

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 388 118**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08757923 .1**

96 Fecha de presentación: **29.03.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2132335**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.12.2009**

54 Título: **Procedimiento para la detección de la paratuberculosis**

30 Prioridad:
30.03.2007 DE 102007015775

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
09.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
09.10.2012

73 Titular/es:
**JUSTUS-LIEBIG-UNIVERSITÄT GIESSEN
LUDWIGSTRASSE 23
35390 GIESSEN, DE**

72 Inventor/es:
**BÜLTE, Michael;
ABDULMAWJOOD, Amir y
SCHÖNENBRÜCHER, Holger**

74 Agente/Representante:
Roeb Díaz-Álvarez, María

ES 2 388 118 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCION

Procedimiento para la detección de la paratuberculosis.

- 5 La presente invención se refiere a un método para la detección específica y sensible de *Mycobacterium avium* ssp. Paratuberculosis (MAP) en muestras de órganos, de tejidos y fecales con un método de PCR en tiempo real usando ácido desoxirribonucleico genómico (ADN) de un marcador adecuado.

Estado de la técnica

- 10 El *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) fue descrito por primera vez en 1895 como agente etiológico en una enfermedad inflamatoria intestinal crónica de una vaca en Alemania. El nombre "enfermedad de John" o "John's Disease", en honor a su descubridor, fue introducido para esa paratuberculosis (ParaTB) que aparece en rumiantes, pero también en otros mamíferos. Se trata de una enfermedad presente en casi todo el mundo que causa grandes daños económicos.

- 15 Debido a los cambios patomorfológicos similares a los de la enfermedad inflamatoria intestinal crónica en humanos denominada enfermedad de Crohn (Morbus Crohn – MC), surgió desde comienzos del siglo pasado la sospecha de que estas micobacterias pudieran desempeñar un papel en la etiología de la infección. El nombre se debió a la descripción de ocho casos de ileítis por Crohn, Ginzburg y Oppenheimer en 1932 en el hospital Monte Sinaí (Mount Sinai Hospital) en Nueva York. La primera descripción exacta del desarrollo clínico se realizó ya en 1913 por Dalziel en Glasgow. La inflamación se va presentando en brotes e implica para las personas afectadas una considerable reducción de su calidad de vida. La tasa de letalidad es de aproximadamente un 6 %. Un estudio multicéntrico en Europa encontró que la incidencia, es decir, la cantidad de nuevos casos de enfermedad de Crohn, asciende a 5,6 casos por cada 100.000 habitantes al año; de modo que son aproximadamente 200.000 las personas afectadas.

- 20 Para Alemania se estimó una prevalencia de MC de 1/500 a 1/800, lo que equivale a aproximadamente 200.000 personas afectadas. La incidencia es de 5,2 por 100.000 habitantes. El coste total se calcula en 20.000 € por año y paciente, lo que asciende a una suma de aproximadamente 2 mil millones de euros al año en Alemania. Las similitudes entre los aspectos clínicos e histológicos de la paratuberculosis bovina y la tuberculosis humana intestinal y la enfermedad de Crohn no se pueden negar, sobre todo porque se pudo extraer MAP de muestras de tejidos de pacientes. Con la mejora de los métodos de detección y la introducción del método PCR, se logró comprobar cada vez más frecuentemente MAP en animales y humanos enfermos.

- 25 El elemento de inserción "IS900" del genoma MAP fue durante mucho tiempo el estándar reconocido en el diagnóstico biológico molecular. Los trabajos científicos se basan en el uso exclusivo de 5 distintos pares de primers. Se trata, en concreto, de IS900/150C//IS900/921, p36//p1, MK5/MK6, P90//P91 y P21/P8. Sin embargo, se describen reacciones cruzadas con los así llamados elementos "IS900like" de otros organismos, que hacen que este marcador sea inadecuado para la detección específica de MAP. Varios trabajos científicos según el estado de la técnica describen, sin embargo, el desarrollo de métodos de PCR en tiempo real basados en IS900. Estos métodos combinan los oligonucleótidos utilizados en la PCR convencional con los materiales marcadores conocidos del método ELISA, como, por ejemplo, colorantes fluorescentes o marcadores radioactivos, como se indica, por ejemplo, en DE 102 24 338 A1 para la detección de MAP. Sin embargo, estos métodos carecen todavía de la especificidad necesaria para la detección fiable de MAP y son susceptibles a contaminaciones o a falsos resultados positivos.

- 40 De trabajos científicos se conoce otro marcador más para el MAP, a saber, la secuencia de inserción ISMav2 del genoma MAP. Si bien la secuencia ISMav2 no muestra ninguna similitud con otras secuencias de inserción micobacteriales, muestra sin embargo una identidad del 50% con un transposón potencial de *Streptomyces coelicolor*, de modo que no se pueden excluir posibles reacciones cruzadas en el análisis de pruebas biológicas.

- 45 De DE 10 2005 001 788 A1 se sabe también que la secuencia F57 del genoma MAP es un marcador altamente específico para el MAP, y que con ello es una estructura objetivo para métodos de detección de PCR selectivos. DE 696 27 625 T2 revela el gen dnaJ, un gen de la proteína de choque térmico para la detección y determinación de micobacterias.

- 50 Sin embargo, las secuencias de marcadores F57 y dnaJ, ya solo por las reacciones cruzadas, no son apropiadas para su aplicación en los métodos de PCR en tiempo real para la detección específica y fiable de MAP en pruebas biológicas.

- 55 Otra desventaja del estado de la técnica actual es que la detección de MAP se efectúa sobre todo a partir de la leche, como se revela, por ejemplo, en DE 102 24 338 A1. La leche es una prueba biológica muy fácil de analizar, con muy pocos microorganismos contaminantes, que no presenta sustancias inhibitoras de la reacción PCR, de manera que la preparación de la prueba y la ejecución de la reacción PCR no precisan de grandes requisitos.

- 60 No obstante, es necesario analizar otras muestras biológicas, como fecales, de órganos y de tejidos, ya que no todos los animales (ni tampoco los humanos) que como potenciales portadores de paratuberculosis deben ser rutinariamente examinados dan leche.

Los expertos son conscientes de que el análisis de muestras biológicas complejas, como fecales, de órganos y de tejidos precisa de requisitos especiales y un método conocido de análisis de leche no puede ser transferido directamente.

