sangre requiere gran cuidado para evitar la formación de coágulos de sangre, incluyendo el transporte de la sangre a condiciones frías controladas. La coagulación de sangre conduce a resultados de pruebas negativos. Las muestras de órganos internos, tales como muestras de bazo y tumores deben transportarse en hielo húmedo, lo que no es práctico a condiciones de campo.

Al seleccionar plumas del tracto axilar de las cuales se deriva una muestra de tejido, la invención provee ventajas significativas sobre los métodos conocidos que toman muestras de tejido de diferentes partes del ave.

Sorprendentemente, hemos encontrado que el virus se puede detectar en las plumas del tracto axilar en niveles más altos que en otras plumas, y por lo tanto, el virus se puede detectar en las plumas del tracto axilar según la invención cuando no se puede detectar en otras muestras de tejido, incluyendo otras plumas. En consecuencia, los métodos de la invención son particularmente adecuados para monitorear la extensión a la cual una manada de aves ha sido inmunizada efectivamente con vacuna de MDV, mediante la detección de la presencia de la cepa de vacuna en las muestras de tejido de las plumas del tracto axilar.

Por "aviario" incluimos cualquier pájaro, pero preferiblemente pájaros que se producen comercialmente, especialmente avicultura tales como pollos, pavos, patos, etc.

Por "plumas del tracto axilar" incluimos el significado de las plumas localizadas en la región de un pájaro marcado "axilarmente" en el diagrama de emplumado acompañante (Figura 1). Preferiblemente, la pluma del tracto

axilar seleccionada en una "pluma cañón", esto es, una pluma inmadura en crecimiento. El término "pluma cañón" será familiar para los expertos. Por ejemplo, van Tyne J & Berger AJ (1959) *Fundamentals of Ornithology*, John Wiley, New York se refiere a una pluma cañón como "una pluma nueva, en crecimiento, aún no totalmente desenfundada". Lucas AM & Stettenheim PR (1972) *Avian Anatomy, Integument Part 1*, US Government Printing Office, Washington, pp 199-200 observa "La nueva pluma está estrechamente desplegada dentro de una vaina mientras se forma. En la medida en que aparece sobre la piel, tiene una forma cónica larga con una punta chata y una superficie ligeramente húmeda. Una pluma en este estado en cualquier generación es usualmente llamada pluma cañón". (Ver también Figura 1(a), que es tomada de Lucas & Stettenheim (1972)).

Preferiblemente, las plumas del tracto axilar son tomadas de polluelos que son ventajosamente de menos de un mes de edad.

En una realización preferida, el método se realiza en muestras tomadas de polluelos sobre los o antes de 13 días de post-inmunización, preferiblemente entre 8 días a 12 días post-inmunización, más preferiblemente entre 9 a 11 días post-inmunización, i.e., en los días 9, 10 u 11 post-inmunización.

Preferiblemente, el método provee información cuantitativa sobre la cantidad de virus, especialmente MDV, en la muestra.

Preferiblemente, el método es específico para el serotipo 1 de MDV, y más preferiblemente el método es específico para la cepa CVI 988 Rispens de MDV-1. La última cepa es una cepa de vacuna comercial producida por Fort Dodge, IA, USA, que está disponible en el American Type culture Collection (ATCC), Mannassas, VA, USA.

Ventajosamente, el método involucra el uso de una reacción de PCR. Preferiblemente, antes que dicha reacción de PCR se lleva a cabo, el material genético extraído a ser probado es tratado con un agente para superar el efecto inhibidor de cualquier factor de tejido de pluma que pueda estar presente. Este efecto inhibidor parece estar asociado con la melanina y puede, por consiguiente, ser un problema particular cuando las plumas de aves cafées son muestreadas. Preferiblemente, el agente es seleccionado de

5 32

uno o más de albúmina de suero bovino; albúmina porcina (cerdo); y albúmina ovina (oveja).

Los expertos sabrán de un rango de métodos de detección para detectar material genético viral, especialmente MDV, que se podría usar en los métodos de la invención, tales como los métodos de Handberg *et al* (2001) *supra*. Un método particularmente preferido para detectar la cepa CVI 988 de MDV-1 es el siguiente:

- (i) proveer plantillas delantera y reversa para una polimerasa de ácido nucleico, cuyas plantillas son seleccionadas de la secuencia de nucleótido que flanquea la secuencia de nucleótido de repetición de 132 bp de MDV;
- (ii) amplificar las secuencias de ácido nucleico entre las plantillas;
- (iii) detectar el número de secuencias de repetición de 132 bp en las secuencias de ácido nucleico amplificado; y
- (iv) relacionar el número de secuencias de repetición de 132 bp con la identidad del ácido nucleico viral y de esta forma, identificar el tipo de MDV en la muestra de tejido, copias múltiples de la secuencia de repetición de 132 bp que son indicativas de la cepa CVI 988 de MDV-1.

Un método cuantitativo preferido para uso en la detección de MDV según la presente invención comprende:

- (a) proveer una secuencia de polinucleótido que es capaz de ligar específicamente a un polinucleótido objetivo específico de MDV;
- (b) contactar el material genético extraído con una sonda, de esta forma la sonda se liga específicamente a su polinucleótido MDV objetivo;

- (c) determinar si la sonda se ha ligado a su polinucleótido de MVD objetivo; y
- (d) determinar si la muestra contiene MDV con base en que la presencia del polinucleótido objetivo indica la presencia de MDV en la muestra.

El paso (d) provee preferiblemente una determinación cuantitativa de la cantidad de virus en la muestra.

Ventajosamente, el paso de determinar si la sonda se ha ligado a un polinucleótido objetivo comprende amplificar una región del polinucleótido objetivo, cuya región comprende el sitio de ligamiento de la sonda.

Preferiblemente la sonda tiene la secuencia 5' AGA CCC TGA TGA TCC GCA TTG CGA CT 3' (SEC ID No. 1).

Preferiblemente, la amplificación es emplantillada mediante las siguientes plantillas:

La plantilla delantera (GGT CTG GTG GTT TCC AGG TGA – SEC ID No. 2) que está localizada en las posiciones NT 1341-1361 en la secuencia del gen Meq de cepa GA.

La cepa GA (Georgia) fue un aislado 1964 de Georgia, a partir de un tumor de ovario. Referencia: C.S. Eidson & S.C. Schmittle (1968). Studies on acute Marek's disease. I. Characteristics of isolate GA in chickens. Avian diseases 12; 467-476.

La plantilla reversa (GCA TAG ACG ATG TGC TGC TGA – SEC ID No. 3) está localizada en las posiciones NT 1413-1393.

Ventajosamente, la sonda está marcada fluorescentemente y el paso de determinar si la sonda se ha ligado a un polinucleótido objetivo, comprende la determinación de las emisiones fluorescentes de la sonda.

Dos colorantes fluorescentes son introducidos a la proximidad física mediante conjugación directa en los extremos opuestos de una sonda oligo corta (fluorocromo reportero 5', usualmente 6-FAM, y fluorocromo neutralizador 3', usualmente TAMRA). Cuando el fluoróforo de alta energía (FAM) es excitado a 488 nm, en lugar de la emisión de fluorescencia esperada a 520 nm, la energía capturada es transferida al fluoróforo de menor energía (TAMRA) y es emitido a 580 nm (la transferencia de energía de resonancia de fluorescencia, FRET, ha ocurrido). Usando la combinación fluoresceína/rodamina reportero/neutralizador, la FRET ocurrirá efectivamente incluso cuando los grupos están separados a 25-30 bases de ADN. Durante el curso de un ensayo de TaqMan™, los dos fluoróforos están físicamente unidos entre sí mediante la acción de la 5'-nucleasa de la polimerasa de ADN Taq – después de lo cual la estimulación a 488 nm produce una emisión FAM a 520 nm.

Las sondas marcadas duales usualmente tienen un colorante 5'-reportero, tal como FAM, TET, HEX, JOE o VIC, y un grupo 3'-neutralizador, tal como TAMRA o Dabcil (un neutralizador universal).

Los marcadores fluorescentes adecuados están dentro del conocimiento general de los expertos. Los siguientes reactivos están disponibles en Sigma-Aldrich, UK: estantes HEX para hexacloro-fluoresceína; estantes para tetracloro-fluoresceína; Joe es 6-carboxi-4',5'-dicloro-2', 7'-dimetoxifluoresceína; ROX es 5-carboxi-Rodamina; dabcil es ácido 4-((4-(dimetilamino)fenil)azo)benzónico.

Las estructuras y la información adicional sobre todos estos están disponibles en el sitio web de sonda molecular www.probes.com. El colorante VIC está disponible en Applied Biosystems.

6-FAM = 6-carboxifluoresceína; (una fosforamidita); colorante amarillo-verde; absorbancia máxima = 494 nm, emisión máxima = 525 nm.

HEX = una fosforamidita; colorante rosado; absorbancia máxima = 535, emisión máxima = 556.

TET = una fosforamidita; colorante anaranjado; absorbancia máxima = 521, emisión máxima = 536.

VIC = absorbancia máxima = 538, emisión máxima = 554.

JOE = absorbancia máxima = 521, emisión máxima = 547.

TAMRA = 6-carboxi-tetrametil-rodamina; absorbancia máxima = 555, emisión máxima = 580.

Dabcil = absorbancia máxima = 453, emisión no máxima (neutralizador universal).

De la descripción anterior será aparente que un aspecto importante de los métodos de la invención es el uso de muestras de tejido aviar que son más convenientes y útiles que las muestras de tejido aviar usadas anteriormente para detectar la infección viral, especialmente MDV. En consecuencia, aspectos adicionales de la invención se relacionan con la provisión de muestras de tejido aviar.

En un segundo aspecto, la invención provee una muestra de tejido aviar aislada de una o más plumas del tracto axilar.

Por "aislado" incluimos el significado que la muestra de tejido está libre de una cantidad sustancial del material con el cual está normalmente asociada en la naturaleza. Por ejemplo, la muestra de tejido se puede almacenar en un contenedor, o puede derivarse de la pluma del tracto axilar original mediante una variedad de métodos de aislamiento; extracción y/o purificación.

Preferiblemente, la muestra de tejido aislado consiste de la porción próxima (la porción no barbada que está unida a la piel, y que contiene la pulpa – ver figuras acompañantes). En consecuencia, se prefiere que la porción próxima de la pluma del tracto axilar sea aislada de la porción distal (barbada) de la pluma. Esto se logra fácilmente cortando la porción próxima de la pluma con un par de tijeras y descartando la porción distal.

36

En un tercer aspecto la invención provee un extracto que contiene material genético de una muestra de tejido aviar, en donde el extracto es tomado de una muestra de tejido como se describió con relación al segundo aspecto de la invención.

Se apreciará que las muestras según el segundo y tercer aspectos de la invención, pueden ser recolectadas y/o preparadas en el campo, o transportadas a una ubicación separada, tal como un laboratorio, para la preparación y prueba. Así, aspectos adicionales de la invención se relacionan con muestras de acuerdo al segundo y/o tercer aspecto de la invención, almacenadas en una forma adecuada para transporte a una ubicación separada.

Las plumas podrían almacenarse completas (e.g., en tubos de plástico universal Sterilin de 20 ml), o después de cortar la porción próxima requerida para la preparación del ADN (e.g., en tubo Eppendorf de tapa de presión o tubo de tapa de tornillo de 1 ml). Alternativamente, las plumas podrían ser almacenadas en bolsas plásticas selladas al calor o ajustadas. Para almacenamiento a corto plazo (e.g., 1 semana), las plumas podrían almacenarse a 4°C, pero para períodos de almacenamiento mayores, se deben almacenar congeladas a -20°C.

El ADN se debe almacenar a -20°C en tubos Eppendorf de tapa de presión o tubo de tapa de tornillo de 5 ml o 1.5 ml, en amortiguador de Tris-EDTA o, si el ADN se usará en el análisis Taqman, en agua porque el EDTA inhibirá la reacción de Taqman.

Ventajosamente, los resultados de los métodos son proveídos en un formato inteligible. Preferiblemente, los resultados son registrados o almacenados en un portador de información. Sin embargo, el paso de proveer los resultados podría ser mediante la comunicación de los resultados oralmente.