- 5 El problema de la reacción cruzada, la neutralización y de la contaminación general con otros microorganismos es muy grande en muestras fecales que presentan una composición compleja. En general, no se desea un nuevo enriquecimiento del agente patógeno en un medio de cultivo, ya que tiene que asegurarse un diagnóstico rápido y el cultivo de MAP requiere mucho tiempo.
- 10 En el estado actual de la técnica no se conoce ningún método que revele satisfactoriamente una detección automatizable, específica y fiable de MAP en muestras biológicas, sobre todo fecales, de órganos y de tejidos, utilizando PCR en tiempo real.

Objetivo

15 El objetivo de la presente invención es, por lo tanto, eliminar las desventajas descritas del estado actual de la técnica y proporcionar un método mejorado de PCR en tiempo real para la detección específica y fiable de MAP en muestras fecales, de órganos y de tejidos, así como un kit de prueba que permita una aplicación automatizada del método.

20 El objetivo se logra según la presente invención mediante un método según las reivindicaciones 2-10 y un kit de prueba según las reivindicaciones 11-16, bajo el uso de oligonucleótidos especiales según la reivindicación 1.

25 El método según la presente invención presenta con la aplicación de la PCR en tiempo real muchas ventajas, por ejemplo, la aplicación de un método de extracción de ADN especial y seguro para muestras fecales, de órganos y de tejidos que puede aplicarse automatizadamente para un elevado número de muestras en un tiempo determinado. Falsas reacciones negativas o reacciones cruzadas pueden excluirse casi por completo gracias a la óptima selección de oligonucleótidos como primers y a la amplificación simultánea de dos estructuras marcadoras en el gen del MAP. Además, en la PCR en tiempo real, se obtiene mediante la comparación con un "control interno de amplificación (CIA)", una cuantificación exacta del ADN específico amplificado del MAP. De esta manera, se obtiene como resultado un método mejorado específico y a la vez sensible de PCR en tiempo real para la detección de *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis* (MAP).

35 Según la presente invención, se proporcionan y aplican combinadamente los primers óptimos para la amplificación de las secuencias de marcadores "ISMav2" y "F57" del genoma MAP en un método de PCR en tiempo real para la detección específica de ADN del MAP genómico de muestras fecales, de órganos y de tejidos. Para este proceso, es de gran importancia el tratamiento previo del material biológico.

40 Se proporcionará además un testkit correspondiente para la ejecución rutinaria y automatizada del método para un alto número de muestras en un tiempo determinado que incluye los primers óptimos y alternativamente también el control interno de amplificación y/o materiales para la preparación de las muestras y la ejecución del método PCR.

45 El método de PCR en tiempo real según la presente invención indica de forma selectiva la existencia del ADN de MAP en muestras fecales, de órganos y de tejidos, independientemente del tipo de animal estudiado.

Además, el método posibilita también la determinación cuantitativa, en el mismo paso del proceso, del ADN detectado de MAP en la prueba biológica. La detección específica se lleva a cabo independientemente tanto de la flora acompañante presente en las pruebas biológicas como de la cantidad de inhibidores de PCR conocidos en la prueba. La detección de MAP es independiente del tipo de animal, es decir, que se puede detectar de manera fiable tanto cepas de MAP de origen bovino, como humano u ovino.

50 A causa de la gran sensibilidad de este método, también está garantizada la detección temprana de incluso concentraciones muy bajas de MAP en la muestra biológica, con lo que se puede tomar medidas en una fase muy temprana, lo que supone una aportación importante para garantizar la salud de los seres humanos y la de los animales en animales de ganado y la calidad de los alimentos.

55 En comparación con métodos de PCR convencionales, el método de PCR en tiempo real según la presente invención es considerablemente más sensible. Por ejemplo, en muestras fecales bovinas se detectan hasta 10^2 unidades formadoras de colonias de MAP.

60 El límite de detección del método de PCR en tiempo real, que se calcula según uno de los métodos conocidos por los expertos respecto al análisis de dilución en serie decimal, se sitúa en aproximadamente $1,0 \times 10^{-12}$ g/DNA por PCR.

Para calcularlo se comprobó especialmente la posible influencia inhibitoria del ADN de fondo (background DNA) de muestras fecales, de órganos y de tejidos y no se detectó ningún efecto negativo sobre el límite de detección.

65 La principal ventaja que supone el método de PCR en tiempo real según la presente invención es la sensibilidad, que es 30 veces más alta que la de la PCR convencional y la cuantificación directa, que permite un diagnóstico

cualificado. Para los expertos es también evidente que, gracias a las mediciones paralelas que ahorran tiempo, ya no es necesaria la laboriosa y lenta valoración con la técnica de la electroforesis en gel.

Los métodos convencionales de PCR solo alcanzan una sensibilidad comparable usando el "Nested-PCR" o "PCR anidado", el cual, como saben los expertos, no es sin embargo adecuado, debido al alto riesgo de contaminación y a la tasa que ello conlleva de falsos resultados positivos.

Independientemente de la matriz de muestras y del grado de procesamiento o calentamiento presente, se consigue en menos de ocho horas ("one day result") la verificación de la detección fiable en combinación con la preparación de las muestras.

Junto con el método optimizado de preparación de las muestras y desarrollado en la combinación descrita para esta aplicación, se proporciona un proceso fiable y de funcionamiento seguro cuya ejecución y sencilla evaluación puede ser también llevada a cabo por personal de laboratorio menos cualificado. Los distintos pasos del proceso se llevan a cabo también de manera automatizada, de modo que se consigue un elevado número de muestras en un tiempo determinado.

El método según la presente invención para la detección específica de *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) en muestras fecales, de tejidos y de órganos mediante PCR en tiempo real se caracteriza por la preparación del material de muestra, la extracción del ADN y el análisis del ADN aislado en la PCR en tiempo real, donde ambas secuencias de marcadores, ISMav2 y F57 del genoma MAP, se amplifican con oligonucleótidos adecuados como primers y se detectan con sondas adecuadas.

El método de preparación de las muestras está elegido de tal manera que incluso de muestras biológicas complejas, como fecales, de órganos y de tejidos, se consigue todo el ADN genómico después de reducir la cantidad de inhibidores de la PCR, de llevar a cabo una homogeneización mecánica y de un tratamiento fiable de proteinasa K.

Según la presente invención, como marcadores específicos del MAP se utilizan las secuencias de marcadores "ISMav2" y "F57" del genoma MAP, se producen oligonucleótidos adecuados como primers forward y reverse para la hibridación en estas secuencias genéticas y se eligen sondas fluorescentes adecuadas para estos primers.

Los oligonucleótidos como primers son compatibles con sondas conocidas de diferentes fabricantes (por ejemplo, TaqMan, LNA), que se unen al ADN amplificado o hibridizan con él, de modo que el método PCR en tiempo real según la presente invención se realiza independientemente del tipo de aparato y posibilita una amplia aplicación.

El segmento genético preferiblemente elegido con los primers según la presente invención para la detección de MAP en pruebas biológicas con PCR en tiempo real tiene un tamaño muy pequeño y se ha comprobado que permanece estable durante varios años en las muestras fecales, de órganos y de tejidos y se puede detectar con seguridad incluso después de un largo periodo de tiempo.

Ejemplos de realización

a) Preparación del material de prueba y extracción del ADN

Como materiales de prueba, es decir, prueba que hay que analizar o prueba de control negativo o positivo, se usan muestras fecales, de órganos y de tejidos de seres humanos, animales, como, por ejemplo, bovinos, avícolas, ovinos u otros animales de ganado y domésticos; entre ellas también pruebas de nudos linfáticos o segmentos intestinales. Debido a la multiplicidad de las pruebas que hay que analizar, a la distribución no homogénea de MAP en la prueba (formación de grumos) y a la gran estabilidad de la pared celular del MAP, la fase de la homogeneización es importante y está optimizado de tal modo que permite evitar contaminaciones.

Además de numerosos métodos estándar de homogeneización de pruebas biológicas conocidos por los expertos, como, por ejemplo, el uso del molino de vibración, o del homogeneizador de Potter-Elvehjem o el Ultra Turrax T25, se utiliza preferiblemente la especialmente eficiente y rápida homogeneización con Fast-Prep-120. Con este método, la fase de homogeneización consiste en una combinación de movimientos de rotación verticales y de movimientos horizontales hacia arriba y hacia abajo.

Como el material de prueba, especialmente las muestras fecales, presenta un alto contenido de inhibidores de la reacción PCR (por ejemplo, ácidos biliares, hemoglobina), la extracción de ADN implica requisitos especiales.

El ADN genómico completo proveniente de muestras fecales, de órganos y de tejidos se obtiene preferiblemente después de una reducción eficiente del contenido de inhibidores de la PCR, del empleo de la homogeneización mecánica y de un tratamiento fiable de proteinasa-K. Para el análisis de muestras fecales se utiliza, por ejemplo, el kit DNeasy[®] Stool mini kit de Qiagen; para el análisis de pruebas de órganos y tejidos, por ejemplo, el kit DNeasy Tissue Kit de Qiagen, siguiendo las indicaciones del fabricante. Para reducir el fenómeno de la formación de espuma que se origina, se añade un detergente, por ejemplo, un tampón DX. La ruptura de la pared celular y la obtención de ADN se llevan a cabo de forma automatizada.

La preparación del material de prueba y la extracción de ADN de muestras fecales se lleva a cabo, por ejemplo, bajo las siguientes condiciones:

Las soluciones de los tampones DX (Qiagen, Hilden) y ASL se preparan según las indicaciones del fabricante (Stool Kit): Para ello se calientan 140 ml de tampón ASL de Qiagen a 70°C y se añaden y se mezclan 350 µl de tampón DX. El tampón DX reduce la formación de espuma en la homogeneización mecánica. Después se añaden respectivamente 1 g de heces a 5 ml de mezcla de tampón DX/ASL y la mezcla obtenida se agita en el vortex. La suspensión se incuba durante 10 minutos a 95°C en baño María. Se añaden cada vez 1,3 ml del sobrenadante en

un recipiente de plástico con tapa de rosca de 2 ml respectivamente, en el que previamente se han metido 4 perlas de vidrio. La ruptura mecánica se lleva a cabo, por ejemplo, en el Ribolyzer, según el siguiente esquema: 4 x 20 segundos a la velocidad 6. Después se agita en el vortex durante 15 segundos. Todo el sobrenadante se recoge y se mete en un nuevo recipiente de 2 ml. Para conseguir una separación clara de la fase sólida y el sobrenadante, se realiza una centrifugación a 5000 x g/5 min. Después de añadir una pastilla de Inhibitex por muestra para unir los inhibidores de la PCR, se agita durante un minuto en el vortex. Posteriormente, se centrifuga de nuevo durante 6 minutos a la máxima velocidad. Después se mete todo el sobrenadante en un recipiente de 1,5 ml. Por recipiente se echan respectivamente 20 µl de proteinasa K (20 mg/ml), se añaden 300µl del sobrenadante y se mezclan. Después se añaden respectivamente 300 µl de tampón AL y se mezclan echándolos 15 segundos en el agitador vortex. Después de una preincubación de 5 minutos a 70°C, se incuba la mezcla durante 10 minutos a 95°C. Después se añade 300 µl de etanol absoluto y se mezcla bien. Todo el lisado se transfiere en dos pasos a las columnas colocadas en los recipientes de 2ml. Posteriormente se centrifuga durante 1 minuto a 20000 x g. El precipitado se elimina y se coloca la columna en un nuevo recipiente. Para el lavado, se echan 500 µl AW1 sobre la columna y después se centrifuga durante un minuto a 20000 x g. El precipitado se elimina y se coloca la columna en un nuevo recipiente. Para el lavado, se echan 500 µl AW2 sobre la columna y se centrifuga durante 3 minutos a 20000g. El precipitado se elimina y se coloca la columna en un nuevo recipiente y se vuelve a centrifugar durante un minuto a 20000 x g. El precipitado se elimina y se coloca la columna en un nuevo recipiente de 1,5 ml. Seguidamente se lleva a cabo la elución del ADN añadiendo 100 µl de tampón AE directamente sobre la columna y dejándolo incubar durante un minuto a temperatura ambiente. Tras centrifugarlo una vez más durante 1 minuto a 20000 x g, se obtiene el ADN en el líquido recogido y puede ser utilizado directamente para el análisis PCR en tiempo real o ser almacenado a -20°C.

Alternativamente, se utiliza en vez del kit DNeasy® Stool mini kit de Qiagen también otro kit, por ejemplo, el High Pure PCR Template Preparation Kit® de la empresa Roche Applied Science, que se aplica también siguiendo las indicaciones del fabricante.

Alternativamente, se utiliza también leche como material de prueba; el aislamiento del ADN se lleva a cabo siguiendo un método del estado de la técnica.

b) Análisis del ADN aislado en la PCR en tiempo real, donde se amplifican y cuantifican ambas secuencias de marcadores ISMav2 y F57

Para la selección de los oligonucleótidos como primers se utilizan las secuencias de referencia registradas en el NCBI (Centro Nacional para la Información Biotecnológica, en inglés: National Center for Biotechnology Information. Banco de datos genéticos) para ISMav2 (código del GenBank número AF286339), SEQ ID NO:9 y para F57 (código del GenBank número X70277) SEQ ID NO:10, así como la secuencia del genoma MAP de la cepa de referencia K10 (código del GenBank número AE016958). Los oligonucleótidos seleccionados según la presente invención, se unen a un segmento particularmente favorable de la secuencia y se encuentran en una posición óptima para garantizar una detección selectiva de ambos marcadores del MAP ISMav2 y F57.