Por "portador de información" incluimos cualquier medio de almacenamiento de información, como papel, un disco de computadora; un sistema de transferencia de información basado en la Internet; como un e-mail o página de Internet, o archivo electrónico, etc. Por supuesto, un "formato inteligible"

57

también pretende incluir información encriptada que puede ser descifrada con una llave aproximada.

Ejemplos que realizan ciertos aspectos de la invención se describirán ahora con referencia a las siguientes figuras, en las cuales:

La Figura 1 (a) muestra el desarrollo de las plumas sobre la piel, durante las primeras cuatro generaciones. Un círculo indica una pluma que aún está creciendo; un punto, una pluma que ha crecido totalmente.

La Figura 1(b) es un diagrama del patrón de emplumado en pollos, que muestra el tracto axilar.

El tracto axilar descansa sobre la parte inferior del pollo y se extiende, en cada lado, desde el cuello inferior al abdomen superior, por debajo de las alas y a lo largo de la pechuga. La Figura 1 es tomada del libro "Bird Structure: An approach through evolution development and function in the fowl". D.A. Ede, Publisher: Hutchinson Educational, 1984. El patrón de emplumado es el mismo en todas las aves.

Las figuras 2(a) a 2(d) son fotografías de las plumas del tracto axilar y acercamientos de plumas individuales que muestran porciones que son retenidas para proveer muestras de tejido de acuerdo con la invención. Las figuras 2(a) y 2(b) demuestran las plumas del tracto axilar. Las figuras 2(c) y 2(d) demuestran la parte de la pluma tomada para análisis.

Figura 3:

Muestra una respuesta de dosis de vacuna del serotipo CV1988 según se detectó mediante las plantillas Meq (producto de 78 bp) con técnica Taqman. La vacuna CV1988 se recolectó de un vector de cromosoma artificial bacteriano (BAC).

Este experimento se realizó para probar/optimizar el uso del conjunto plantilla/sonda Meq Taqman. Se usó ADN de BAC10 como el ADN objetivo porque se conoció que contiene muchas copias del genoma viral.

Se usó el ensayo de Taqman para detectar el gen *Meq* en el ADN derivado del genoma del virus Rispens clonado en un Cromosoma Artificial Bacteriano (BAC10). Se usó ADN en diluciones a 10 veces. Durante cada ciclo de PCR de tiempo real, el reportero fluorocromo FAM es liberado y es capaz de fluorescer. Por lo tanto, con cada ciclo, la intensidad de la fluorescencia aumenta. El valor Ct (el ciclo en el cual la fluorescencia pasa un umbral fijado) es una medida del inicio de número de copia de la secuencia objetivo. A menor valor de Ct, mayor es el inicio del número de copia de la secuencia objetivo. Un valor de Ct de 40 indica que no se presenta una secuencia, o se presenta una cantidad indetectable de secuencia objetivo. Esta figura muestra que las diluciones de esta preparación de ADN entre 1:10 y 1:10000 produjeron una cantidad detectable de producto de PCR de *Meq*. El valor de Ct aumenta linealmente con ADN diluido incrementalmente.

Figura 4:

Respuesta de dosis de la vacuna CIV998 en fibroblastos de embriones de pollo (CEF) y cromosomas artificiales bacteriales (BAC). Este experimento se realizó para probar/optimizar el uso del conjunto plantilla/sonda *Meq* Taqman sobre el ADN derivado de las células infectadas de Rispens-MDV.

Se usó el ensayo de Taqman para detectar el gen *Meq* en el ADN derivado de BAC10, y en el ADN derivado de las células de fibroblasto (CEF) de embrión de pollo infectadas de Rispens-MDV. Se usó ADN en diluciones a 10 veces. Esta figura muestra que tanto para el ADN de BAC10 como para el ADN de CEF Rispens-infectadas, el valor de Ct aumenta linealmente con ADN diluido incrementalmente.

Figura 5:

Respuesta de dosis de la vacuna CIV998 en bazo de pollo y CEF. Este experimento se realizó para probar/optimizar el uso del conjunto plantilla/sonda *Meq* Taqman sobre el ADN derivado de las muestras de tejido de pollos infectados de Rispens-MDV.

Se usó el ensayo de Taqman para detectar el gen *Meq* en el ADN de un bazo de un polluelo inoculado Rispens (11 dpi), y un polluelo no inoculado de la misma edad. El ADN de las células Rispens-CEF infectadas se usó

como un control positivo. El ADN se usó en diluciones a 10 veces de patrones de mg/ml y se usó 1 μ l por reacción. Aunque los valores de Ct para el ADN de bazo no inoculado fueron menores de 40, claramente no aumentaron con concentraciones en aumento de ADN. Sin embargo, la detección de *Meq* en el ADN de bazo inoculado aumentó significativamente por encima de la línea de base cuando se usó ADN puro, o a una dilución 1:10. Así, establecimos que, para el análisis de ADN tomado de las muestras de tejido de polluelos inoculados de MDV, usaríamos 1 μ l de ADN de un patrón de 1 mg/ml (ie., 1 μ g) de ADN por reacción.

Figura 6:

Tiempo-curso de replicación de la vacuna CVI988 en plumas de pollo que demuestra la replicación pico a los 15-20 días post infección. Este experimento se realizó para seguir el tiempo-curso de la infección de MDV Rispens en tractos axilares de pluma de polluelos inoculados mediante el ensayo de Taqman.

El ensayo de Taqman se usó para detectar el gen *Meq* en el ADN preparado a partir de puntas de plumas de polluelos a 0 (inoculado), 10, 15, 20 y 28 dpi post inoculación con Rispens. Se muestreó un grupo de cinco polluelos en cada tiempo-punto (cuatro polluelos a 0 dpi). Se usó 1 μ g de ADN en el ensayo de Taqman. Los valores medios de Ct para cada grupo son graficados. Los valores de Ct disminuyen de 0-15 dpi, luego aumentan de nuevo de 20-28 dpi, mostrando un pico de infección de 15-20 dpi.

Figura 7:

Este experimento se realizó para seguir el tiempo-curso de infección Rispens-MDV en tractos axilares de pluma de polluelos inoculados por PCR de repetición de 132 bp.

El ADN fue preparado a partir de puntas de plumas de polluelos inoculados de Rispens a 0 (inoculado), 10, 15, 20 y 28 dpi. Se muestreó un grupo de cinco polluelos en cada tiempo-punto (cuatro polluelos a 0 dpi). Se usó 1 μ g

de ADN en la PCR (incluyendo 10 μ g de BSA por reacción) y las muestras corrieron en un gel de agarosa al 1% que contiene bromuro de etidio.

(M) = marcadores de tamaño molecular Lambda, (-) = agua (control negativo), (+) = ADN Rispens BAC10 (control positivo). Los días post infección están indicados por debajo de los geles.

(a) Para confirmar la calidad de PCR y la cantidad de cada muestra de ADN, se realizó la PCR para detectar una secuencia de retrovirus endógeno presente en todas las células de pollo. El producto de retrovirus endógeno de 360 bp se detectó en todas las otras muestras de pluma que confirmaron la calidad de PCR de cada una de las muestras.

(b) Se realizó la PCR de repetición de 132 bp. La pista marcada (+) muestra los productos de PCR de escalera de repetición de 132 bp obtenidos con Rispens BAC10 – se distinguen claramente seis copias. El control negativo no muestra productos de PCR, como lo hacen tres de los cuatro polluelos inoculados. El cuarto polluelo inoculado muestra una banda de producto tenue equivalente a 2 copias de la repetición, que indica que el polluelo fue infectado por contacto por los polluelos inoculados albergados en la misma habitación. Todos los polluelos inoculados fueron repetidos a 132 bp a 11, 15, 20 y 28 dpi. El producto de PCR que representa un cierto número de copia de repetición predominó en muchos casos, y el número de copias representado por este producto predominante varió entre muestras. Esto indica que los sub- clones del virus inóculo, con un conjunto de número de repeticiones, se volvió predominante en diferentes polluelos.

Figura 8:

Gráfica muestra una curva estándar para la reacción de gen Meq usando ADN Rispens BAC10.

Figura 9:

Gráfica que muestra una comparación de carga de virus Rispens en diferentes tractos de plumas de polluelos individuales en (A) 8, (B) 13, (C) 19 y (D) 26 días post vacuna.

Figura 10:

Gráfica que muestra la carga de virus Rispens en diferentes tractos de pluma determinados mediante PCR de tiempo real para el gen *Meq* graficado como (A) en una escala logarítmica y (B) en una escala lineal. Los valores medios (+SEM) para cuatro polluelos vacunados.

EJEMPLO 1: Ensayo de PCR cuantitativo para MDV-1

La PCR cuantitativa de Taqman™ es una técnica establecida usada para cuantificar la cantidad de PCR objetivo de inicio mediante la determinación del número de ciclos de PCR requeridos para alcanzar el umbral de fluorescencia (definido matemáticamente por el valor Ct). Un mayor número de copia de secuencia objetivo en la muestra requiere más pocos ciclos de PCR para alcanzar el umbral de Ct.

Las plantillas y sondas de Tqman fueron diseñadas a partir de la secuencia del gen *Meq* de la cepa GA de MDV (ver más adelante). Esta secuencia está publicada en: Jones D, Lee L, Liu JL, Kung HJ, Tillotson JK. El virus de la enfermedad de Marek codifica un gen de cierre zipper básico de leucina que reensambla los oncogenos fos/jun que están altamente expresados en los tumores linfoblastoides. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992 Mayo 1; 89(9):4042-6. El No. de acceso de secuencia es: M89471 (SEC ID No. 9). Se usó el software "Primer Express" de Applied BioSystems para seleccionar las secuencias de plantilla/sonda óptimas a partir de la secuencia *Meq*.

Las plantillas específicas usadas en este análisis multiplican a 73 bp la secuencia en el gen *meq* del virus de MDV del serotipo 1. Esta región es común tanto para cepas de vacuna como aislados en campo.

Los experimentos describieron el uso de la vacuna CVI 988 como un ejemplo del virus de la enfermedad de Marek del serotipo 1. Los resultados se pueden aplicar a todos los virus de Marek del serotipo 1 porque se conserva el área de la secuencia en que las plantillas están dirigidas en contra, en los virus MDV del serotipo 1.

Protocolo para el análisis de PCR del gen Meq de Taqman™ en muestras de extremos de pluma.

1. Materiales requeridos:

Reactivos:

- Amortiguador TNE (almacenado a temperatura ambiente) contiene Tris (10 mM), NaCl (150 mM), EDTA (1 mM) y el pH es ajustado a pH 7.5 usando HCl.
- Solución al 10% de Dodecil sulfato de sodio (SDS) (almacenada a temperatura ambiente)
- Proteinasa K (polvo liofilizado de Sigma #P-6556, y prepare un patrón de 20 mg/ml en agua, almacenada a -20°C.
- Fenol pH 7.9 obtenido en Sigma (No. de catálogo P-4557) almacenado a 4°C).
- Cloroformo (almacenado a -20°C)
- Acetato de Sodio 3M pH 5.2 (almacenado a temperatura ambiente)
- Etanol puro filtrado (almacenado a temperatura ambiente)
- Etanol frío al 70% filtrado (almacenado a 4°C)
- Agua de calidad PCR

- Agua de calidad PCR que contiene 800 µg/ml de Albúmina de suero Bovino (BSA), filtrada
- Hielo
- Reactivos de núcleo de PCR Taqman™ – amortiguador de Taqman™, MgCl₂, dNTPs, polimerasa Taq, Uracil N-glicosilasa (Perkin Elmer Biosystems)

Plantilla delantera de Meq 5' GGT CTG GTG GTT TCC AGG TGA 3'
(SEC ID No. 2) (MGW Biotech)

Plantilla reversa de Meq 5' GCA TAG ACG ATG TGC TGC TGA 3' (SEC
ID No. 3) (MGW Biotech)

Sonda de Meq 5' FAM AGA CCC TGA TGA TGG GCA TTG CGA CT 3'
(SEC ID No. 1) TAMRA (Sigma-Genosys Ltd)

(FAM & TAMRA son las etiquetas fluorescentes)

6-FAM = 6-carboxifluoresceína; (una fosforamidita); colorante amarillo-verde; absorbancia máxima = 494 nm, emisión máxima = 525 nm.

TAMRA = 6-carboxi-tetrametil-rodamina; absorbancia máxima = 555, emisión máxima = 580.

Las sondas marcadas 5'-FAM-3'-TAMRA están disponibles en: Sigma-Genosys Ltd. (London Road, Pampisford, Cambridgeshire, CB2, 4EF, UK, Tel. 01223839200).

Las sondas marcadas 5'-VIC-3'-TAMRA están disponibles en: Applied Biosystems Ltd. (Kelvin Close, Birchwood Science Park North, Warrington, Cheshire, WA3 7BP)

Otros proveedores son:

- Integrated DNA Technologies (IDT) 1710 Commercial Park, Coralville, IA, 52241, USA.
- Oswell Research Products Ltd.: Lab 5005, Medical and Biological Sciences Building, University of Southampton, Boldrewood, Bassett Crescent East, South Hampton, SO16 7PX, Tel: 02380 592984

Equipo

- Tubos universales de plástico de 20 ml Sterilin
- Tijeras & fórceps limpios
- Baño de agua ajustado a 50°C
- Micro centrífuga
- Tubos Eppendorf de tapa de presión snap cap de 1.5 ml (puestos en autoclave)
- Tubos Eppendorf screw cap de 1.5 ml (puestos en autoclave)
- Tubos Eppendorf snap cap de 0.5 ml (puestos en autoclave)
- congelador al vacío (no esencial)
- Espectrofotómetro
- Gabinete de PCR dedicado, pipetas y puntas selladas
- Placa de PCR de 96 agujeros Thermo-fast y tapas (Perkin Elmer/Applied Biosystems)
- Detector de Secuencia ABI Prism 7700 (Perkin Elmer/Applied Biosystems)

2. Recolección de las plumas:

- Desplume de 8-10 plumas "cañón" (plumas nuevas en crecimiento, cortas con la totalidad de la pulpa) del trato de pluma branquial de cada pollo (ver figuras).
- Coloque las plumas en un tubo "universal" de plástico para transportarlas de vuelta al laboratorio.

3. Preparación del ADN de las puntas de la pluma:

- Corte y guarde 1 cm próximo de la pluma (i.e., la parte no barbada que está unida a la piel y que contiene la pulpa – ver fotografías). Descarte la parte distal barbada de la pluma.
- Para cada pollo, coloque de 8-10 extremos de plumas guardadas, en un tubo Eppendorf de tapa de presión de 1.5 ml.
- Adicione 500 μ l de amortiguador de muestra de proteinasa K (amortiguador TNE que contiene SDS al 0.5%) que contiene 100 μ g de proteinasa K (adicione la proteinasa justo antes de uso).
- Incube a 50°C en un baño de agua por 1.5-2 horas
- Microcentrifugue los tubos (6000 rpm, 10 min) para "pelletizar" los extremos de las plumas & desechos.
- Transfiera los sobrenadantes a un nuevo tubo de tapa de presión (si las plumas eran de pájaros cafés, los sobrenadantes serán cafés debido a la presencia de melanina).
- Adicione un volumen igual (500 μ l) de fenol al sobrenadante de nuevo.
- Vorticee
- Centrifugue a 13000 rpm, 2 min.
- Transfiera la fase superior (acuosa) a un nuevo tubo de tapa de presión.
- Adicione un volumen igual (500 μ l) de fenol al sobrenadante de nuevo.
- Vorticee.
- Centrifugue a 13000 rpm, 2 min.

- Transfiera la fase superior (acuosa) a un nuevo tubo de tapa de presión.
- Adicione un volumen igual (500 μ l) de cloroformo frío.
- Vorticee
- Centrifugue a 13000 rpm, 2 min.
- Transfiera la fase superior a un tubo de tapa de atomillar de 1.5 ml.
- Adicione 1 ml de etanol al 100% filtrado.
- Adicione 50 μ l de Acetato de Sodio 3M.
- Mezcle cuidadosamente invirtiendo el tubo, y déjelo a temperatura ambiente por 20 minutos (el ADN se volverá visible en la medida en que se precipita).
- Centrifugue a 13000 rpm, 2 minutos, para peletizar el ADN (si se usaron pollos blancos, el pelet será blanco; si se usaron pollos cafés, pelets café).
- Descarte el sobrenadante.
- Enjuague el pelet dos veces con 500 μ l de etanol frío al 70%, para correr cuidadosamente el etanol hacia abajo del tubo, luego vierta (tenga cuidado de no remover el pelet de ADN).
- Cubra el extremo abierto del tubo con Parafilm, y haga varios huecos de punción en la Parafilm usando una aguja.
- Coloque los tubos en un secador al vacío por aproximadamente 5 minutos para secar el pelet (alternativamente seque con aire).

Re-suspenda el pelet en 50 μ l de agua de calidad PCR mediante vorticeado cuidadosamente.

Determine la concentración de la preparación de ADN usando un espectrofotómetro.

Ajuste la concentración a 1 mg/ml en agua.

Almacene a -20°C.

4. Ensayo de PCR cuantitativo TaqMan™ (Perkin Elmer Biosystems)

- Ajuste las reacciones en un gabinete dedicado de PCR, usando pipetas dedicadas de PCR y puntas selladas.
- Trabaje en hielo.
- Prepare una mezcla master que contiene los siguientes reactivos para el número apropiado de muestras – ajuste reacciones duplicadas para cada muestra (volúmenes dados por reacción):

Componente	Volumen por 25 µl de reacción	Concentración Final
Amortiguador Taqman	2.5 µl	
MgCl ₂ (5mM)	5.0 µl	1.0 mM
dATP (10 mM)	0.5 µl	0.2 mM
dCTP (10 mM)	0.5 µl	0.2 mM
dGTP (10 mM)	0.5 µl	0.2 mM
dUTP (10 mM)	0.5 µl	0.2 mM
Agua que contiene 800 µg/ml de BSA	11.6 µl	~1.0 µg BSA/reacción
Sonda de Meq (10 µM)	0.5 µl	0.2 µM
Plantilla Delantera de Meq (10 µM)	1.0 µl	0.4 µM
Plantilla reversa de Meq (10 µM)	1.0 µl	0.4 µM
Pol de ADN Gold Taq (5U/µl)	0.13 µl	26 U/ml
Uracil N-glicosilasa (1U/µl)	0.25	10 U/ml

- Vorticee para asegurar completo mezclado.
- Coloque una placa de PCR Thermo-fast en un sujetador de placa sobre hielo, y adicione 24 μ l de mezcla master a cada agujero a ser usado.
- Adicione 1 μ l de agua puesta en autoclave, a agujeros de control sin patrón (NTC) y cubra estos agujeros antes de abrir cualquier muestra de ADN.
- Adicione 1 μ l de ADN de control positivo (= 1 μ l de 1 mg/ml de preparación), e.g., ADN de CEF infectadas de *Rispena* a los agujeros adecuados y cubra estos agujeros.
- Adicione 1 μ l de muestra de ADN (= 1 μ l de 1 mg/ml de preparación) a los agujeros apropiados y cubra.
- Brevemente púlse la placa en la centrífuga.
- Coloque la placa en el Detector de Secuencia ABI Prism 7700 (Applied Biosystems) y ajusta la computadora para leer la fluorescencia FAM (sonda de Meq), corra las muestras.
- **Parámetros de Termociclado**

50°C	2 min
95°C	10 min
94°C	15 sec) x 40
60°C	1 min)
- Analice los datos usando Microsoft Excel – para cada muestra habrá un valor de Ct (el ciclo de PCR en el cual la cantidad de producto fluorescente es detectada primero sobre el nivel de línea de base); calcule el valor de Ct medio para duplicados de cada muestra de ADN.

Los resultados del experimento anterior se muestran en la Figura 6.

Notas

La plantilla delantera (GGT CTG GTG GT CC AGG TGA – SEC ID No. 2) está localizada en las posiciones NT 1341-1361 en la secuencia del gen Meq de la cepa GA. La plantilla reversa (GCA TAG ACG ATG TGC TGC TGA – SEC ID No. 3) está localizada en las posiciones NT 1413-1393. La sonda se diseñó para cocerse específicamente entre las dos plantillas sobre la secuencia objetiva de Meq (Ver Figura 8).

Durante la PCR, la sonda fluorogénica se liga entre las dos plantillas, y durante cada ciclo de extensión, la actividad de nucleasa 5' de la polimerasa Taq cliva la sonda, liberando el FAM fluorocromo reportero que es luego capaz de fluorescer. Por lo tanto, con cada ciclo, la intensidad de fluorescencia aumenta. El valor de Ct (el ciclo en el cual la fluorescencia pasa un umbral fijado) es una medida del número de copia de partida de la secuencia objetivo; a mayor número de copia de partida, menor valor de Ct.

Uso de Albúmina de Suero Bovino durante la PCR: los tejidos de pluma (especialmente los de pollos cafés) contienen melanina, que se ha mostrado que es inhibidora de la PCR. El uso de BSA en la reacción supera esta inhibición inducida por melanina. Los experimentos se realizaron en pollos cafés. La adición de BSA siguió el método de Giambernardi *et al* (1998) *Biotechniques* 25: 564-6.

EJEMPLO 2: Método para detectar la cepa MDV-1 específica (vacuna CVI 988)

Este ejemplo de la invención está relacionado con el uso de una versión especialmente modificada de la prueba de reacción en cadena de polimerasa (PCR) de repetición de par de base (bp) 132 para detectar la presencia de la vacuna de CVI 988 de Marek en plumas de pollos.

La secuencia genética de repetición de par de base 132 está localizada en el segmento (IR₁) de longitud de repetición interna del genoma del virus de la enfermedad de Marek (serotipo 1). La secuencia genómica completa de MDV1 está descrita en Tulman *et al.* (Sept. 2000) *J Virol*. Vol. 74 No. 17, p7980-7988 y se ha depositado en el GenBank bajo el No. de acceso AF 243438. Los aislados de CVI 988 (cepas de vacuna) de la enfermedad de Marek del serotipo 1 tiene múltiples copias de este segmento repetido, mientras que las cepas de campo tienen copias simples (Silva *et al* (1992) *Avian Dis* 36: 521-528; y Becker *et al* (1993) *Virus Genes* 7 : 277-287). La medida del número de copias produce la posibilidad de diferenciar las cepas de vacuna de las cepas de campo. (Becker *et al* (1992) *J Virol Methods* 40 : 307-322 y Kopacek *et al* (1993) *Acta Virol* 37 : 191-195.

Las plumas son muestreadas según las figuras adjuntas, se usan las puntas próximas de las plumas del tracto axilar. El análisis de PCR (ver más adelante) demostró copias múltiples del segmento de 132 bp en animales entre 11 y 28 días post vacuna. La vacuna se realizó en aves de un día de edad.

Una variación aceptable de la prueba es usar plumas de aves de cualquier edad ya sea tomadas como muestras frescas, o almacenadas para prueba en una fecha después para determinar la presencia de la vacuna CIV988.