Los tamaños del amplicón (para ISMav2, aprox. 120 pares de bases y para F57, aprox. 60 pares de bases) están adaptados de forma óptima a los requisitos de la tecnología PCR en tiempo real, para la cual se requiere, según los estatutos técnicos, un tamaño de producto de 50 a 150 pares de bases. El pequeño tamaño del producto es un prerrequisito esencial para garantizar una alta sensibilidad y especificidad. Las sondas están seleccionadas de tal manera que se unen al ADN amplificado y generan señales en función de la cantidad de ADN unido. Estas señales se pueden medir y cuantificar. Las sondas llevan preferiblemente un colorante fluorescente para que se pueda medir su fluorescencia.

Nomenclatura	Secuencia de nucleótidos	Posición de enlace	Número de bases
SEQ ID NO:1 primer forward ISMav2	5'-CGG CAA AAT CGA GCA GTT TC-3'	1645-1665 ISMav2	20
SEQ ID NO:2 primer reverse ISMav2	5'-TGA GCC GGT GTG ATC ATC TTT-3'	1786-1807 ISMav2	21
SEQ ID NO:3 Ta-sonda qMan_{mgb} ISMav2	FAM-CGC TGA GTT CCT TAG-MGB	1678-1693 ISMav2	15
SEQ ID NO:4 sonda LNA ISMav2	FAM-cGc tGa GtT cCt TaG- BHQ1	1678-1693 ISMav2	15

SEQ ID NO:5 primer forward F57	5'-TAC GAG CAC GCA GGC ATT C-3'	244-263 F57	19
SEQ ID NO:6 primer reverse F57	5'-CGG TCC AGT TCG CTG TCA T-3'	288-307 F57	19
SEQ ID NO:7 Ta- sonda qMan_{mgb}- F57	VIC-CCT GAC CAC CCT TC-MGB	268-282 F57	14
SEQ ID NO:8 sonda LNA F57	Yakima Yellow-cCtgAcCacCctTc-BHQ1	268-282 F57	14

Tabla 1

La tabla 1 presenta las secuencias de nucleótidos de los primers según la presente invención para el análisis del ADN en la PCR en tiempo real y las secuencias de nucleótidos de las sondas TaqMan_{mgb} y LNA.

5 Los primers según la presente invención son moléculas de ácidos nucleicos que se unen a las secuencias de marcadores "ISMav2" o "F57" y/o las hibridizan. Además, los expertos son conscientes de que esto incluye también a los derivados de los primers formados por delección, sustitución y/o inserción y que presentan preferiblemente al menos un 80% de homología con los primers presentados.

10 Las secuencias de los primers según la presente invención para el análisis del ADN en la PCR en tiempo real y las sondas TaqMan_{mgb} y LNA se componen de las siguientes secuencias de ácidos nucleótidos:

Explicaciones sobre la nomenclatura de las combinaciones de primers y sondas:

- 15 - TaqMan[®] es una marca registrada de la empresa Hoffman-La Roche.
 - La abreviatura "mgb/MGB" se refiere a la expresión en inglés "minor groove binder", que designa un método de diseño de sondas conocido por los expertos con el que se logra una afinidad de unión hacia la región objetivo más alta y la selección de las sondas con una secuencia de bases más corta.
 20 - La abreviatura LNA en la sonda LNA viene del inglés "Locked Nucleic Acids" (LNAs), dichas sondas se integran en sondas doblemente marcadas con colorante. Ya que las bases LNA suben la temperatura del punto de fusión notablemente, las sondas LNA marcadas doblemente con colorante son más cortas que las sondas de ADN convencionales (< 50 pares de bases). Las sondas más cortas presentan un mejor efecto de desactivación fluorescente, tienen un menor ruido de fondo y son por lo tanto más sensibles.
 25 - FAM denomina una sustancia conocida por los expertos y escogida para el marcaje de sondas con colorante fluorescente, que alternativamente se denomina fluoresceína.
 - VIC denomina igualmente una sustancia conocida por los expertos y escogida para el marcaje de sondas con colorante fluorescente. El uso de otros fluoróforos se corresponde con el estándar de la técnica y es conocido por los expertos.

30 Las sondas TaqMan_{mgb} o las sondas LNA según la presente invención se utilizan respectivamente en combinación con el respectivo par de primers como PCR dúplex en tiempo real. En combinación con un control interno de amplificación (CIA), se lleva a cabo la aplicación denominada entonces PCR triplex en tiempo real. Como aparato analizador se utiliza, por ejemplo, el ABI 7000 Sequence Detection System (empresa Applied Biosystems, Darmstadt), alternativamente también otros aparatos de la empresa Applied Biosystems y todos los demás aparatos conocidos que utilizan el principio TaqMan (BioRad Laboratories, Stratagene), así como el Light Cycler V.2.0 de la empresa Roche.

35 Para la detección de la secuencia de marcadores ISMav2, se combinan el primer forward ISMav2 SEQ ID NO:1 y el primer reverse ISMav2 SEQ ID NO:2 con la sonda TaqMan_{mgb} ISMav2 SEQ ID NO:3 o alternativamente, el primer forward ISMav2 SEQ ID NO:1 y el primer reverse ISMav2 SEQ ID NO:2 con la sonda LNA ISMav2, SEQ ID NO:4.

40 Para la detección de la secuencia de marcadores F57, se combinan el primer forward F57 SEQ ID NO:5 y el primer reverse F57 SEQ ID NO:6 con la sonda TaqMan_{mgb} F57 SEQ ID NO:7 o alternativamente, el primer forward F57 SEQ ID NO:5 y el primer reverse F57 SEQ ID NO:6 con la sonda LNA F57 SEQ ID NO:8.

45 Para la cuantificación se extrae ADN de una cepa MAP (por ejemplo, de la cepa bovina "423") y se determina la concentración de ADN. De esta cepa se aplica una dilución en serie decimal en la respectiva PCR en tiempo real.

Con esta tecnología se determina la concentración de ADN obtenido mediante espectroscopia UV. Posteriormente, en el marco de la configuración del cycler en tiempo real utilizado, se define la dilución en serie decimal como estándar y se introducen manualmente en el software de uso del cycler térmico como base de cálculo los valores determinados espectroscópicamente. El contenido de ADN de las muestras a examinar se determina como relación a los estándares en el mismo ciclo PCR.

5

Preferiblemente, se utilizan las siguientes condiciones de mastermix (mezcla de 50 µl):

Componentes para el mastermix	Mezcla del experimento (1x en µl)
TaqMan Universal PCR Master Mix (2x)	25,0
MgCl ₂	0
SEQ ID NO:1 primer forward "ISMav2"	1,5
SEQ ID NO:2 primer reverse "ISMav2"	1,5
Sonda TaqMan _{mgb} SEQ ID NO:3 o Sonda LNA "ISMav2" SEQ ID NO:4	2,5
SEQ ID NO:5 primer forward "F57"	1,5
SEQ ID NO:6 primer reverse "F57"	1,5
Sonda TaqMan _{mgb} SEQ ID NO:7 o sonda LNA "F57" SEQ ID NO:8	2,5
Agua dest.	9,0
ADN template	5,0
Volumen total	50 µl

El ADN template es, por ejemplo, el ADN obtenido de la muestra biológica después del paso a) o una muestra de control positiva o negativa en MAP.

10

Los reactivos utilizados se incluyen como formulación completa en el TaqMan-Universal Mastermix (empresa Applied Biosystems, Darmstadt). Alternativamente, se utilizan otros reactivos, por ejemplo, de las empresas Eurogentec o Qiagen.

15

Las condiciones del termociclador se eligen de la siguiente manera:

Incubación UNG inicial a 50°C durante 2 min, activación de la polimerasa, por ejemplo, AmpliTaq Gold Polymerase (empresa Applied Biosystems, Darmstadt), a 95°C. El tiempo del análisis es de 50 ciclos. A eso le sigue la desnaturalización a 95°C durante 15s y la fase de annealing a 60°C durante 1 min. Cada medición se lleva a cabo alternativamente en un duplicado. El análisis de datos consiste en determinar el ciclo umbral (valor C_t) y el contenido cuantitativo de MAP en el ADN [unidad: ng/µl] de la muestra examinada. Esto se realiza según los métodos conocidos por los expertos.

20

El análisis final de los resultados se lleva a cabo según uno de los métodos conocidos por los expertos que se presenta de forma ejemplar en la figura 1 para la ilustración de la amplificación específica de MAP.

25

La recogida electrónica de datos y la documentación se realizan según las normas dentro del marco de la garantía de calidad diagnóstica para la práctica en el laboratorio moderno. La figura 2 presenta el análisis de la curva de fusión. Las figuras 3 y 4 presentan la eficiencia de amplificación.

A la validación del método llevaron los resultados de 49 cepas de referencia y de campo de MAP, los de 34 cepas de referencia y de campo de no-MAP y los de 65 cepas de referencia y de campo no-Mycobacterium.

30

Una forma de realización de la invención se refiere a un kit de prueba, de manejo sencillo, para la detección específica y sensible de MAP en muestras de tejidos y fecales que contienen por lo menos:

SEQ ID NO: 1 primer forward "ISMav2"
SEQ ID NO: 2 primer reverse "ISMav2"
SEQ ID NO: 3 TaqMan _{mgb} o
SEQ ID NO: 4 sonda LNA "ISMav2"
SEQ ID NO: 5 primer forward "F57"
SEQ ID NO: 6 primer reverse "F57"
SEQ ID NO: 7 TaqMan _{mgb} o
SEQ ID NO: 8 sonda LNA "F57"

El kit de prueba para la detección específica de *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) en muestras fecales, de tejidos y órganos mediante PCR en tiempo real comprende oligonucleótidos como primers para la amplificación del ADN de MAP según SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6 que hibridizan con secuencias genéticas para ISMav2 y F57 del genoma MAP. Alternativamente, el kit de prueba comprende sondas que se unen al ADN amplificado y generan señales en función de la cantidad de ADN unido. Estas señales se pueden medir y cuantificar. Preferiblemente, estas sondas están unidas con un colorante fluorescente y presentan SEQ ID NO:3 y SEQ ID NO:7 o alternativamente SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO:8.

En una forma de realización preferida, el kit de prueba comprende además reactivos para la obtención del ADN genómico completo de muestras fecales, de órganos y tejidos, donde los reactivos reducen el contenido de inhibidores de la PCR y contienen proteinasa-K.

Adicionalmente, la prueba contiene alternativamente un control interno de amplificación que comprende una cantidad definida de ADN de MAP.

No obstante, el kit de prueba incluye tanto la formulación como sistema de detección individual utilizando los oligonucleótidos para la detección de "ISMav2" o "F57" como la utilización como PCR multiplex.

Por la enseñanza que aporta la presente invención, así como por el conocimiento técnico en este área técnica, el fabricante del kit según la presente invención es consciente de cómo se producen, formulan y almacenan los componentes individuales del kit, como, por ejemplo, tampones.

Figuras

Fig. 1

Amplificación específica de dos cepas de MAP bovinas, cepa MAP 1 y cepa MAP 2 con los marcadores "ISMav2" y "F57"

Fig. 2

Curva de disociación e indicación del punto de fusión de la secuencia de marcadores "ISMav2" a 84,0 °C, para la secuencia de marcadores "F57" a 80,5 °C y para los controles internos de amplificación (CIA) a 85,1 °C

Fig. 3

Eficiencia de amplificación de "F57" en el PCR triplex en tiempo real, con un valor: E=98,2 %

Fig. 4

Eficiencia de amplificación de "ISMav2" en el PCR triplex en tiempo real, con un valor: E=97,8°C

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Justus-Liebig-Universität (Universidad Justus-Liebig) de Giessen (Alemania)

<120> Método para la detección de paratuberculosis

<130> TM203

<150> DE 10 2007 015 775.6

<151> 2007-03-30

<160> 10

<170> Versión 3.4 de PatentIn

<210> 1

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Primer para PCR en tiempo real

<220>

<221> SEQ ID No:1 primer forward ISMav2

<222> (1)..(20)

<223> Determinación de la secuencia MAP ISMav2

Posición de enlace 1645 a 1665 en la secuencia ISMav2

<400> 1

cggcaaaatc gagcagtttc

20

<210> 2

<211> 21

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> Primer para PCR en tiempo real