Protocolo para PCR de repetición de 132 bp en muestras de extremos de pluma

1. 1. Materiales requeridos:

Reactivos:

- Amortiguador TNE (almacenado a temperatura ambiente) contiene Tris (10 mM), NaCl (150 mM), EDTA (1 mM) y el pH es ajustado a pH 7.5 usando HCl.
- Solución al 10% de Dodecil sulfato de sodio (SDS) (almacenada a temperatura ambiente)

51

- **Proteínasa K** (polvo liofilizado de Sigma #P-6556, y prepare un patrón de 20 mg/ml en agua, almacenada a -20°C).
- **Fenol pH 7.9** obtenido en Sigma (No. de catálogo P-4557) almacenado a 4°C).
- **Cloroformo** (almacenado a -20°C)
- **Acetato de Sodio 3M pH 5.2** (almacenado a temperatura ambiente)
- **Etanol puro filtrado** (almacenado a temperatura ambiente)
- **Etanol frío al 70% filtrado** (almacenado a 4°C)
- **Agua de calidad PCR**
- **Agua de calidad PCR que contiene 800 µg/ml de Albúmina de suero Bovino (BSA), filtrada**
- **Polimerasa de ADN gold Taq (5 U/µg), amortiguador de Taq, MgCl₂ (25 mM)** de Bio/Gene Ltd, Kimbolton, Cambridgeshire, England.
- **dATP, dTTP, dCTP, dGTP (patrones 100mM)** obtenidas de Promega (USA); preparamos una mezcla que contiene los cuatro de estos a 10 mM cada uno, almacenados a -20°C.
- **Marcadores de tamaño molecular de ADN**
- **Agarosa y Amortiguador TBE**
- **Secuencias de Plantilla:**

MD-132 PARA; 5' TACTTCCTATATAGATTGAGACGT-3' (SEC ID No. 4)

MD-132 PARA; 5'GAGATCCTCGTAAGGTGTAAATA-3' (SEC ID No. 5)

51

Equipo

- Tubos universales de plástico de 20 ml Sterilin
- Tijeras & fórceps limpios
- Baño de agua ajustado a 50°C
- Micro centrífuga
- Tubos Eppendorf de tapa de presión snap cap de 1.5 ml (puestos en autoclave)
- Tubos Eppendorf screw cap de 1.5 ml (puestos en autoclave)
- Tubos Eppendorf snap cap de 0.5 ml (puestos en autoclave)
- congelador al vacío (no esencial)
- Espectrofotómetro
- Gabinete de PCR dedicado, pipetas y puntas selladas
- Ciclador térmico
- Aparato de gel de agarosa

2. Recolección de las plumas:

- Desplume de 8-10 plumas "cañon" (plumas nuevas en crecimiento, cortas con la totalidad de la pulpa) del trato de pluma branquial de cada pollo (ver figuras).
- Coloque las plumas en un tubo "universal" de plástico para transportarlas de vuelta al laboratorio.

3. Preparación del ADN de las puntas de la pluma:

- Corte y guarde 1 cm próximo de la pluma (i.e., la parte no barbada que está unida a la piel y que contiene la pulpa – ver fotografías). Descarte la parte distal barbada de la pluma.
- Para cada pollo, coloque de 8-10 extremos de plumas guardadas, en un tubo Eppendorf de tapa de presión de 1.5 ml.

- Adicione 500 μ l de amortiguador de muestra de proteinasa K (amortiguador TNE que contiene SDS al 0.5%) que contiene 100 μ g de proteinasa K (adicione la proteinasa justo antes de uso).
- Incube a 50°C en un baño de agua por 1.5-2 horas
- Microcentrifugue los tubos (6000 rpm, 10 min) para "peletizar" los extremos de las plumas y desechos.
- Transfiera el sobrenadante a un nuevo tubo de tapa de presión (si las plumas eran de pájaros cafés, los sobrenadantes serán cafés debido a la presencia de melanina).
- Adicione un volumen igual (500 μ l) de fenol al sobrenadante.
- Vorticee
- Centrifugue a 13000 rpm, 2 min.
- Transfiera la fase superior (acuosa) a un nuevo tubo de tapa de presión.
- Adicione un volumen igual (500 μ l) de fenol al sobrenadante de nuevo.
- Vorticee.
- Centrifugue a 13000 rpm, 2 min.
- Transfiera la fase superior (acuosa) a un nuevo tubo de tapa de presión.
- Adicione un volumen igual (500 μ l) de cloroformo frío.
- Vorticee
- Centrifugue a 13000 rpm, 2 min.
- Transfiera la fase superior a un tubo de tapa de atomillar de 1.5 ml.

- **Adicione 1 ml de etanol al 100% filtrado.**
- **Adicione 50 μ l de Acetato de Sodio 3M.**
- **Mezcle cuidadosamente invirtiendo el tubo, y déjelo a temperatura ambiente por 20 minutos (el ADN se volverá visible en la medida en que se precipita).**
- **Centrifugue a 13000 rpm, 2 minutos, para peletizar el ADN (si se usaron pollos blancos, el pelet será blanco; si se usaron pollos cafés, pelets café).**
- **Descarte el sobrenadante.**
- **Enjuague el pelet dos veces con 500 μ l de etanol frío al 70%, para correr cuidadosamente el etanol hacia abajo del tubo, luego vierta (tenga cuidado de no remover el pelet de ADN).**
- **Cubra el extremo abierto del tubo con Parafilm, y haga varios huecos de punción en la Parafilm usando una aguja.**
- **Coloque los tubos en un secador al vacío por aproximadamente 5 minutos para secar el pelet (alternativamente seque con aire).**
- **Re-suspenda el pelet en 50 μ l de agua de calidad PCR mediante vorticeado cuidadoso.**
- **Determine la concentración de la preparación de ADN usando un espectrofotómetro.**
- **Ajuste la concentración a 1 mg/ml en agua.**
- **Almacene a -20°C.**

4. PCR de repetición de 132 bp:

- Ajuste las reacciones en hielo, en tubos Eppendorf de 0.5 ml, en un gabinete dedicado de PCR, usando pipetas dedicadas de PCR y puntas puestas en autoclave.
- Prepare una mezcla master que contiene los siguientes reactivos para el número apropiado de muestras (volúmenes dados por reacción):

Componente	Volumen por 20 μ l de reacción	Concentración Final
Plantilla delantera (10 μ M)	1.0 μ l	0.5 μ M
Plantilla reversa (10 μ M)	1.0 μ l	0.5 μ M
Amortiguador Taq x 10	2.0 μ l	
MgCl ₂ (25mM)	1.6 μ l	2 mM
Mezcla DNTP (10 mM)	0.5 μ l	0.25 mM
Polimerasa de ADN gold taq	0.1 μ l	25 unidades/ml
Agua que contiene 800 μ g/ml de BSA*	12.8 μ l	~1.0 μ g BSA/reacción

- Vorticee para asegurar completo mezclado.
- Obtenga alícuotas de 19 μ l de "mezcla master" en tubos Eppendorf de tapa de presión de 0.5 ml autoclavados.
- Adicione 1 μ g de ADN (= 1 μ l de 1 mg/ml de preparación, o un volumen mayor si la preparación de ADN es menos concentrada).
- Vorticee para asegurar completo mezclado.
- (Nuestro ciclador térmico tiene una tapa calentada, de forma que no necesitamos recubrir las reacciones con aceite mineral).

- Córralo en un ciclador térmico usando los siguientes parámetros de ciclado:

95°C	2 min	1 ciclo
95°C	1 min)	
50°C	30 sec)	x 40 ciclos
72°C	1 min)	
72°C	10 min	1 ciclo

- Analice los productos de reacción en un gel de agarosa.

Los resultados del experimento anterior se muestran en la Figura 7.

Notas

La plantilla en el sentido está localizada a 65 bp aguas arriba de la repetición, y la plantilla en el sentido contrario está localizada a 105 bp aguas abajo de la repetición. El tamaño de banda esperado es, por lo tanto, de 302 bp para una repetición simple (i.e., 65 + 132 + 105), 434 bp para una repetición doble (302 + 132) y 566 bp para una repetición simple (434 + 132), etc. La cepa de vacuna de Rispens produce muchas repeticiones tándem,

EJEMPLO 3 – Detección del genoma del virus Rispens en el ADN del extremo de pluma usando PCR: comparación de muestras de diferentes tractos de pluma.

Métodos

Muestreo de plumas de los pollos vacunados de Rispens

Pollos rojos de Rhode Island de dos semanas de edad fueron inoculados con 1000 pfu de virus de vacuna de Fort Dodge Rispens por ruta intra-peritoneal. Pollos de la misma edad, no vacunados fueron albergados en una habitación separada. A todos los pollos se les anillaron las alas en

ambos lados para permitir la identificación de pollos individuales a lo largo del experimento. A los 8, 13, 19 y 26 días post vacunación, se muestrearon cinco pollos vacunados (#921, #923, #924, #925) y un pollo no vacunado (#926). Aproximadamente seis plumas cañón fueron desplumadas de cada uno de los trectos Cervical, Humeral, Espinal, Axilar y Femoral. Los otros cinco trectos restantes tampoco se usaron porque el número de plumas era muy pequeño para permitir el muestreo en cuatro ocasiones, o porque no se consideró válido desplumar de regiones delicadas sobre la piel de pollos vivos.

Se preparó el ADN de los extremos de las plumas y se sometió a PCR de tiempo real para detectar el gen *Meq* del virus como se resume a continuación.

Preparación del ADN de las muestras de extremos de plumas.

El ADN se preparó de los extremos de las plumas como se describió anteriormente. Brevemente, los extremos de pluma fueron incubados a 50°C por 2 horas en 500 µl de amortiguador TNE-SDS que contiene 100 µg de proteína K. El sobrenadante se extrajo con fenol, luego con cloroformo enfriado con hielo. El ADN fue precipitado usando etanol/acetato de sodio, pelletizado, secado al vacío, luego re-suspendido hasta una concentración de 200 µg/ml en agua.

Ensayo de PCR de tiempo real (TaqMan) para detectar el gen *Meq*

Se ajustaron reacciones dúplex de 25 µl como se describió anteriormente, usando polimerasa de ADN gold Taq y plantillas para amplificar el gen *Meq* viral y el gen huésped Ovotransferina (*Ovo*) (Tabla 1), de 200 ng de ADN de extremo de pluma. La BSA estaba presente a una concentración de 10 µg por reacción. La cinética de reacción se siguió mediante la inclusión de una sonda de *Meq* marcada con FAM-fluorescente y una sonda de *Ovo* marcada con VIC-fluorescente (Tabla 1). Hubo reacciones duplicadas para cada muestra. Los parámetros de termociclado fueron: 1 ciclo de 50°C (2 min), 1 ciclo de 95°C (10 min), seguido de 40 ciclos de 94°C (15 sec) y 60°C (1 min). Ad más de las muestras de pluma en prueba, la placa de reacción también

incluía diluciones a 10 veces de AND BAC10 de Rispens (el genoma del virus Rispens clonado en un Cromosoma Artificial Bacteriano), que contiene un número calculado de copias del genoma de Rispens.

Los datos fueron analizados usando Microsoft Excel. Para cada reacción, el valor Ct (el ciclo de PCR en el cual la cantidad de producto fluorescente es detectada primero sobre el nivel de línea de base), y de allí se obtuvo el valor Ct-40. Un valor Ct de 40 indica que no estuvo presente la secuencia objetivo. Los valores son presentados como "Ct - 40" de forma que un valor mayor equivale a más copias del genoma viral.

Para las muestras de BAC10 Rispens, el valor Ct-40 fue graficada contra el número de copias de genoma del virus (escala log), para producir una curva estándar. Se determinó la ecuación de la porción lineal de la gráfica. Para las muestras de pluma bajo prueba, los valores de Ct-40 fueron "normalizados" de acuerdo con el valor Ct-40 para Ovo (un "gen doméstico" presente en todas las células de pollo), para corregir las ligeras diferencias en la cantidad de ADN usado para cada muestra. Luego se determinó el valor medio, normalizado de Ct-40 para reacciones duplicado y se convirtió al número de copia del genoma Rispens usando la curva estándar.

Tabla 1: Plantillas y sondas usadas en PCR convencional y de tiempo real

Secuencia Objetivo	Nombre de Plantilla	Secuencia de plantilla (5' - 3')	Ubicación de Plantilla	Tamaño de Amplificación
Gen Meq de MDV-1 (con base en la secuencia GA)	Delantera de Meq	GGTCTGGTGGTTTCCAGGTGA (SEC ID No. 2)	1341-1381	73 bp
	Reversa de Meq	GCATAGAGACGATGTGCTGCTG A (SEC ID No. 3)	1413-1393	
	Sonda de Meq	AGACCCTGATGATCCGCATTGC GACT (marcador 5' FAM, marcador 3'TAMRA) (SEC ID No. 1)	1388-1391	

Gen rin ovotrans- ferencia (Ovo)	Delantera de Ovo	CACTGCCACTGGCTCTGT (SEC ID No. 6)	4517-1535	
	Reversa de Ovo	GCAATGGCAATAAACCTCCAA (SEC ID No. 7)	4567-4567	
	Sonda de ovo	AGTCTGGAGAAGTCTGTGCAGC CTCCA (marcador 5' VIC, marcador 3'TAMRA) (SEC ID No. 8)	4537- 44584	

Resultados

Muestreo de plumas y preparación de ADN

Aunque inicialmente se planeó muestrear cada uno de los diez tractos de pluma, solo fue practicable usar los tractos Cervical, Humeral, Espinal, Axilar y Femoral. Los cinco tractos restantes no se pudieron usar ya sea porque el número de plumas era muy poco para permitir muestreo en cuatro ocasiones, o porque no se consideró válido desplumar de regiones delicadas de la piel de pollos vivos. Se obtuvieron suficientes plumas cañón de cada tracto a los 8, 13 y 19 días post vacunación. Hacia el día 26 (cuando los pollos eran de casi 6 semanas de edad), las plumas cañón empezaron a ser reemplazadas por plumas maduras, más duras. Se obtuvo suficiente ADN de todas las muestras, sin diferencias marcadas entre la cantidad de ADN obtenido del mismo número de plumas de tractos diferentes. Con el fin que los valores Ct de Meq y Ovo estuvieran en el rango lineal de detección para la PCR de tiempo real, se encontró necesario diluir los ADNs hasta una concentración de 200 ng/ μ l, y usar 1 μ g de este patrón para las reacciones de PCR de tiempo real.