<220>

<221> SEQ ID NO:2 primer reverse ISMav2

	<222> (1)..(21)	
	<223> Identificación de la secuencia ISMav2 del MAP Posición de enlace 1786 a 1807 en la secuencia ISMav2	
	<400> 2	
5	tgagccggtg tgatcatctt t	21
	<210> 3	
	<211> 15	
	<212> ADN	
	<213> Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis	
10	<220>	
	<221> SEQ ID NO:3 Sonda TaqMan _{mgb} ISMav2	
	<222> (1)..(15)	
	<223> Identificación de la secuencia ISMav2 del MAP Posición de enlace 1678 a 1693 en la secuencia ISMav2	
15	<400> 3	
	cgctgagttc cttag	15
	<210> 4	
	<211> 15	
	<212> ADN	
20	<213> Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis	
	<220>	
	<221> SEQ ID NO:4 Sonda LNA ISMav2	
	<222> (1)..(15)	
	<223> Identificación de la secuencia ISMav2 del MAP Posición de enlace 1678 a 1693 en la secuencia ISMav2	
25	<400> 4	
	cgctgagttc cttag	15
	<210> 5	
	<211> 19	
30	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Primer para PCR en tiempo real	
	<220>	
35	<221> SEQ ID NO:5 primer forward F57	
	<222> (1)..(19)	
	<223> Identificación de la secuencia F57 del MAP Posición de enlace 244 a 263 en la secuencia F57	
	<400> 5	
40	tacgagcacg caggcattc	19
	<210> 6	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Primer para PCR en tiempo real	
	<220>	
	<221> SEQ ID NO:6 primer reverse F57	
	<222> (1)..(19)	
50	<223> Identificación de la secuencia F57 del MAP Posición de enlace 288 a 307 en la secuencia F57	
	<400> 6	
	cgggccagtt cgctgtcat	19
	<210> 7	
55	<211> 14	
	<212> ADN	
	<213> Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis	
	<220>	
	<221> SEQ ID NO:7 Sonda TaqMan _{mgb} F57	
60	<222> (1)..(14)	
	<223> Identificación de la secuencia MAP F57 Posición de enlace 268 a 282 en la secuencia F57	
	<400> 7	
65	cctgaccacc cttc	14

ES 2 388 118 T3

<210> 8
 <211> 14
 <212> ADN
 <213> Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis
 5 <220>
 <221> SEQ ID NO:8 Sonda LNA F57
 <222> (1)..(14)
 <223> Identificación de la secuencia F57 del MAP
 Posición de enlace 268 a 282 en la secuencia F57
 10
 <400> 8
 cctgaccacc cttc 14
 <210> 9
 15 <211> 2263
 <212> ADN
 <213> Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis
 <220>
 20 <221> SEQ ID NO:9 ISMav2 putative transposase gene
 <222> (1)..(2263)
 <223> Posición 1645 a 1665 para el enlace del primer forward ISMav2
 Posición 1786 a 1807 para el enlace del primer reverse ISMav2
 Posición 1678 a 1693 para el enlace de la sonda TaqMan ISMav2 o
 25 sonda LNA ISMav2
 <300>
 <308> AF286339
 <309> 2005-05-11
 <313> (1)..(2263)
 30 <400> 9

 gagctcggcc agcacttcat ccgggtgaat tccgtgcacc ccaccaacgt gaacacaccg 60
 atgttcatga acgaggggac gatgaggctg ttccggcccg acctgaagaa ccccggcccg 120
 gacgacctga aggtcgccgc gcagttcatg catgtgctgc cggtcggctg ggtggagccg 180
 gtggacatca gcaacgccgt gctgttcctg gcctccgacg aatcgcgta catcacaggt 240
 cttccggta cctcgcagc cggcagcatg ctcaagtagc cgcgccggca tctcgtcac 300
 cggcggtag gatcatcccg gtggccaggg gcgggatcga accgccgacc ttccgctttt 360
 caggcggacg ctcgtaccga ctgagctacc tggccggaag gcagcgagtg gctcgcgcg 420
 ctggcgacc tgacgggact cgaaccgcg acctccgccg tgacagggcg gcgcgctaac 480
 caactcgcgc acagggcctt gctgctgctc cgcgtcgcg cgttgcgta cccctacggg 540
 attcgaacc gcgctaccgc cttgaaaggg cggcgtccta ggccgctaga cgaagggggc 600

```

cagaaccgaa tctctccggg gtactcgcaa cgtggtttcg ttgggagcca cgtcagctta 660
ggtcaccgtg ggccaatcc tcaaacgagc ccggttttgg gtccaagtat cctgaaactc 720
cgcggccctt atagctcagt tggtagagct acggactttt aatccgcagg tcctaggttc 780
gagtcctagt gggggcacca gatgtatgta tgacgtcggc tgatgtgtga cgttttgtct 840
tcggttgatg tgtgacgggtg tttcggttga tgcgtgacag ttgtttcggc tgatcgggtga 900
cactccctag atgagggagt taagtgtggc tgagcagcgg tatcaggccg tgatggcggg 960
aatcagtgac gggttgtcgg tgtcgcaggc cgagagaaag ttcgggggtg cgcgctcagac 1020
gctgcaccga tggctggccc ggtatgaagc cgcgggcctg aaggggctgg tggatcggtc 1080
gcatcggccg gtgagttgtc cgcacatcagat gctggcggta gtggaggcgg cggtgttgga 1140
gttgccgccc tcgcccctt attgggggccc gcggcgggtg gtgttcgagt tggccaagcg 1200
aggtgtccat ccggtgccgt cggagtcgcc ggtgtatcga gcgctggtgc gggccgggtc 1260
gatcgacccc gcgatgcgag atcgacggtc gcgcaaatgg aagcgtggg agcgcggggc 1320
gccgatggag ttgtggcagc tcgacatcgt cggcgggttc ccgctggccg atgggaccag 1380
cgccaaagcc ctgaccggca tcgatgatca tccccggatg tgtgtgtgcg ccaagctgat 1440
ggcccgtgag cgcacccgcg cggctctgca cggattacgg gcggcgctgg ccgcttacgg 1500
gggtgcctgag cagatcttga ccgataacgg caaggtgttc accgagcggg tttgtcatcc 1560
accggtcagag gtgctctttg atgcgatctg ccgcgagcac ggcacgaac atctgttgac 1620
ccagccgcgc agcccgacca cgaccggcaa aatcgagcag ttcaccgca gtctgcgcgc 1680
tgagttcctt agcggccgtg agcctttcac caacctcaag gtcgctcagc aggcgctcga 1740
tgagtgggtc gaggactaca acaccaccg gccgcaccaa gccctaaaga tgatcacacc 1800
ggctcaacgg tttcacgccg gtgcgccggc atcaccaccg tcgaactcgt gtgcccgaca 1860
cgtcgaccgc agtgggtgat actgggtgag tcggcgggtg tgctccaacg gcatcgtgtg 1920
cgtgtcctgg cagcaggtct gtatcgggcg ccactatgcc ggcgcccgtc gcgatgtcca 1980
cgtcgatggg gacctgctga ggttttgggt cggcgacaat ctggtcaaaa ccgccgcgcg 2040
caccagccgc ggcgaggtac gaaacaaaca ggccctgcgc accaacgcac cggcctaaaa 2100
cacaaccag agtgtcaccg atcaaccgac atagaaatgt caccgagcaa ccgaccctga 2160
acaggggac-cagagagcag ccccgcccgc tcaggtggtc gacgatgtgg ctgcgctcgc 2220
cgtggtagac caggtcattg aaatcgacct cgaacccgag ctc 2263

```

- <210> 10
- <211> 620
- 5 <212> ADN
- <213> Fragmento de ADN F57 específico de la especie M.paratuberculosis
- <220>
- <221> SEQ ID NO:10 fragmento de ADN F57 específico de la especie M.paratuberculosis
- <222> (1)..(620)
- 10 <223> Posición 244 a 263 para el enlace del primer forward F57
- Posición 288 a 307 para el enlace del primer reverse F57
- Posición 268 a 282 para el enlace de la sonda TaqMan-Sonde F57 o sonda LNA F57
- <300>
- <308> X70277
- 15 <309> 1993-06-24
- <313> (1)..(620)
- <400> 10

ES 2 388 118 T3

ggatctcggc	cccgatagct	ttcctctcct	tcgtcaccaa	ctggcgcggg	tccaggaacg	60
cttggcactc	gtcaatcacc	acgaacacca	gcggaacctg	cggcgtcggg	ccgcatccc	120
aaaagtggga	cgatccgaat	atggtgttgc	cctgtctaata	tcgatcacgg	actagaccgg	180
tcgcgtcatt	cagaatcgct	gcaatctcag	gcagctccag	atcgtcattc	atgaatcggc	240
agctacgagc	acgcaggcat	tccaagtcct	gaccaccctt	cccgtcgatg	acagcgaact	300
ggaccgccgc	tgacgcaccg	aacgaccca	gagcactcgt	cagccacgcg	gttttccccg	360
accctggtac	gcctcccact	acaacgcccg	atacgttcgc	caacgggagc	gactggtaga	420
cgcccatttc	atcgataccc	aaactcagag	accacgagtg	ggcggctggc	acagacgacc	480
attcaagcgg	cgaactaagc	ggatcgacaa	ttctcagctg	caactcgaac	acacctggga	540
ccggctcggg	gacaacaaca	ttcgggtacac	caatagctga	cgccagcttc	ggagccgcca	600
cctgccactg	tctgagatcc					620

REIVINDICACIONES

1. Conjunto de oligonucleótidos para su uso en la detección específica de *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) en muestras fecales, de tejidos y de órganos mediante PCR en tiempo real, donde los oligonucleótidos presentan las siguientes secuencias de nucleótidos:

5

SEQ ID NO:1 primer forward ISMav2 5'-CGG CAA AAT CGA GCA GTT TC-3'
 SEQ ID NO:2 primer reverse ISMav2 5'-TGA GCC GGT GTG ATC ATC TTT-3'
 SEQ ID NO:5 primer forward F57 5'-TAC GAG CAC GCA GGC ATT C-3'
 SEQ ID NO:6 primer reverse F57 5'-CGG TCC AGT TCG CTG TCA T-3'

10
2. Método para la detección específica de *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) en muestras fecales, de tejidos y de órganos mediante PCR en tiempo real, **donde** se detectan las secuencias de marcadores ISMAV2 SEQ ID NO:9 y F57 SEQ ID NO:10 del genoma MAP y se aplican los oligonucleótidos SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:5 y SEQ ID NO:6 según la reivindicación 1.

15
3. Método según la reivindicación 2, **donde** las muestras fecales, de tejidos y de órganos son de procedencia bovina, porcina, avícola o humana.

20
4. Método según las reivindicaciones 2 y 3, **donde** para la preparación de las muestras fecales, de tejidos y de órganos se utilizan reactivos que reducen el contenido de inhibidores de PCR y que contienen proteinasa K.

25
5. Método según las reivindicaciones 2 a 4, **donde** se aísla ADN de las muestras fecales, de tejidos y de órganos.

30
6. Método según las reivindicaciones 2 a 5, **donde** el PCR en tiempo real se lleva a cabo en presencia de un control interno de amplificación.

35
7. Método según las reivindicaciones 2 a 6, **donde** el control interno de amplificación contiene una cantidad definida de ADN de MAP.

40
8. Método según las reivindicaciones 2 a 7, **donde** el PCR en tiempo real se lleva a cabo en presencia de sondas que se unen al ADN amplificado y dependiendo de la cantidad de ADN unido generan señales que son medidas y cuantificadas.

45
9. Método según la reivindicación 8, **donde** como sonda se utiliza la TaqMan_{mgb} según SEQ ID NO:3 y SEQ ID NO:7 o la sonda LNA según SEQ ID NO:4 y SEQ ID NO:8.

50
10. Método según la reivindicación 9, **donde** las sondas están unidas con colorante fluorescente.

55
11. Kit de prueba para la detección específica de *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) en muestras fecales, de tejidos y de órganos mediante PCR en tiempo real, **donde** el kit de prueba comprende oligonucleótidos para la amplificación de ADN de MAP según la reivindicación 1, los cuales hibridizan con secuencias genéticas para ISMav2 y F57 del genoma MAP.

55
12. Kit de prueba según la reivindicación 11, **donde** el kit de prueba comprende sondas que están unidas al ADN amplificado y dependiendo de la cantidad de ADN unido generan señales que son medidas y cuantificadas.

55
13. Kit de prueba según las reivindicaciones 11 y 12, **donde** el kit de prueba comprende la sonda TaqMan_{mgb} según SEQ ID NO:3 y SEQ ID NO:7 o la sonda LNA según SEQ ID NO:4 y SEQ ID NO:8.

55
14. Kit de prueba según las reivindicaciones 11 a 13, **donde** las sondas están unidas con colorante fluorescente.

55
15. Kit de prueba según las reivindicaciones 11 a 14, **donde** el kit de prueba comprende reactivos para la obtención del ADN genómico completo de muestras fecales, de órganos y de tejidos, donde los reagentes reducen el contenido de inhibidores de PCR y que contienen proteinasa K.