Para hacer posible una comparación precisa de carga de virus e diferentes puntos de tiempo, en diferentes tractos de pluma, y en diferentes pollos, se realizó la PCR cuantitativa de tiempo real.

Para cada reacción se calculó el valor Ct-40. Para las muestras de BAC10 Rispen, el valor Ct-40 fue graficado contra el número de copias del genoma del virus (escala log), para producir una curva estándar (Figura 8). El límite inferior de la detección precisa fue de 50 copias, así, cualquier muestra con

un valor Ct-40 de 0 contiene menos de 50 copias del genoma Rispens por 200 ng de ADN de extremo de pluma.

La ecuación para la porción lineal de la gráfica fue: $y = 1.802 \ln(X) - 6.796$. Para cada una de las muestras de pluma en estudio, los valores Ct-40 normalizados, medios fueron convertidos al número de copia del genoma Rispens usando esta ecuación (ver Tablas 2A, B, C y D); Figura 9 A, B, C y D). Como se esperaba, hubo una variación considerable entre los pollos individuales en cualquier punto de tiempo dado. Sin embargo, los niveles de virus detectados en los cinco diferentes tractos de pluma de un individuo dado fueron similares. En cada polluelo pollo, de los cuatro puntos de tiempo probados, la carga de virus más alta fue a los 13 días, disminuyendo a los días 19 y 26.

Tabla 2A: Número de copia de Rispens MDV (8 días)

8 días post vacunación					
# pollo & tracto de pluma	Copias del genoma Rispens MDV / 200 ng de AND de pluma				
	Humeral	Espinal	Femoral	Cervical	Axilar
# 921	673	537	2630	442	778
# 923	1504	4890	5127	5921	6101
# 924	112910	61242	258345	31425	62444
# 925	2603	1265	2010	1883	1583
Media	29422	16983	67028	9918	17726
Desv Std.	55664	29567	127552	14524	29904
Media SE	27832	14784	63776	7262	14952

61

Tabla 2B: Número de copia de Rispens MDV (13 días)

13 días post vacunación					
# pollo & tracto de pluma	Copias del genoma Rispens MDV / 200 ng de AND de pluma				
	Humeral	Espinal	femoral	Cervical	Axilar
# 921	2133045	2564484	2432204	1224616	2511886
# 923	3814060	4374639	5998652	3561896	38349181
# 924	24768376	876846	4241591	24073508	24711780
# 925	866276	4478465	1557400	1856729	485447
Media	7895439	3073559	3557462	7679187	16514568
Desv Std.	11313237	1708035	1974326	10974035	18229569
Media SE	5656619	854018	981763	5487018	9114785

Tabla 2C: Número de copia de Rispens MDV (19 días)

19 días post vacunación					
# pollo & tracto de pluma	Copias del genoma Rispens MDV / 200 ng de AND de pluma				
	Humeral	Espinal	femoral	Cervical	Axilar
# 921	353997	613762	1158777	736207	439542
# 923	1040917	1428067	1061134	1029830	1335442
# 924	3108135	891103	256243	1584386	391520
# 925	2958332	9800358	1469708	3373701	705109
Media	1865345	3183073	986466	1681031	967878
Desv Std.	1378768	4424421	517048	1181980	655758
Media SE	689384	2212211	258524	590990	327879

64

Tabla 2D: Número de copia de Rispens MDV (26 días)

# pollo & tracto de pluma	26 días post vacunación				
	Copias del genoma Rispens MDV / 200 ng de AND de pluma				
	Humeral	Espinal	femoral	Cervical	Axilar
# 921	295801	193642	167109	74645	95940
# 923	921896	694141	541176	976157	589305
# 924	771634	615826	349598	343195	104585
# 925	353768	926750	511690	251692	236766
Media	585775	607590	392393	411422	251649
Desv Std.	308455	305928	172194	392646	221359
Media SE	154228	152964	86097	196323	110680

Para los cuatro polluelos vacunados, el número medio de copia de genoma (por 200 ng de ADN de pluma) se determinó para cada tracto de pluma en cada punto de tiempo, y se graficó contra el tiempo post vacunación usando, ya sea una escala logarítmica (Figura 5) o una escala lineal (Figura 10B). A los 8 días, el número de copia estuvo entre 10^4 y 10^5 copias por 200 ng de ADN. A los 13 días, el número medio de copia estuvo entre 5×10^6 y 5×10^7 y a los 19 días, entre 10^6 y 10^7 , y a los 26 días, entre 10^5 y 10^8 .

La gráfica logarítmica (Figura 10A) indicó una cinética de replicación de virus similar en cada uno de los cinco tractos. Sin embargo, las diferencias se enfatizan en la gráfica lineal (Figura 10B). Esta gráfica muestra que, a los 13 días, la carga media de virus para cuatro polluelos es hasta cuatro veces mayor en los tractos axilares que en los otros cuatro tractos. En este punto de tiempo, las cargas de virus en los tractos humeral y cervical estuvieron relacionadas muy cercanamente en cada punto de tiempo, y fueron mayores que la carga de virus en los tractos femoral y espinal. Estas diferencias entre tractos de pluma no fueron obvias en los días 8, 19 o 26.

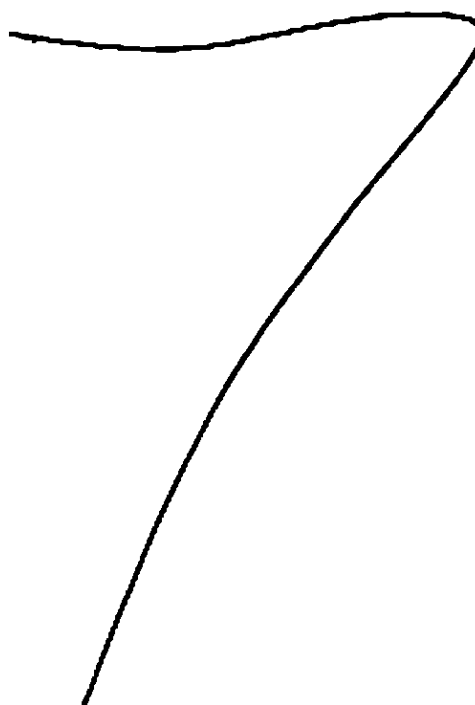
Para el polluelo de control no vacunado (#946), la mayoría de las muestras dieron valores Ct-40 de 0, como se esperaba en ausencia de ADN MDV.

62

Sin embargo, para algunas de las muestras, los valores Ct-40 fueron hasta 1 (los datos no se muestran). Es usualmente en el caso de PCR de tiempo real que las muestras "negativas" producen un valor Ct-40 por encima de 0, y los valores menores a 4 son considerados "no confiables". Así, aunque un valor Ct-40 de 3 equivale a ~ 200 copias de genoma Rispensa, este valor es 100 veces menor que cualquier valor obtenido para las muestras de polluelos vacunados, y se puede considerar negativo. Como se ve en la figura 5B, el número de copia medio para los cinco tractos de los polluelos no vacunados no se eleva por encima de la línea de base.

Resumen del análisis de PCR de tiempo real

- La carga de virus en cada uno de los tractos de pluma fue suficiente para ser detectable mediante PCR de tiempo real a los 8, 13, 19 y 26 días post vacunación.
- La carga de virus fue la más alta en todos los tractos de pluma a los 13 días post vacunación, según se comparó con los 8, 19 y 26 días post vacunación.
- A los 13 días post vacunación, la carga de virus fue mayor en el tracto axilar que en los tractos humeral y cervical (dos veces mayor) o en los tractos espinal y femoral (cuatro veces mayor).



REIVINDICACIONES

1. Un método para la detección de un virus en una muestra de tejido aviar que comprende: extraer material genético de una muestra de tejido aviar; y probar el material genético extraído para detectar cualquier material genético del virus; caracterizado en que la muestra de tejido aviar se deriva de una o más plumas del tracto axilar.
2. Un método para la detección de un virus como se reivindicó en la Reivindicación 1, en donde el método provee información cuantitativa acerca de la cantidad de virus en la muestra.
3. Un método para la detección de un virus como se reivindicó en la Reivindicación 1 o 2, en donde el método es específico para MDV.
4. Un método como se reivindicó en la Reivindicación 3, en donde el método es específico para el serotipo 1 de MDV.
5. Un método para detectar MDV como se reivindicó en la Reivindicación 4, en donde el método es específico para la cepa CVI 988 de Rispens MDV-1.
6. Un método como se reivindicó en la Reivindicación 5, en donde el método comprende:
 - (i) proveer plantillas delantera y reversa para una polimerasa de ácido nucleico, cuyas plantillas son seleccionadas de la secuencia de nucleótido que flanquea la secuencia de nucleótido de repetición de 132 bp de MDV;
 - (ii) amplificar las secuencias de ácido nucleico entre las plantillas;
 - (iii) detectar el número de secuencias de repetición de 132 bp en las secuencias de ácido nucleico amplificado; y

- (iv) relacionar al número de secuencias de repetición de 132 bp con la identidad del ácido nucleico viral y de esta forma, identificar el tipo de MDV en la muestra de tejido.

7. Un método como se reivindicó en cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 5, que comprende:

- (a) proveer una secuencia de polinucleótido que es capaz de ligar específicamente a un polinucleótido objetivo específico de virus;
- (b) contactar el material genético extraído con una sonda, de esta forma la sonda se liga específicamente a su polinucleótido viral objetivo;
- (c) determinar si la sonda se ha ligado a su polinucleótido viral objetivo; y
- (d) determinar si la muestra contiene el virus con base en que la presencia del polinucleótido objetivo indica la presencia del virus en la muestra.

8. Un método como se reivindicó en la Reivindicación 7, en donde el paso (c) para determinar si la sonda se ha ligado a un polinucleótido objetivo comprende la amplificación de una región del polinucleótido objetivo, cuya región comprende el sitio de ligamiento de la sonda.

9. Un método como se reivindicó en la Reivindicación 8, en donde la amplificación es emplantillada mediante las siguientes plantillas:

Plantilla delantera (GGT CTG GTG GTT TCC AGG TGA)

Plantilla reversa (GCA TAG ACG ATG TGC TGC TGA)

10. Un método como se reivindicó en la Reivindicación 9, en donde la sonda tiene la secuencia 5' AGA CCC TGA TGA TCC GCA TTG CGA CT 3'.

11. Un método como se reivindicó en cualquiera de las Reivindicaciones 7 a 10, en donde la sonda está marcada fluorescentemente, y en donde el paso de determinar si la sonda se ha ligado a un polinucleótido objetivo comprende la determinación de emisiones fluorescentes de la sonda.
12. Un método para detectar un virus como se reivindicó en cualquier reivindicación anterior, en donde el método incluye el uso de una reacción de PCR.
13. Un método como se reivindicó en la Reivindicación 12, en donde, antes de realizar dicha reacción de PCR, el material genético extraído a ser probado es tratado con un agente para superar el efecto inhibitorio de cualquier factor de tejido de pluma que pueda estar presente.
14. Un método para detectar un virus como se reivindicó en la Reivindicación 13, en donde el agente es seleccionado de uno o más de albúmina de suero bovino; albúmina de suero porcino (cerdo); y albúmina ovina (oveja).
15. Un método para detectar un virus como se reivindicó en cualquier reivindicación anterior, que además comprende el paso de proveer los resultados del método en un formato inteligible.
16. Un método como se reivindicó en la Reivindicación 15, en donde los resultados son proveídos mediante registro o almacenamiento de los resultados del método en un portador de información.
17. Una muestra de tejido aviar aislada de una o más plumas del tracto axilar.
18. Una muestra de tejido aviar aislada como se reivindicó en la Reivindicación 17, en donde la porción próxima de la pluma del tracto axilar es aislada de la porción distal (barbada) de la pluma.
19. Un material genético que contiene extracto de una muestra de tejido aviar aislada como se reivindicó en la Reivindicación 17 o 18.

20. Una muestra o extracto como se Reivindicó en la Reivindicación 17, 18 o 19, en donde la muestra es almacenada en una forma adecuada para transportarla a una ubicación separada.

21. Una muestra como se reivindicó en la Reivindicación 20, en donde la muestra o extracto está contenida en un contenedor sellado.

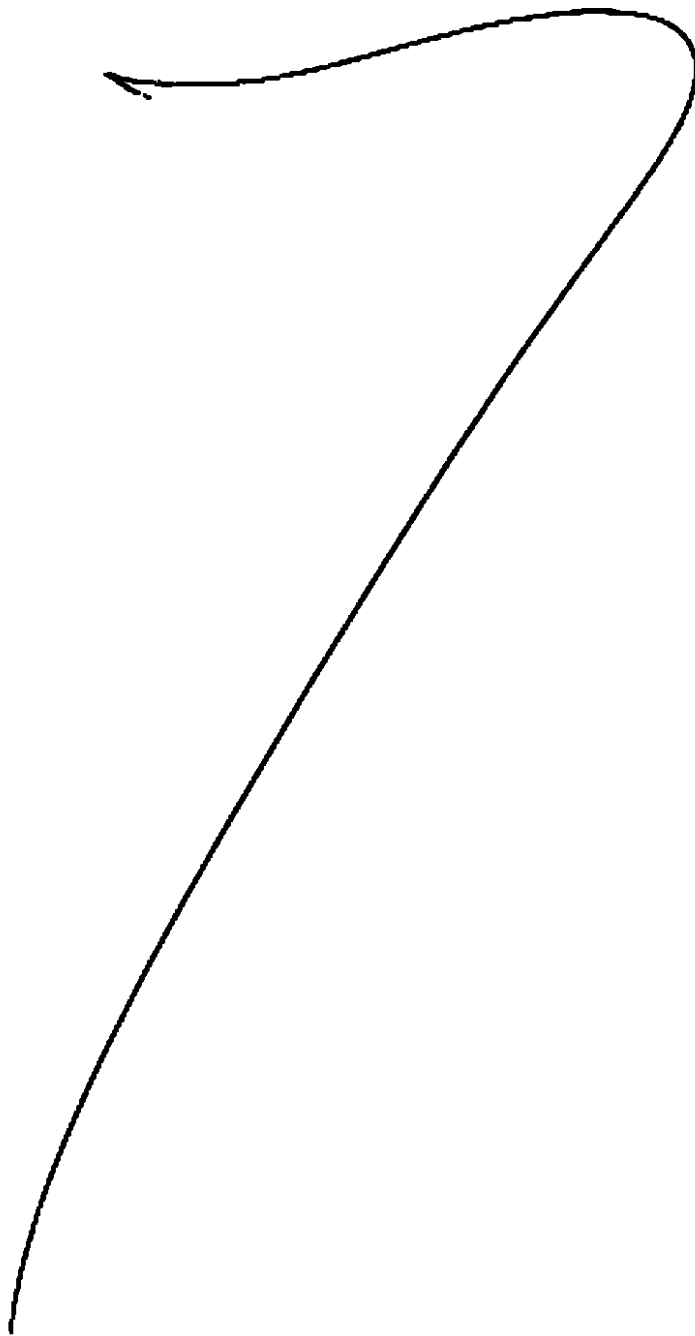


Fig.1(a)

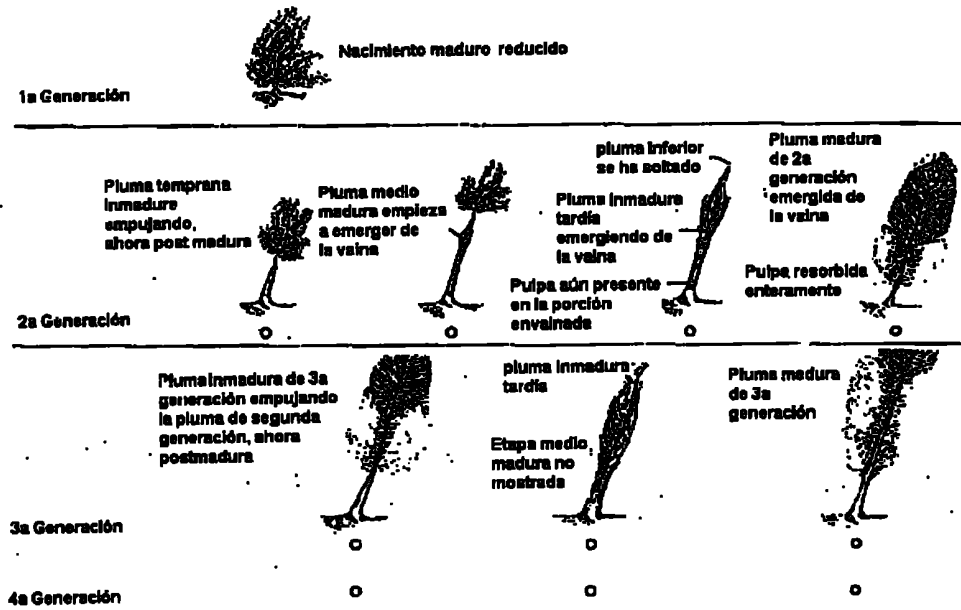
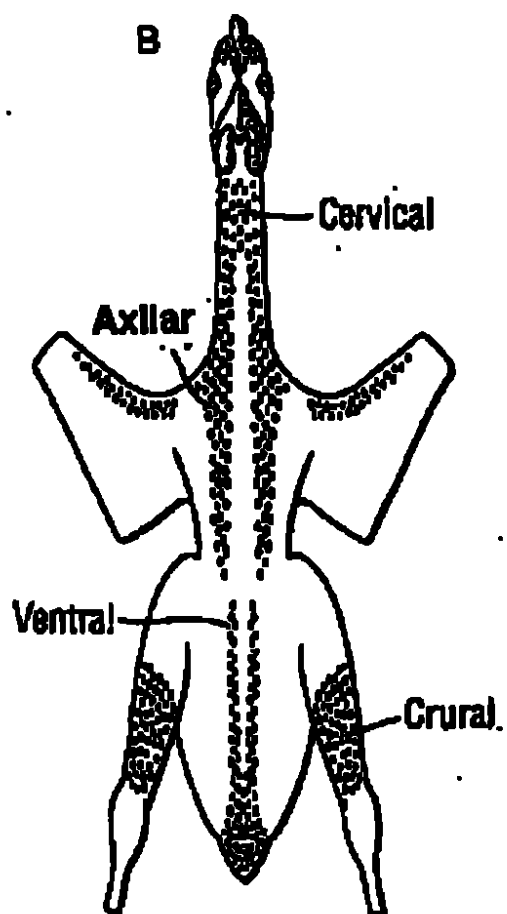
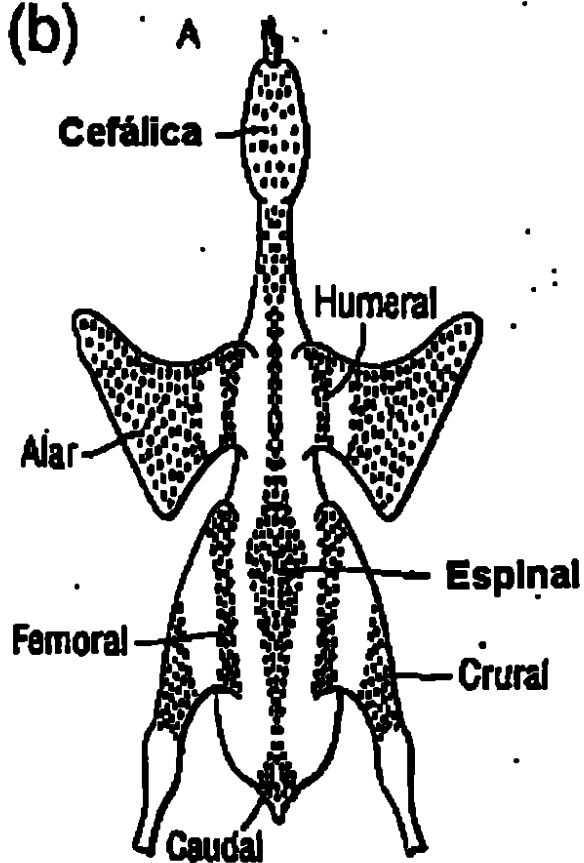


Fig.1(b)



72

Fig.2(a)



Fig.2(b)



13

Fig.2(c)



Fig.2(d)

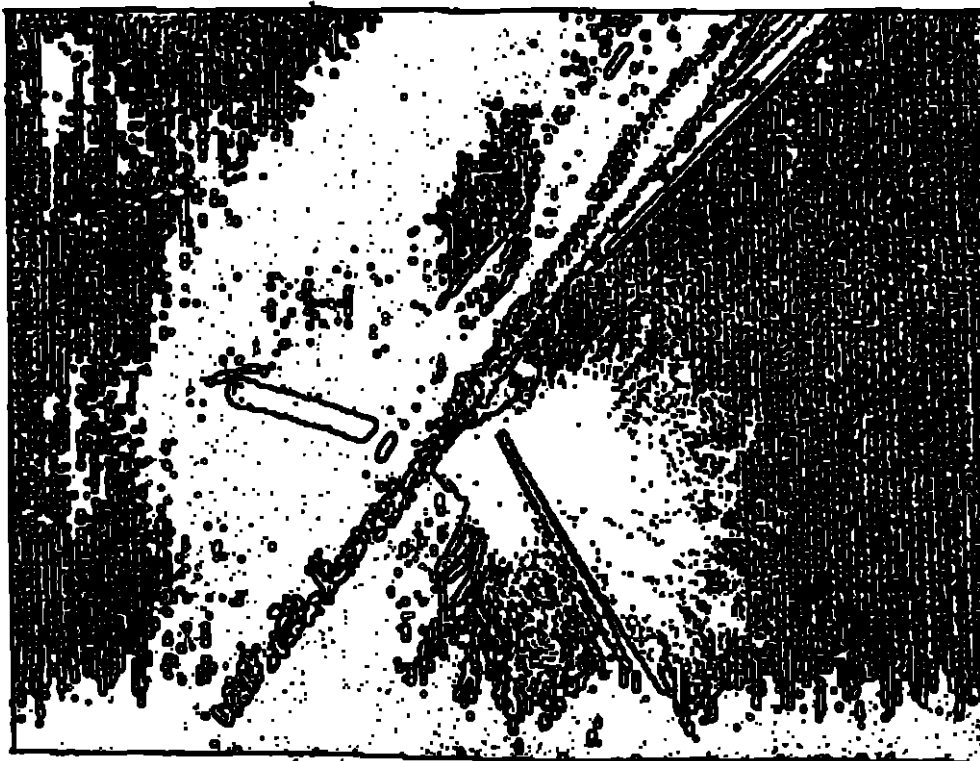
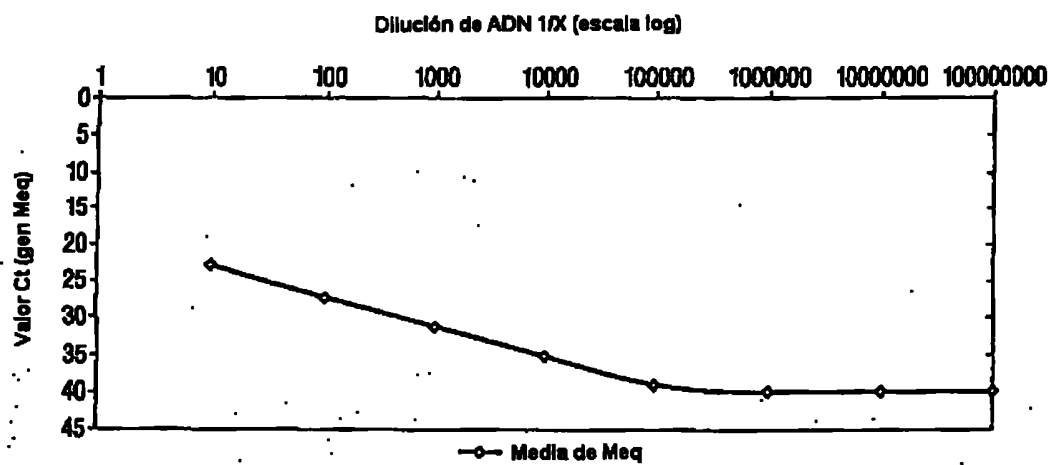


Fig.3.