55
16. Kit de prueba según las reivindicaciones 11 a 13, **donde** el kit de prueba muestra un control interno de amplificación que contiene una cantidad definida de ADN de MAP.

55

Dibujos adjuntos

Figura 1

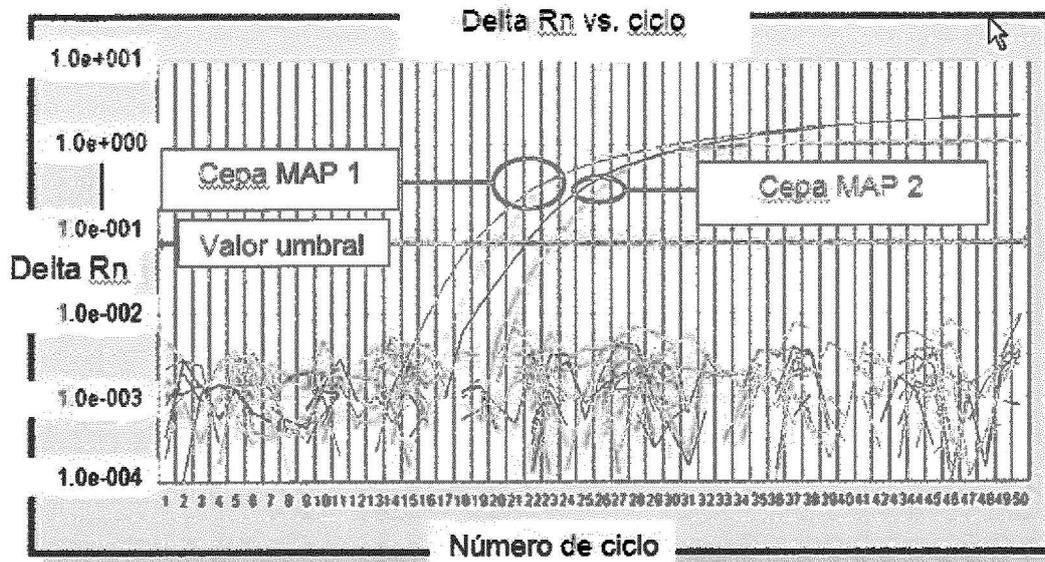


Figura 2

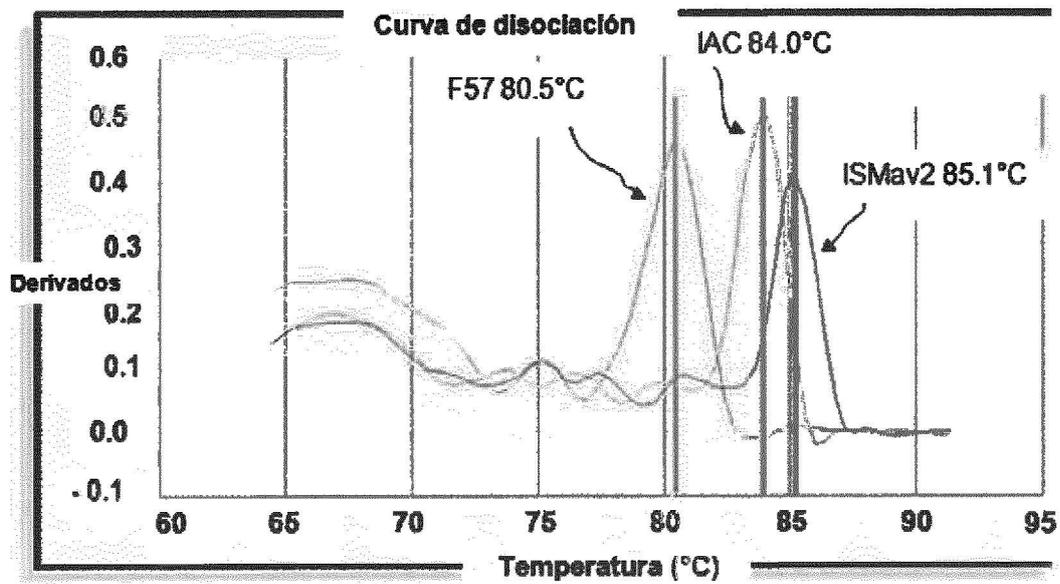


Figura 3

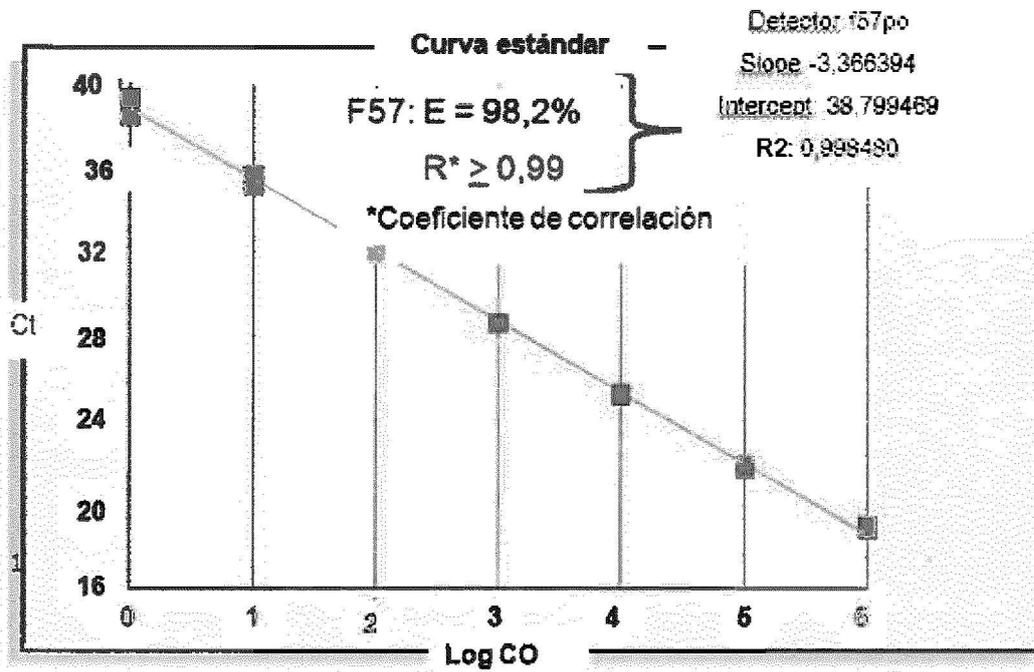


Figura 4