72

Fig.4.

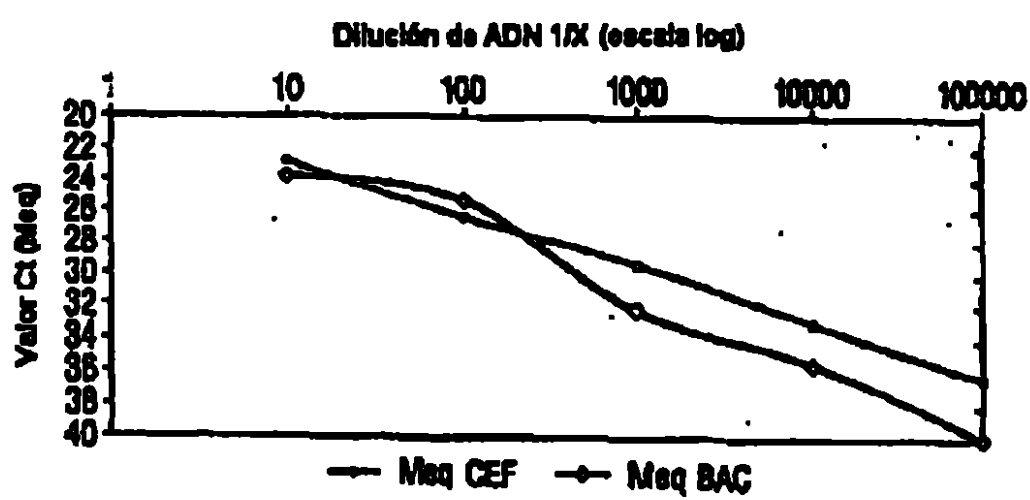
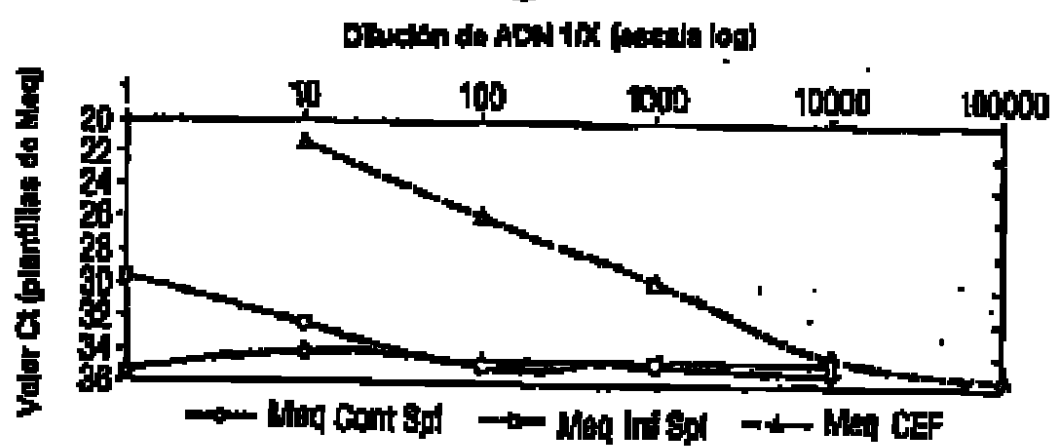
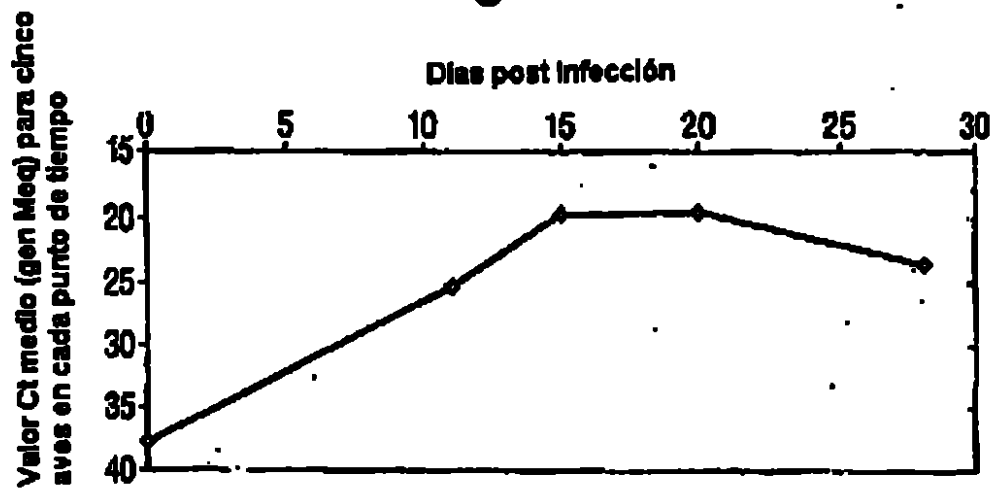


Fig.5.



75

Fig.6.



76

Fig.7(a)

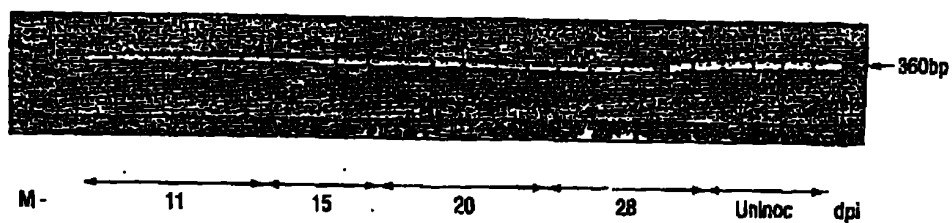


Fig.7(b)

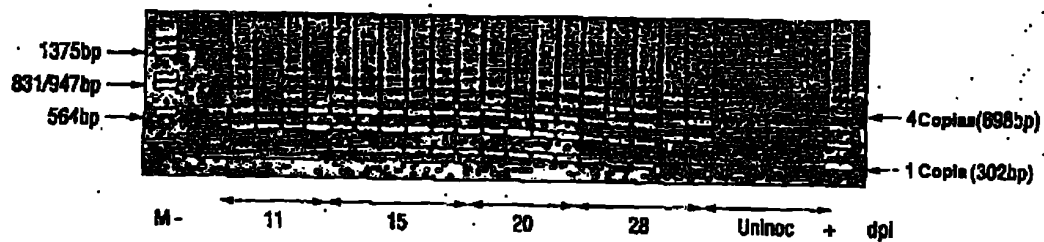
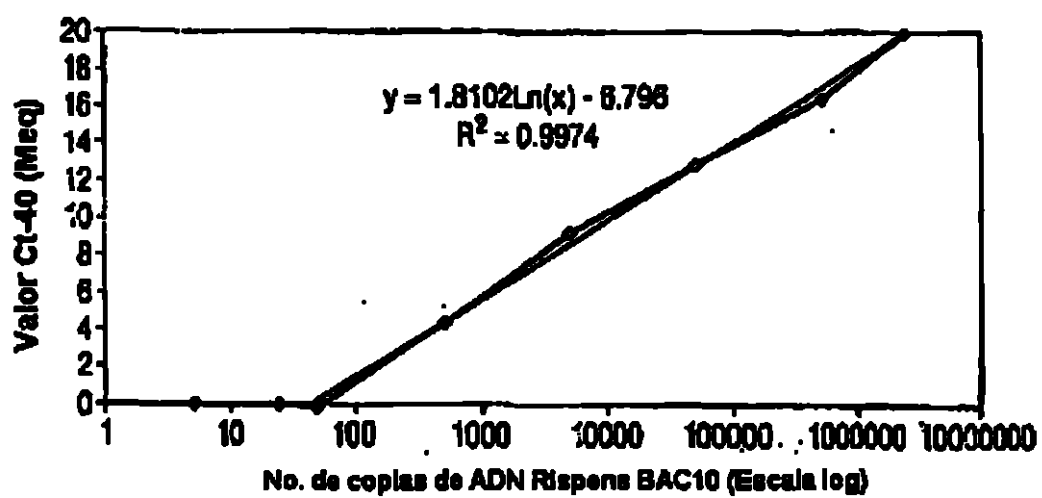


Fig.8.



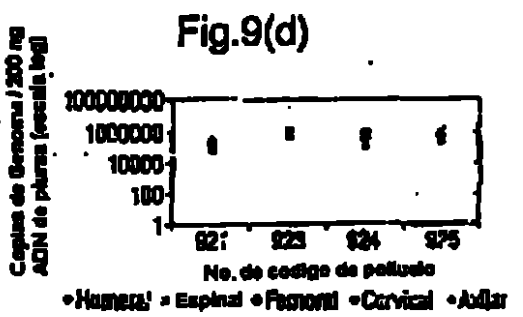
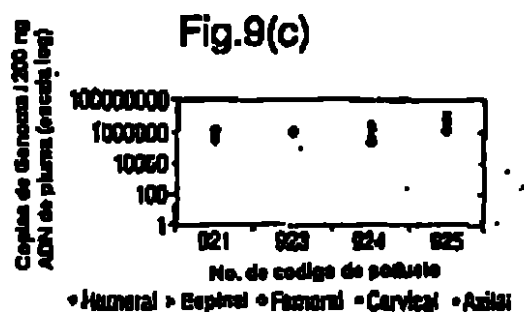
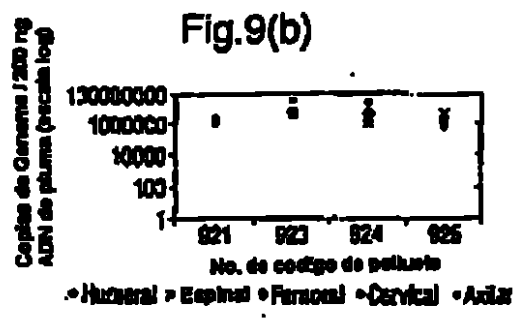
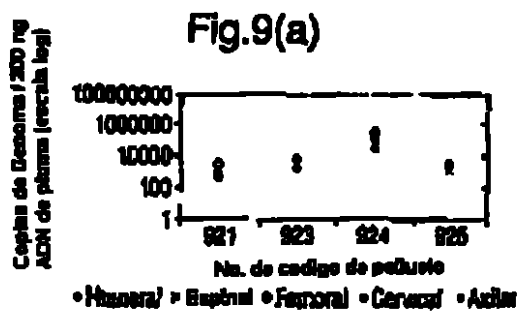


Fig.10(a).

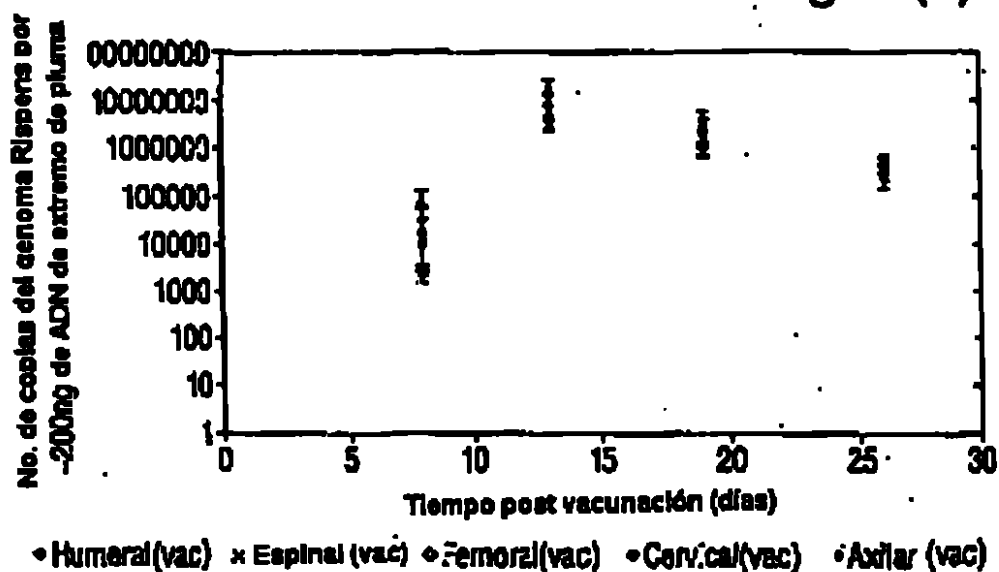
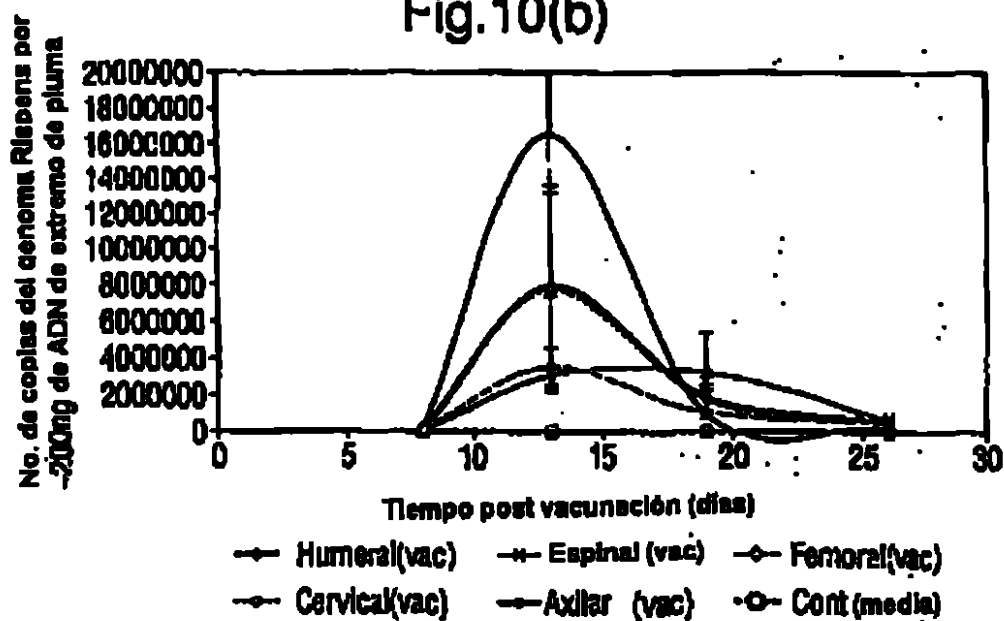


Fig.10(b)



LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Wyeth

<120> Métodos de Prueba

<130> AM101125

<140> GB 0223960.6

<141> 202-10-15

<160> 9

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 26

<212> ADN

<213> Sonda de ADN

<400> 1

agacccgat gatccgcatt ggcact 26.

<210> 2

<211> 21

<212> ADN

<213> Plantilla de ADN Sintético

<400> 2

ggctcggtag ttccaggta 21.

<210> 3

<211> 21

<212> ADN

<213> sonda de ADN

81

<400>3

gcatacacga tgtgctgctg a

21.

<210>4

<211>24

<212>ADN

<213>sonda de ADN

<400>4

tacttcctat atagattgag acgt

24

<210>5

<211>24

<212>ADN

<213>sonda de ADN

<400>5

gagatcctcg taagggtgaa tata

24

<210>6

<211>19

<212>ADN

<213>sonda de ADN

<400>6

cactgccact gggctctgt

19

<210>7

<211>21

<212>ADN

<213>sonda de ADN

<400>7

gcaatggcaa taacctcca a

21

<210>8

<211>27

24

<212> ADN

<213> Plantilla de ADN Sinetético

<400> 8

agictggaga agictgtgca gcclcca

27

<210> 9

<211> 2466

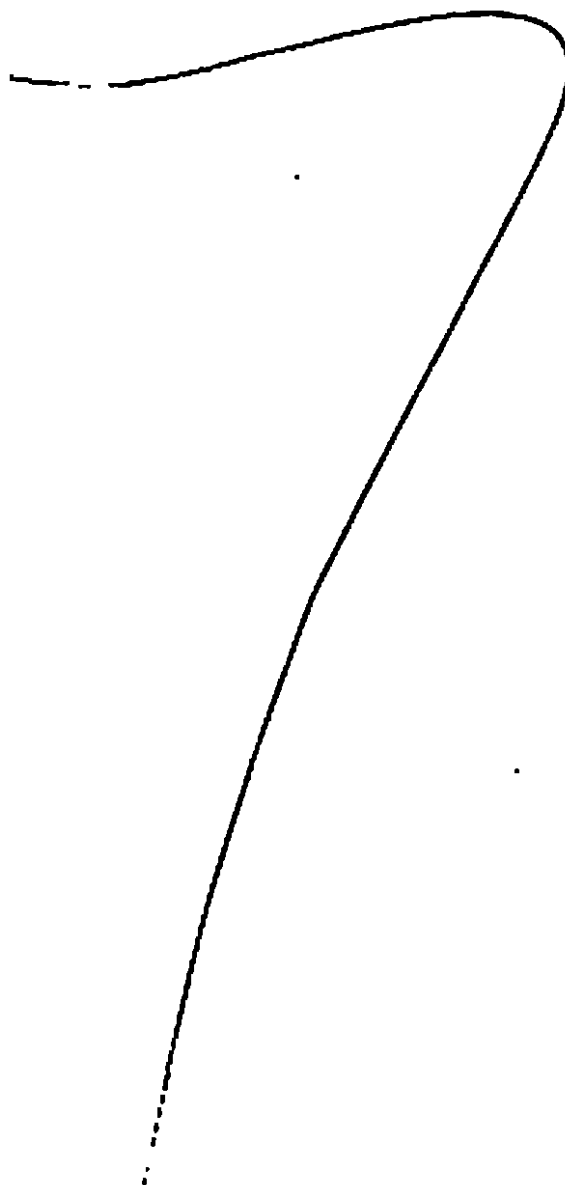
<212> ADN

<213> ADN

<400> 9

gaattcggta atataagac gatagtcata catpacgtop oppactlogat epactgatat 60
 ctatgggttc gggagtgata cygagacggg pppppppppp aactgataga rrralaccta 120
 cctcttaaat aaactattgc tcttttataa atgacaggtt gaattgtgac cgttcgcpaa 180
 cggtaantcc tcaataactt tgggtctgtt ggggtgtgtt ttlllaalca ttttttgggt 240
 tggggaggtt tgggtctgga atgttaagaa taaatccgc acatgattcc ctaggcagat 300
 gtctcttgcg ggtgtatacc agggagaggg cgggacgggt acaggtttaa agagatgtct 360
 caggagccag agcgggpcgc tttgcccata agtctcgttg acgattccgc cccctccgat 420
 ctltctctcg ggtcgttctc gggatggaaa aaaagpaaaa gtcatgacat ccccaacagc 480
 cctctcaaac acccttccc tgcgggcta tctgaggagg agaaacgaa gctggaaagg 540
 agggaaaaa ggaattcga cgcgctccgg agagagcga gaaagcagac ggcattatga 600
 gacaaactcc atgaagcatg tgaagagctg cagagggcca atgaacacct acgttaggaa 660
 attcgagatc taagaaallya ggcagctcc ctgcgtgac agttggctly tcatgagcca 720
 gttggccta tggggtacc cctaaaggtt accctgggac tgcattaccac cccgacgat 780
 cccgttcttg aactctccat ttgactctt ccaactctct cacttgatga acctaacgct 840
 ccaatttgct cgggttctca acctctctac tgaacccccc ctctctcga tacggagaaa 900
 ccttgagccc agctctgctc gaacccacca cctccctctt caactcccca tartaactac 960
 gctccggggc ctctccctct caactctctt atctgaccc cccctctctc cpatgagggg 1020
 ggggttcttg cccagctctg ctgagcccca ccaactctca tctgtactcc caattctctc 1080
 tctgcccctc cccagctctc atctctggag ggaactctcc ctgactgtg tctgttacc 1140
 agcgtgtga cctctctatc gctggggagc gttacagctc agcttgctcc tgttgccag 1200
 gctccctctt ttaacccatc tccctctctt cgggtctccg agcggagag gctttatgct 1260
 cctcttaccg agatcccca acagagctcc tggatctgg gctagattta tttcagctt 1320
 cctctggata ctcatgctac ggtctgtgtg tttcagctg acggagagac ctgagatcc 1380
 gcaattcgac tctcagcagc aatctgtcta tgcacctgt tctctctcc ctatgtatat 1440
 atattagttt tcatagtttc ggaagatca acataaagg aaagatttaa ggcattatct 1500
 atcgatttac cgaatataa aaatctctg ggttaacaa cttccctcta cgggtatgct 1560
 tagactcggg agaaactatt taugttacat gtttaaaag ittggtggct ccaggagctc 1620
 cgaagtatga gataaactta gctatgtgga aaactctctg ggaacatct ctcggcccca 1680
 gactgttaa atggcaaat ctcttctat acaagaggt tggggaggg gggggggggg 1740
 gtatatggg tatttctcg gatattgctt ctatgaagct gctgtatgtt ttccagpctc 1800
 aaaaactatg cctggctgtt tttttttt aaayggatg ggaatcgc caataagaa 1860
 tartaagat aacagatgg aactcgggt gtaaaagaa taagcgaac ccttagttag 1920
 tgtgatttaa tgcagctctg tataattcgg tgggtctgat taggttatcg taaggaaac 1980
 cactattgat cctctctcg cgtcccgac atcagpccia tctccctctt ctgtggccag 2040
 ctactggct ggtactgtg caattctaaq tgcacagtc gtagcagat caatggatcg 2100
 gggctcggc aactactg taattabaa ttcgtttatg aattatgca aattgcacg 2160
 ataatataa cgggagtcg cagactact cctatgccc gatagcag ccaatagga 2220
 gttgtcgac taacgata tcaagctag gacccaggg aactatgga aataactca 2280
 tgcagagac gcttatgag galyaactg cgttaagtc ttactgatt gtaacggcta 2340

teppagact ctcttccctt ttpcttgtt cactgtgpgg cattatnca ttacacggg 2400
tantgttgc catgaaagag cgaacgggac gaggcttcta cpaattaca agaatagttt 2450
gaattc 2455



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Radicación: 8738776 20052005 Folios: 28
Fecha: 01/09/2005 12:16:44 AS
Procedimiento: 3220 APLICACIÓN DE MARCA COMERCIAL
Asunto: 311 ACT-EXTRIN. 173 FOLIOS 145 AL PRESENTE

21 27
AC
Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT

PATENTE DE INVENCION [X]

MODELO DE UTILIDAD []

- ♦ Indicación de que se solicita la concesión de una patente [X] 1
- ♦ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [X] 1
- ♦ Descripción de la invención [X] 30
- ♦ Dibujos de ser estos pertinentes [X] 71
- ♦ Comprobante de pago de las tasas establecidas [X] 2

COMPLETA [X]

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- ♦ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial []
- ♦ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ♦ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño []
- ♦ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

ESQUEMA DE TRAZADO []

- ♦ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado []
- ♦ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ♦ Representación gráfica del esquema trazado []
- ♦ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

Claudia M Nova

Firma Responsable

Fecha _____

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Folio 88

2020
Bogotá, D.C.,

Doctor(a)
ALICIA LLOREDA RICAURTE
Representante y/o Apoderado(a)

Oficio N° 12757

ASUNTO:	Radicación N°	05-33793
	Solicitud internacional	PCT/EP2003/011360
	Fecha inicio fase nacional	15/05/2005
	Trámite	011
	Evento	379
	Actuación	430
	Folios	001

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

- ☐ Debe presentar la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 28-k) Decisión 486/00.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones.

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha, 10 de mayo de 2005

202027

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10
Consultador: 382 0840
Fax: 350 5220
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia