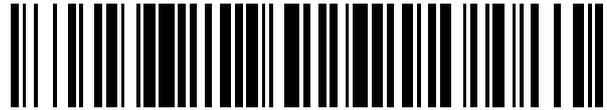


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 393 016**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08466007 .5**

96 Fecha de presentación: **11.04.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2009118**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **31.12.2008**

54 Título: **Método para la detección y cuantificación de mycobacterium avium subespecie para tuberculosis basándose en reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real**

30 Prioridad:

23.04.2007 CZ 20070295

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

17.12.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

17.12.2012

73 Titular/es:

**VYZKUMNY ÚSTAV VETERINÁRNÍHO
LÉKARSTVÍ, V.V.I. (100.0%)**

**Hudcova 70
621 32 Brno, CZ**

72 Inventor/es:

**SLANA, IVA;
KRALIK, PETR y
PAVLIK, IVO**

74 Agente/Representante:

ZUAZO ARALUZE, Alexander

ES 2 393 016 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).

DESCRIPCIÓN

Método para la detección y cuantificación de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* basándose en reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

5

Área técnica

La invención se refiere a un método de detección y cuantificación de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (*MAP*) mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR en tiempo real). Específicamente, son dos sistemas de PCR en tiempo real independientes, que detectan dos locus *IS900* y *F57*, respectivamente específicos para *MAP*.

10

Estado presente de la técnica

MAP es una bacteria parásita intracelular, que es el agente causante de una enfermedad inflamatoria crónica de los intestinos de los rumiantes denominada paratuberculosis o enfermedad de Johne. Los animales infectados padecen diarrea crónica y pérdida de peso gradual. La paratuberculosis en rumiantes se caracteriza por un tiempo de incubación largo y una amplia variabilidad individual en las fases preclínica y clínica del desarrollo de la enfermedad (Ayele *et al.*, 2001).

15

20

En rumiantes, *MAP* se propaga sobre todo a través de las heces, el esperma y la leche. *MAP* está presente en la leche y los productos lácteos pueden convertirse en vectores posibles de *MAP* para el hombre y por tanto son importantes desde un aspecto de seguridad alimentaria (Grant, 2006). Las micobacterias son relativamente resistentes a diferentes temperaturas y se han detectado mediante cultivo en leche pasteurizada a 71 y 72°C (Ayele *et al.*, 2005).

25

MAP se considera como uno de los posibles agentes causantes de la enfermedad de Crohn en seres humanos, que también se manifiesta mediante enfermedad inflamatoria del tubo digestivo (Chamberlin *et al.*, 2001; Bull *et al.*, 2003). La etiología exacta de esta enfermedad sigue estando poco clara; sin embargo, se ha aceptado actualmente el modelo de enfermedad autoinmunitaria. Este modelo no supone la presencia de *MAP* vivo en el organismo del paciente. Este puede ser el motivo por el que no se encontró *MAP* mediante cultivo en varios pacientes con enfermedad de Crohn, sino que sólo se detectaron los locus específicos mencionados a continuación (Baksh *et al.*, 2004). Partiendo de este aspecto, los niños y los pacientes inmunocomprometidos son los grupos en mayor riesgo (Chamberlin *et al.*, 2001; Hruska *et al.*, 2005).

30

35

Las infecciones por *MAP* se diagnostican en la actualidad mediante varios métodos microbiológicos, inmunológicos y moleculares. La detección en cultivo del agente causante de la paratuberculosis se considera como el "método de referencia" en la actualidad. El crecimiento *in vitro* a largo plazo de *MAP* (al menos de 2 a 3 meses) es una desventaja de este método relativamente fiable. Métodos serológicos indirectos basados en la detección de anticuerpos contra el agente causante de la paratuberculosis específicamente en la sangre son específicos y su sensibilidad es baja (Lombard *et al.*, 2006). A menudo se obtienen resultados falsos negativos o reaccionan de manera cruzada con anticuerpos de micobacterias genéticamente relacionadas del entorno. Estos resultados deben confirmarse mediante detección directa de *MAP*.

40

Entre los métodos biológicos moleculares, se usan actualmente varios sistemas basados en PCR convencional o "anidada" para la detección directa del agente causante de la paratuberculosis. Dos locus específicos para *MAP* son los más comúnmente usados para la detección. Se encuentran de doce a 18 copias de la secuencia de inserción *IS900* (X16293; Green *et al.*, 1989) en el genoma de *MAP* (Bull *et al.*, 2000) y se considera como el "método de referencia" para la detección de *MAP* por medio de PCR. Sólo está presente una copia del elemento genético *F57* (X70277) en el genoma de *MAP* (Poupart *et al.*, 1993). No obstante, es necesaria la confirmación de los resultados obtenidos mediante PCR, especialmente si se usa para diagnóstico rutinario. Habitualmente, es necesario usar hibridación de ácidos nucleicos con sondas específicas, lo que sin embargo hace que el procedimiento completo sea más exigente y que pueda aplicarse sólo para fines experimentales.

45

50

Hay varios métodos publicados para la detección de *MAP* en diferentes materiales disponibles (McKenna *et al.*, 2004; Vasnick *et al.*, 2004; Tasara *et al.*, 2005) que usan las secuencias de *IS900* y *F57* como dianas para la detección de *MAP*. Estos sistemas se basan en la PCR convencional o anidada y se requiere que tales enfoques tengan una clase de control externo de la especificidad de producto de PCR. Puede realizarse por ejemplo mediante hibridación con una sonda específica o mediante secuenciación y/o análisis de PCR-RFLP, que requiere mucho tiempo y gastos adicionales (Rodríguez Lazaro *et al.*, 2005).

55

60

Se ha empleado recientemente el método de PCR en tiempo real para la detección y posible cuantificación de *MAP* en material biológico (Kim *et al.*, 2002; O'Mahony y Hill, 2002; Herthnek y Bolske, 2006). Se basa en la visualización de los productos de PCR por medio de tinciones fluorescentes. Sus beneficios son una alta especificidad y sensibilidad. Hasta donde se sabe, se han usado dos estrategias de marcaje fluorescente: (1) incorporación de la tinción fluorescente específica de ADNbc SYBR Green a los productos de PCR recién formados o (2)

65

oligonucleótidos cortos (sondas de hibridación) que se marcan con tinciones fluorescentes y se encuentran en las zonas amplificadas por los cebadores. Además de los cebadores, garantizan la “especificidad secundaria” en PCR en tiempo real.

5 El primer enfoque permite la detección de la presencia de *MAP* en el material analizado y la determinación de la especificidad del producto de PCR sólo según la longitud del producto de PCR basándose en la curva de desnaturalización. Naturalmente, esta evaluación de la especificidad no es específica de secuencia y depende sobre todo del porcentaje de nucleótidos diferentes presentes en el producto de PCR resultante (O’Mahony y Hill, 2002; Rawa y Stanker, 2005). Por tanto, es necesario usar hibridación adicional en la comprobación de la especificidad de
10 secuencia, cuando no puede aplicarse el control de amplificación interno (CAI). Actualmente, el uso de un CAI es necesario para fines de diagnóstico, porque representa la única herramienta para diferenciar las muestras falsas negativas de las verdaderamente negativas. Siempre que la secuencia del segmento amplificado sea única para *MAP*, el segundo enfoque permite el análisis cualitativo y cuantitativo sin ninguna necesidad de confirmación de la especificidad adicional.

15 Los tipos de sondas más frecuentemente usados para la detección de *MAP* son: (1) sonda de hidrolización y (2) sondas de FRET (transferencia de energía por resonancia de fluorescencia).

20 Cuando se usan sondas de hidrolización, se digieren mediante la actividad exonucleasa de la ADN polimerasa durante la amplificación y se libera el fluoróforo. Su ventaja es que pueden aplicarse con cualquier instrumento de PCR en tiempo real disponible. Por otro lado, las sondas de FRET se basan en la hibridación simultánea de dos sondas: una de ellas porta un fluoróforo en su extremo 3’ (donador) y la segunda está marcada con otro fluoróforo (aceptor) en el extremo 5’. La emisión de energía del donador la acepta el receptor y se mide la longitud de onda de este último. La sonda de FRET puede aplicarse sólo a instrumentos de Roche Diagnostics (O’Mahony y Hill, 2004; Tasara y Stephan, 2005). El uso de cualquier sonda marcada con un fluoróforo diferente que la sonda para la secuencia diana permite la coamplificación de CAI en una reacción de PCR en tiempo real (Rodríguez Lazaro *et al.*, 2005; Brey *et al.*, 2006).

30 Objeto de la invención

Las desventajas mencionadas anteriormente se eliminan mediante el método de detección y cuantificación de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (*MAP*) mediante dos reacciones en cadena de la polimerasa en tiempo real competitivas (PCR) cada con su propio control de amplificación interno, que se caracteriza por el hecho de que la detección y cuantificación de *MAP* se realiza mediante dos sistemas de PCR en tiempo real
35 independientes, que detectan dos locus específicos para *MAP*: *IS900* y *F57*, respectivamente usando cebadores y sondas de hidrolización con las siguientes secuencias:

cebadores para *F57*

40 F57qPCRF GCCATTTTCATCGATACCC
F57qPCRR GTACCGAATGTTGTTGTCAC,

la sonda para *F57*

45 F57qPCRTM FAM - CAATTCTCAGCTGCAACTCGAACACAC - BHQ,

cebadores para *IS900*

50 IS900qPCRF GATGGCCGAAGGAGATTG
IS900qPCRR CACAACCACCTCCGTAACC,

la sonda para *IS900*

55 IS900qPCRTM FAM - ATTGGATCGCTGTGTAAGGACACGT - BHQ,

en el que la sonda para los controles de amplificación internos tiene la siguiente secuencia

60 IACqPCRTM Cy5 - GGCTCTTCTATGTTCTGACCTTGTGGA - BHQ.

El método realizado usando los cebadores y sondas enumerados anteriormente se caracteriza adicionalmente por el hecho de que la evaluación de *MAP* se realiza en cualquier muestra de origen animal, por ejemplo de animales de granja, en muestras clínicas de pacientes humanos, muestras de origen vegetal, muestras del medio ambiente, particularmente fertilizantes, tierra y heno, muestras de hallazgos arqueológicos o muestras de alimentos y piensos.
65

Los kits para la detección y el diagnóstico de *MAP* con el método según la invención son también parte del objeto de la invención; se caracterizan por el contenido de todas las sondas y cebadores oligonucleotídicos, que se usan para realizar el método según la invención.

5 El método según la invención se refiere a dos sistemas de PCR en tiempo real independientes para la detección y cuantificación de *MAP* en material biológico. Se basan en la amplificación de locus específicos de *MAP*. El primero se basa en la amplificación de la secuencia de inserción IS900 y el segundo en la amplificación del elemento genético *F57*. Cada muestra se analiza mediante ambos sistemas. La ventaja es que la positividad de cada muestra se confirma mediante dos reacciones independientes y por tanto se excluye el riesgo de posible falsa positividad. La PCR en tiempo real de IS900 es más sensible; sin embargo, no permite la cuantificación exacta de *MAP* en las muestras analizadas. Por otro lado, sólo está presente una única copia del elemento genético *F57* en el genoma de *MAP* y por tanto es adecuado para la cuantificación precisa de células de *MAP* en muestras.

15 Ambos sistemas de PCR en tiempo real se basan en el uso de sondas de hidrolización marcadas con FAM (6-carboxifluoresceína) y por tanto pueden usarse para todos los instrumentos de PCR en tiempo real disponibles sin la necesidad de confirmación de la especificidad adicional.

20 Ambos sistemas incluyen su propio CAI de plásmido que se basa en PCR competitiva (la secuencia de los cebadores para la secuencia diana IS900 o *F57* es idéntica con CAI correspondientes). El uso de sólo un conjunto de cebadores para la amplificación de dos productos de PCR en una reacción de PCR en tiempo real reduce el riesgo de formación de productos de PCR no específicos y la consecuente disminución de la eficacia de la técnica de PCR en el análisis de muestras reales. Las secuencias internas de ambos CAI son idénticas y eso permite el uso de sólo una sonda marcada con Cy5 para CAI en ambos sistemas de PCR. El uso de sólo un conjunto de cebadores para cada reacción de PCR en tiempo real y una sonda para CAI reduce los costes financieros totales de productos químicos necesarios para el análisis.

25 El protocolo de análisis es idéntico para ambos sistemas de PCR en tiempo real. Es una ventaja en el caso de que se procesen pocas muestras. En un experimento, las mismas muestras pueden analizarse simultáneamente mediante ambos sistemas de PCR en tiempo real, y por tanto los costes financieros y el tiempo necesario para el análisis se reducen notablemente.

30 Los patrones para ambos sistemas de PCR en tiempo real se prepararon clonando los productos de PCR para IS900 y *F57* en un vector de plásmido. Se diluyó el ADN de plásmido aislado en el intervalo entre 1×10^5 y 1×10^0 copias de plásmido por 1 μ l de reacción. Se amplificó la serie de dilución apropiada en cada experimento. Se usó como control positivo de la amplificación y fuente de datos para la construcción de la curva de calibración y de ese modo para la determinación de la eficacia de PCR del gradiente de plásmidos calculada según la ecuación de la curva de regresión. Se usó la curva de calibración para la cuantificación exacta de *MAP* en muestras desconocidas.

35 El método según la invención, basado en la amplificación de dos locus específicos para *MAP* usando PCR en tiempo real, se ha optimizado para el diagnóstico rutinario de *MAP* en diferentes tipos de material biológico. La principal ventaja es el uso universal (es posible su aplicación en diferentes laboratorios y diferentes instrumentos sin necesidad de modificaciones adicionales), no exige mucho tiempo y los bajos costes se combinan con alta especificidad; sensibilidad y reproducibilidad.

40 Los siguientes ejemplos de realización del método según la invención documentarán el método.

Ejemplos de realización del método

Ejemplo 1

50 El método según la invención consiste en varias etapas:

Material de ADN. Se usaron moldes de ADN de 17 especies bacterianas y 4 de mamífero para la confirmación de la especificidad de los sistemas de PCR en tiempo real desarrollados (tabla 1).

55 Se usaron muestras de leche de 71 vacas de un rebaño infectado por paratuberculosis para someter a prueba el aislamiento del ADN y los sistemas de PCR en tiempo real desarrollados. Al comienzo del ordeño, se recogieron las primeras eyecciones de leche de cada vaca (las primeras 3 a 4 eyecciones de cada una de las tetillas que se desechan habitualmente) en un recipiente de plástico desechable estéril con una capacidad en volumen de 200 ml. Se pusieron las muestras de leche en cajas de refrigeración y se enviaron a los laboratorios donde se almacenaron a 4°C y se procesaron en el plazo de 3 días. Se procesaron dos muestras independientes de cada momento de muestreo: se usó una para el aislamiento del ADN y la otra como muestra de reserva para el caso de que el aislamiento del ADN o la PCR en tiempo real fallasen.

65 Diseño de cebadores y sondas. Se diseñaron cebadores y sondas para la secuencia de inserción IS900 (X16293) y el fragmento *F57* (X70277) mediante el programa Primer3: <http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3www.cgi>,

(tabla 2).

Preparación de patrones de plásmidos. Para la preparación de patrones de plásmidos para PCR en tiempo real de IS900 y F57, se amplificaron los productos de PCR de IS900 y F57 mediante PCR convencional usando el kit HotStar PCR Master Mix (Qiagen, Hilden, Alemania), 10 pmol de cebadores IS900qPCRf e IS900QPCRR o F57qPCRf y F57qPCRR y 2 µl de suspensión de MAP lisado (cepa de colección CAPM 6381; Colección de Microorganismos Patógenos de Animales, Brno; <http://www.vri.cz/labs/patogen/default.htm>) en un volumen total de 20 µl. Se realizó la amplificación por PCR en las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95°C durante 15 min., seguido por 30 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 20 s, apareamiento a 60°C durante 30 s, extensión a 72°C durante 1 min. y extensión final a 72°C durante 5 min. Sin purificación adicional, se clonaron los productos de PCR obtenidos en el vector pCR 2.1 (Invitrogen, Carlsbad, EE.UU.) según las instrucciones del fabricante.

Se purificaron los plásmidos que contenían los insertos IS900 (Tuor) y F57 (Beren) usando el kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen, Hilden, Alemania), se eluyeron en 200 µl de tampón TE (Amresco, Inc, Solon, EE.UU.) y se secuenciaron para la confirmación de la secuencia correcta del inserto. Se evaluaron la concentración exacta del ADN de plásmido y la pureza por triplicado en el espectrofotómetro BioPhotometer (Eppendorf, Hamburgo, Alemania). Se usó el valor de concentración media en el trabajo posterior con ADN de plásmido. Simultáneamente, se comprobó visualmente la calidad del ADN de plásmido mediante electroforesis en gel de agarosa. Para aumentar la estabilidad de los plásmidos en el tampón TE durante el almacenamiento a -20°C y para disminuir su pérdida durante el manejo posterior, se añadieron 10 µg de ADN de esperma de pez (Serva, Heidelberg, Alemania). La concentración resultante de ADN de esperma de pez era de 50 ng/µl.

Preparación de controles de amplificación internos. CAI para PCR en tiempo real de IS900 y F57 se basan en el principio de PCR competitiva. Se han fusionado cebadores "directos" e "inversos" de IS900 y F57 en los extremos 3' con oligonucleótidos cortos (TGTTAGAGAGG y ACTCTAAACCCAA) del gen de patata *SfTS1* (trehalosa sintasa 1 de *Solanum tuberosum*; AF483209). Se prepararon ambos productos de PCR a partir de ADN de patata según el protocolo de PCR mencionado anteriormente usando la temperatura de apareamiento reducida hasta 50°C. Posteriormente, se procesaron de manera idéntica a los patrones de plásmidos para IS900 y F57. Se almacenaron los plásmidos de CAI para IS900 (Idril) y F57 (Luthien) en tampón TE (Amresco, Solon, EE.UU.) a -20°C antes de su uso adicional.

PCR en tiempo real de IS900 y F57. Se optimizaron las condiciones para la PCR en tiempo real de IS900 y F57 hasta que se determinaron la mejor concentración de cebadores y sondas, concentración de CAI, concentración de MgCl₂ y condiciones del protocolo de PCR. La mezcla de reacción de PCR optimizada para ambos sistemas de PCR en tiempo real consistía en 1x DyNAmo Probe qPCR Kit (Finnzyme, Espoo, Finlandia), 10 pmol de cebadores IS900qPCRf e IS900QPCRR o F57qPCRf y F57qPCRR (concentración final 0,5 µM), 1 pmol de sondas IS900qPCRTM o F57qPCRTM marcadas con FAM (concentración final 0,05 µM), 4 pmol de sonda marcada con Cy5 para IACIACQPCRTM (concentración final 0,2 µM), 0,2 U de uracilo ADN glicosilasa (Sigma, St. Louis, EE.UU.), 50 copias de plásmido Luthien o Idril y 5 µl de molde de ADN en un volumen total de 20 µl.

La amplificación y detección de la fluorescencia, que era idéntica para ambos sistemas de PCR en tiempo real, se realizó en el instrumento LightCycler 480 (Roche Molecular Diagnostic, Alemania) en placas de PCR de 96 pocillos en las siguientes condiciones: 37°C durante 10 min., seguido por desnaturalización inicial a 95°C durante 15 min. y 47 ciclos a 95°C durante 5 s y 60°C durante 40 s (exploración de fluorescencia). Se realizó el análisis posterior usando el análisis de puntos Fit en el software para LightCycler 480 (versión 1.2.0.0625).

Especificidad de la PCR en tiempo real de IS900 y F57. Se realizaron experimentos de PCR en tiempo real con suspensiones bacterianas lisadas y aislamiento de ADN de la sangre periférica de mamíferos seleccionados para comprobar la especificidad de los cebadores y sondas diseñados para la PCR en tiempo real de IS900 y F57 (tabla 1). Se resuspendió una colonia bacteriana en 20 µl de agua destilada y se desnaturalizó en un bloque caliente a 100°C durante 20 min. Posteriormente, se centrifugó la suspensión producida a 14000 g durante 10 min. y se usó el sobrenadante como molde de ADN para experimentos de PCR en tiempo real. Se aisló ADN de mamífero de sangre periférica usando el kit QIAamp DNA Blood Mini (Qiagen, Hilden, Alemania) según las instrucciones del fabricante.

Sensibilidad y reproducibilidad de la PCR en tiempo real de IS900 y F57. Se evaluó la sensibilidad de los sistemas de PCR en tiempo real de IS900 y F57 mediante la serie de dilución decimal de los plásmidos Tuor y Beren. Se diluyeron ambos gradientes de plásmidos en el intervalo entre 10⁵ y 10⁰ copias/µl con tampón TE (Amresco, Inc, Solon, EE.UU.) que contenía ADN de esperma de pez 50 ng/µl (Serva, Heidelberg, Alemania) y 10 copias/µl de los plásmidos Luthien e Idril. Se usaron los gradientes de plásmidos preparados para detecciones cuantitativas o como control positivo en PCR en tiempo real y para el cálculo de la eficacia de la amplificación del gradiente de plásmidos en el experimento de PCR actual. Por tanto, se amplificó un gradiente de plásmidos apropiado en cada experimento de PCR en tiempo real. Se determinó la reproducibilidad realizando 20 detecciones repetidas independientes con diluciones recién preparadas de gradiente de plásmidos.

65

Aislamiento de ADN total a partir de leche. Se centrifugó el volumen de 50 ml inicial de leche fresca a 4211 g (RCF) durante 45 min. en una centrífuga Hermle Z 383 K (Hermle, Gosheim, Alemania). Se desechó la mayoría del sobrenadante y la nata. Se resuspendió el sedimento en el sobrenadante restante y se transfirió a otro tubo de 2 ml. Posteriormente, se centrifugaron las muestras a 14000 g (RCF) durante 10 min. Se ajustó el volumen en cada tubo de prueba a 400 μ l. Se almacenaron tales "muestras preprocesadas" a -80°C antes de su uso. Se aisló el ADN total de la leche según el protocolo modificado del kit QIAamp DNA Blood Mini (Qiagen, Hilden, Alemania). Tras una incubación de 5 min., se eluyó el ADN en 50 μ l de tampón TE precalentado (Amresco, Inc, Solon, EE.UU.). Se realizó la elución dos veces. El aislamiento dio como resultado la obtención de 100 μ l de ADN total a partir de la leche en tampón TE que contenía ADN de esperma de pez portador en una concentración de 50 ng/ μ l. Según los parámetros del procedimiento de aislamiento del ADN, se realizó el cálculo del número de células de *MAP* por 1 ml de volumen de leche inicial tal como sigue: se dividió el número de copias de F57 obtenido en la PCR en tiempo real entre 2 = número de células de *MAP* en 1 ml de volumen de leche inicial. En el caso de PCR en tiempo real de IS900, el cálculo era idéntico y además se dividió el número obtenido entre dieciocho (1 célula de *MAP* no contiene más de 18 copias de IS900; Bull *et al.*, 2000).

Medidas para la prevención de la contaminación cruzada. Debido al hecho de que la PCR en tiempo real es altamente sensible, tenían que observarse estrictamente las medidas para la prevención de la contaminación cruzada. Se realizaron el aislamiento del ADN, la preparación de las mezclas para la PCR en tiempo real y la adición del molde de ADN en salas separadas con sobrepresión de aire. Se lavaron todas las herramientas y pipetas con DNA-Exitus (AppliChem, Darmstadt, Alemania) antes de su uso. Sólo se usaron puntas de filtro. Se incluyó un control negativo del aislamiento (agua) que permite la monitorización de la posible contaminación de los materiales de plástico y productos químicos usados en cada ronda de aislamiento de ADN. Se comprobaron los materiales de plástico y productos químicos para la PCR en tiempo real para detectar contaminación por medio del control de PCR negativo (agua en vez de molde de ADN), que se incluyó en cada experimento de PCR en tiempo real.

Análisis estadístico. Se calcularon los valores de puntos de cruce obtenidos mediante la PCR en tiempo real de IS900 y F57 por número real de copias según las curvas patrón apropiadas. Se agruparon los valores calculados a partir de los gradientes de los plásmidos Tuor y Beren y se compararon entre sí usando el programa InStat (GraphPad, San Diego, EE.UU.). Se sometieron a prueba los datos para determinar la homogeneidad de la varianza mediante la prueba de Kolmogorov y Smirnov y la varianza mediante la prueba de la T de Student. Se sometieron a prueba los grupos de datos para determinar la normalidad de la división y la varianza por medio de una prueba de variabilidad, es decir, la prueba de Kolmogorov-Smirnov y la prueba de la T, respectivamente. Las diferencias a $P < 0,05$ se consideraron significativas. Se calculó el coeficiente de variabilidad (CV) con el objetivo de mediar la precisión del aislamiento del DNA y la posterior PCR en tiempo real. Para la indicación de la varianza de valores calculados respectivos, se determinó el intervalo de confianza del 95%.

Resultados

Optimización de la PCR en tiempo real de IS900 y F57. Se determinó la cantidad óptima de copias de los plásmidos Luthien o Idril, que garantiza una coamplificación óptima con la secuencia diana, mediante titulación de 5×10^3 , 5×10^2 , 5×10^1 y 5×10^0 de cada copia de CAI con respecto a reacción de PCR y gradiente de plásmidos apropiado. Los resultados eran idénticos para ambos sistemas de PCR en tiempo real. Se encontró que 5×10^1 copias del plásmido Idril o Luthien por reacción (valores de punto de cruce entre 35 y 36) no afectaban a la amplificación de gradiente de plásmidos apropiado incluso en las concentraciones más bajas y proporcionaron una señal lo suficientemente fuerte que podía distinguirse del fondo.

En la siguiente etapa, se investigó el efecto del ADN de esperma de pez no específico presente en un molde sobre la amplificación de una molécula diana durante la PCR en tiempo real. Se diluyeron plásmidos Idril y Luthien (10 copias/ml) en tampón TE que contenía 0, 10, 30, 50, 70, 90, 100 y 200 ng/ μ l de ADN de esperma de pez y se usaron como diluyentes para la preparación de gradientes de plásmidos Tuor y Beren. Por tanto, se analizaron los moldes preparados mediante PCR en tiempo real basada en IS900 o F57 por triplicado.

Los valores de "puntos de cruce" de ambos gradientes no se vieron afectados incluso por la presencia de 100 ng/ μ l (500 ng por reacción de PCR) de ADN no específico. La concentración de 200 ng/ μ l inhibió significativamente ambos sistemas de PCR en tiempo real. Para otros experimentos, se usó la concentración de 50 ng/ μ l.

Especificidad de la PCR en tiempo real de IS900 y F57. Se sometieron a prueba ambos sistemas de PCR en tiempo real para determinar la capacidad para distinguir selectivamente ADN de *MAP* de otros lisados bacterianos y ADN de mamífero (tabla 1). No se amplificó ADN bacteriano ni de mamífero excepto *MAP* mediante la PCR en tiempo real de o bien F57 o bien IS900 y todas las muestras negativas mostraron una clara señal para CAI. Se eligieron especies de mamífero como las fuentes más probables de antecedentes de ADN para los sistemas de PCR en tiempo real desarrollados.

Sensibilidad de la PCR en tiempo real de IS900 y F57. Mediante ambos sistemas de PCR en tiempo real, puede detectarse una copia de plásmido Beren o Tuor por 1 ml (5 copias por reacción) en las 20 réplicas (tabla 3, figura 1).

La comparación de los conjuntos de datos calculados para *F57* e *IS900* usando la prueba de la T no mostró una diferencia significativa ($P > 0,1$) entre los mismos.

Aislamiento de ADN a partir de muestras de campo de leche. Se usaron ambos sistemas de PCR en tiempo real desarrollados para la detección y cuantificación de *MAP* en 71 muestras de leche de un rebaño de vacas infectadas con paratuberculosis (tabla 4). Se etiquetaron las muestras de leche recogidas con códigos, se aisló el ADN a partir de las mismas y se realizaron los análisis mediante PCR en tiempo real de *IS900* y *F57*. Las muestras que eran ligeramente positivas para *IS900* y negativas para *F57* se consideraron positivas. Se analizó cada muestra de campo por duplicado y se consideró positiva sólo en el caso de que ambos duplicados fuesen positivos; de lo contrario se repitió el aislamiento del ADN y se realizaron ambas PCR en tiempo real usando la muestra de reserva.

La proporción entre los números de copias de *IS900* y *F57* calculados se presentan en la tabla 4. Los números de copias de *IS900* eran siempre superiores que *F57* en todas las muestras con resultados simultáneamente positivos a partir de la PCR en tiempo real de *IS900* y *F57* y se detectó la razón de 12 con respecto a 18:1 en casi todas las muestras. El número de copias no era superior a 50 en todas las muestras en las que sólo se detectó *IS900*, que correspondían a aproximadamente 3 células de *MAP*.

Límite experimental de la detección de *MAP* en leche. Tras el cálculo de los números de copias obtenidos a partir de la PCR en tiempo real por volumen inicial de leche, se determinó el límite experimental de detección: 1 célula de *MAP* por 2 ml de leche para la PCR en tiempo real de *IS900* y 2 células de *MAP* por 1 ml de leche para la PCR en tiempo real de *F57*. Puede suponerse que de hecho ningún sistema de detección es perfecto. A pesar de todas las precauciones, los sitios diana pueden perderse durante el manejo de una muestra debido a o bien fragmentación del ADN durante el aislamiento o bien adhesión al material de plástico consumible. Por tanto, debe esperarse una probabilidad inferior de detección en bajas concentraciones. El ADN extraído a partir de una material complejo tal como leche puede contener trazas de sustancias inhibitoras. Éstas no se reflejarán en la amplificación de CAI, pero pueden inhibir las bajas concentraciones de sitios diana (Herthnek y Bolske, 2006).

Aplicabilidad para la industria

Este método de detección y cuantificación de *MAP* está destinado sobre todo para diagnóstico rutinario. Está diseñado para la cuantificación de *MAP* en cualquier material biológico. El requisito previo de su uso satisfactorio es el aislamiento de ADN de alta calidad a partir de una matriz dada. Los sistemas de PCR en tiempo real desarrollados se sometieron a prueba en condiciones prácticas sobre muestras de ADN aisladas de leche, que puede ser la fuente primaria de transmisión de *MAP* al hombre.

El método mencionado anteriormente comprende el protocolo de PCR en tiempo real con sondas de hidrólisis y CAI, incluyendo la composición de mezcla de PCR y las proporciones de diferentes componentes, el protocolo de PCR, el análisis de los datos obtenidos y la cuantificación de *MAP* en muestras.

Bibliografía

Ayele, W.Y., Machackova, M., Pavlik, I. (2001): The transmission and impact of paratuberculosis infection in domestic and wild ruminants. *Veterinarni Medicina*, 46, 205-224.

Ayele, W.Y., Svastova, P., Roubal, P., Bartos, M., Pavlik, I. (2005): *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis cultured from locally and commercially pasteurized cow's milk in the Czech Republic. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, 1210-1214.

Baksh, F.K., Finkelstein, S.D., riyamayagam-Baksh, S.M., Swalsky, P.A., Klein, E.C., Dunn, J.C. (2004): Absence of *Mycobacterium avium* subsp paratuberculosis in the microdissected granulomas of Crohn's disease. *Modern Pathology*, 17, 1289-1294.

Brey, B.J., Radcliff, R.P., Clark, D.L., Jr., Ellingson, J.L. (2006): Design and development of an internal control plasmid for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis using real-time PCR. *Mol. Cell Probes*, 20, 51-59.

Bull, T.J., Hermon-Taylor, J., Pavlik, I., El Zaatari, F., Tizard, M. (2000): Characterization of *IS900* loci in *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis and development of multiplex PCR typing. *Microbiology*, 146 (Pt 9), 2185-2197.

Bull, T.J., McMinn, E.J., Sidi-Boumedine, K., Skull, A., Durkin, D., Neild, P., Rhodes, G., Pickup, R., Hermon-Taylor, J. (2003): Detection and verification of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in fresh ileocolonic mucosal biopsy specimens from individuals with and without Crohn's disease. *J.Clin.Microbiol.*, 41, 2915-2923.

Chamberlin, W., Graham, D.Y., Hulten, K., El Zimaity, H.M., Schwartz, M.R., Naser, S., Shafran, I., El Zaatari, F.A. (2001): Review article: *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis as one cause of Crohn's disease. *Aliment.*

Pharmacol.Ther., 15, 337-346.

Grant, I.R. (2006): *Mycobacterium avium* ssp *paratuberculosis* in foods: current evidence and potential consequences. *International Journal of Dairy Technology*, 59, 112-117.

Green, E.P., Tizard, M.L., Moss, M.T., Thompson, J., Winterbourne, D.J., McFadden, J.J., Hermon-Taylor, J. (25-11-1989): Sequence and characteristics of IS900, an insertion element identified in a human Crohn's disease isolate of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Nucleic Acids Res.*, 17, 9063-9073.

Herthnek, D., Bolske, G. (2006): New PCR systems to confirm real-time PCR detection of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*. *Bmc Microbiology*, 6.

Hruska, K., Bartos, M., Kralik, P., Pavlik, I. (2005): *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in powdered infant milk: *paratuberculosis* in cattle - the public health problem to be solved. *Veterinarni Medicina*, 50, 327-335.

Kim, S.G., Shin, S.J., Jacobson, R.H., Miller, L.J., Harpending, P.R., Stehman, S.M., Rossiter, C.A., Lein, D.A. (2002): Development and application of quantitative polymerase chain reaction assay based on the ABI 7700 system (TaqMan) for detection and quantification of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 14, 126-131.

Lombard, J.E., Byrem, T.M., Wagner, B.A., McCluskey, B.J. (2006): Comparison of milk and serum enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in dairy cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 18, 448-458.

McKenna, S.L., Keefe, G.P., Barkema, H.W., McClure, J., Vanleeuwen, J.A., Hanna, P., Sockett, D.C. (2004): Cow-level prevalence of *paratuberculosis* in culled dairy cows in Atlantic Canada and Maine. *J.Dairy Sci.*, 87 (11), 3770-3777.

O'Mahony, J., Hill, C. (2002): A real time PCR assay for the detection and quantitation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* using SYBR Green and the Light Cycler. *J. Microbiol. Methods*, 51, 283-293.

O'Mahony, J., Hill, C. (2004): Rapid real-time PCR assay for detection and quantitation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* DNA in artificially contaminated milk. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, 4561-4568.

Poupart, P., Coene, M., Van Heuverswyn, H., Cocito, C. (1993): Preparation of a specific RNA probe for detection of *Mycobacterium paratuberculosis* and diagnosis of Johne's disease. *J. Clin. Microbiol.*, 31, 1601-1605.

Ravva, S.V., Stanker, L.H. (2005): Real-time quantitative PCR detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and differentiation from other mycobacteria using SYBR Green and TaqMan assays. *J. Microbiol. Methods*, 63, 305-317.

Rodriguez-Lazaro, D., D'Agostino, M., Herrewegh, A., Pla, M., Cook, N., Ikonomopoulos, J. (1-5-2005): Real-time PCR-based methods for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in water and milk. *Int. J. Food Microbiol.*, 101, 93-104.

Tasara, T., Hoelzle, L.E., Stephan, R. (2005): Development and evaluation of a *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) specific multiplex PCR assay. *Int. J. Food Microbiol.*, 104 (3), 279-287.

Tasara, T., Stephan, R. (2005): Development of an F57 sequence-based real-time PCR assay for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, 5957-5968.

Vansnick, E., de Rijk, P., Vercammen, F., Geysen, D., Rigouts, L., Portaels, F. (2004): Newly developed primers for the detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Vet.Microbiol.*, 100 (3-4), 197-204.

Tabla 1

Lista de especies bacterianas y de mamífero sometidas a prueba mediante PCR en tiempo real de IS900 y F57 con control de amplificación interno correspondiente

5

Especie	Fuente	IS900	F57
<i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	CAPM ^a 6381	+	+
<i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	muestra de campo (oso), CR	+	+
<i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	muestra de campo (gamo), CR	+	+
<i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	muestra de campo (heces), CR	+	+
<i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	muestra de campo (muflón), CR	+	+
<i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	muestra de campo (ganado), CR	+	+
<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>	CAPM 5889	-	-
<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>	muestra de campo (conejo), CR	-	-
<i>M. avium</i> subsp. <i>hominisuis</i>	muestra de campo (cerdo), CR	-	-
<i>M. avium</i> subsp. <i>hominisuis</i>	aislado clínico (hombre), CR	-	-
<i>M. gordonae</i>	ATCC ^b 12478	-	-
<i>M. cansanii</i>	ATCC 12478	-	-
<i>M. scrofulaceum</i>	ATCC 19981	-	-
<i>M. szulgai</i>	ATCC 35799	-	-
<i>M. intracellulare</i>	CAPM 5627	-	-
<i>Escherichia coli</i>	células competentes (Invitrogen)	-	-
<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium	CAPM 5438	-	-
Oveja (<i>Ovis aries</i>)	ADN de aislado clínico, CR	-	-
Cabra (<i>Capra hircus</i>)	ADN de aislado clínico, CR	-	-
Ganado (<i>Bos taurus</i>)	ADN de aislado clínico, CR	-	-
Hombre (<i>Homo sapiens sapiens</i>)	aislado clínico, CR	-	-

^aColección de Microorganismos Patógenos de Animales
^bColección Americana de Cultivos Tipo

Tabla 2

Secuencia de las sondas y los cebadores usados^a

Gen diana	Nombre	Tipo	Secuencia 5' →3'	Localización	Longitud del producto de PCR (pb)	Nombre del plásmido patrón
IS900	IS900qPCRf	Directo	GATGGCCGAAGGAGATTG	422 - 440		
	IS900qPCRr	Inverso	CACAACCCACCTCCGTAACC	568 - 549	145	Tuor
	IS900qPCRTM	Sonda	FAM - ATTGGATCGCTGTGTAAGGACACAGT - BHQ	508 - 534		
	F57qPCRf	Directo	GCCCATTTCATCGATACCC	94 - 111		
	F57qPCRr	Inverso	GTACCGAATGTTGTTGTCAC	238 - 220		
F57	F57qPCRTM	Sonda	FAM - CAATTCTCAGCTGCAACTCGAACACAC - BHQ	158 - 182	147	Beren
IAC	IACqPCRTM	Sonda	Cy5 - GGCTCTTCTATGTTCTGACCCTTGTGGG - BHQ		IS900 152 F57 154	Luthien Idril

^aTodos los cebadores y sondas se sintetizaron en VBC Biotech (Viena, Austria).

Tabla 3

Evaluación del gradiente de plásmido Beren y Tuor mediante el método de PCR en tiempo real

Designación	CP ^a			Número real de copias ^b			Razón ^d	Eficacia media de PCR ^e	
	Número de copias por reacción de PCR	Media	SO ^f	Media	SO	CV ^g			Inferior
Tuor (PCR en tiempo real de IS900)	50000	20,05	0,07	516915	94880	18,36	20/20		
	50000	23,63	0,41	47441	6177	13,02	20/20		
	5000	26,91	0,47	5424	1139	21,00	20/20		94,18%
	500	30,37	0,51	548	119	21,73	20/20		
	50	34,19	0,51	44	14	31,65	20/20		
Beren (PCR en tiempo real de F57)	5	37,31	0,61	6	1	23,13	20/20		
	500000	20,09	0,16	479470	62799	13,10	20/20		
	50000	23,52	0,34	50009	7180	14,36	20/20		
	5000	26,84	0,37	5641	1186	21,03	20/20		93,23%
	500	30,45	0,43	525	98	18,74	20/20		
	50	34,11	0,61	48	15	30,62	20/20		
	5	37,48	0,64	5	1	23,03	20/20		

^a CP – El valor de “punto de cruce”

^b Se realizó el cálculo a partir de CP según la ecuación de regresión para el experimento respectivo y las medias, se calcularon posteriormente SO y CV

^c IS – Intervalo de fiabilidad del 95% experimental

^d Muestras positivas/total de muestras

^e Calculado a partir del coeficiente de regresión medio

^f SO – Desviación estándar

^g CV – Coeficiente de variación

Tabla 4

Detección de *MAP* en leche de vaca (las primeras eyecciones de todas las tetillas) de un rebaño de vacas infectadas con paratuberculosis

5

IS900+ y F57+				IS900+ y F57-			
Vaca n.º.	IS900 ^a	F57 ^a	Número de <i>MAP</i> ^b	Vaca n.º.	IS900 ^a	F57 ^a	Número de <i>MAP</i> ^c
1	37	10	5	1	52	0	<2
2	598	58	29	2	22	0	<2
3	12	9	5	3	19	0	<2
4	30	4	2	4	16	0	<2
5	4	3	2	5	3	0	<2
6	34	6	3	6	13	0	<2
7	679	74	37	7	1	0	<2
8	53	10	5	8	4	0	<2
9	10	4	2	9	16	0	<2
10	37	3	2	10	6	0	<2
11	30	5	3	11	9	0	<2
12	49	5	3	12	3	0	<2
13	160	6	3	13	14	0	<2
14	399	7	4	14	30	0	<2
15	6	4	2	15	36	0	<2
				16	34	0	<2
				17	24	0	<2
				18	21	0	<2
				19	45	0	<2
				20	25	0	<2
				21	47	0	<2
				22	6	0	<2

^a Número medio de copias de un duplicado por reacción de PCR

^b Número de células de *MAP* por 1 ml de volumen de leche inicial. Calculado a partir de la cantidad de células de *MAP* detectadas mediante la PCR en tiempo real de *F57* (número de copias de *F57* obtenidas a partir de la PCR en tiempo real dividido entre 2 = número de células de *MAP* por 1 ml de volumen de leche inicial).

^c Número de células de *MAP* por 1 ml de volumen de leche inicial. Calculado a partir de la cantidad de células de *MAP* detectadas mediante la PCR en tiempo real de *IS900* (número de copias de *IS900* obtenidas a partir de la PCR en tiempo real dividido entre 36 = número de células de *MAP* por 1 ml de volumen de leche inicial).

REIVINDICACIONES

1. Método para la detección y cuantificación de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* mediante dos reacciones en cadena de la polimerasa en tiempo real competitivas, cada una con su propio control de amplificación interno, que se caracteriza por el hecho de que la detección y cuantificación de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* se realiza mediante dos sistemas de reacciones en cadena de la polimerasa en tiempo real independientes, que detectan dos locus específicos para *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*: IS900 y F57, respectivamente, usando cebadores y sondas de hidrolización que tienen las siguientes secuencias

cebadores para F57

F57qPCRf **GCCCATTTTCATCGATACCC**

F57qPCRr **GTACCGAATGTTGTTGTAC,**

la sonda para F57

F57qPCRtm **FAM - CAATTCTCAGCTGCAACTCGAACACAC - BHQ,**

cebadores para IS900

IS900qPCRf **GATGGCCGAAGGAGATTG**

IS900qPCRr **CACAACCACCTCCGTAACC,**

la sonda para IS900

IS900qPCRtm **FAM- ATTGGATCGCTGTGTAAGGACACGT - BHQ,**

en el que la sonda para el control de amplificación interno tiene la siguiente secuencia

IACqPCRtm **Cy5 - GGCTCTTCTATGTTCTGACCTTGTGGA- BHQ.**

2. Método según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que se detecta y cuantifica *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* en cualquier muestra de origen animal, en muestras clínicas de pacientes humanos, en muestras de origen vegetal, en muestras del entorno, especialmente de fertilizantes, tierra y heno, en muestras de hallazgos arqueológicos o en muestras de alimentos y piensos.

3. Kit para la detección y el diagnóstico de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* según el método de la reivindicación 1, que comprende todos los siguientes cebadores y sondas, cada de los cuales consiste en la secuencia definida a continuación:

cebadores para F57

F57qPCRf **GCCCATTTTCATCGATACCC**
F57qPCRr **GTACCGAATGTTGTTGTAC,**

la sonda para F57

F57qPCRtm **FAM - CAATTCTCAGCTGCAACTCGAACACAC - BHQ,**

cebadores para IS900

IS900qPCRf **GATGGCCGAAGGAGATTG**
IS900qPCRr **CACAACCACCTCCGTAACC,**

la sonda para IS900

IS900qPCRtm **FAM - ATTGGATCGCTGTGTAAGGACACGT - BHQ,**

y la sonda para el control de amplificación interno

IACqPCRtm **Cy5 - GGCTCTTCTATGTTCTGACCTTGTGGA- BHQ.**

Figura 1

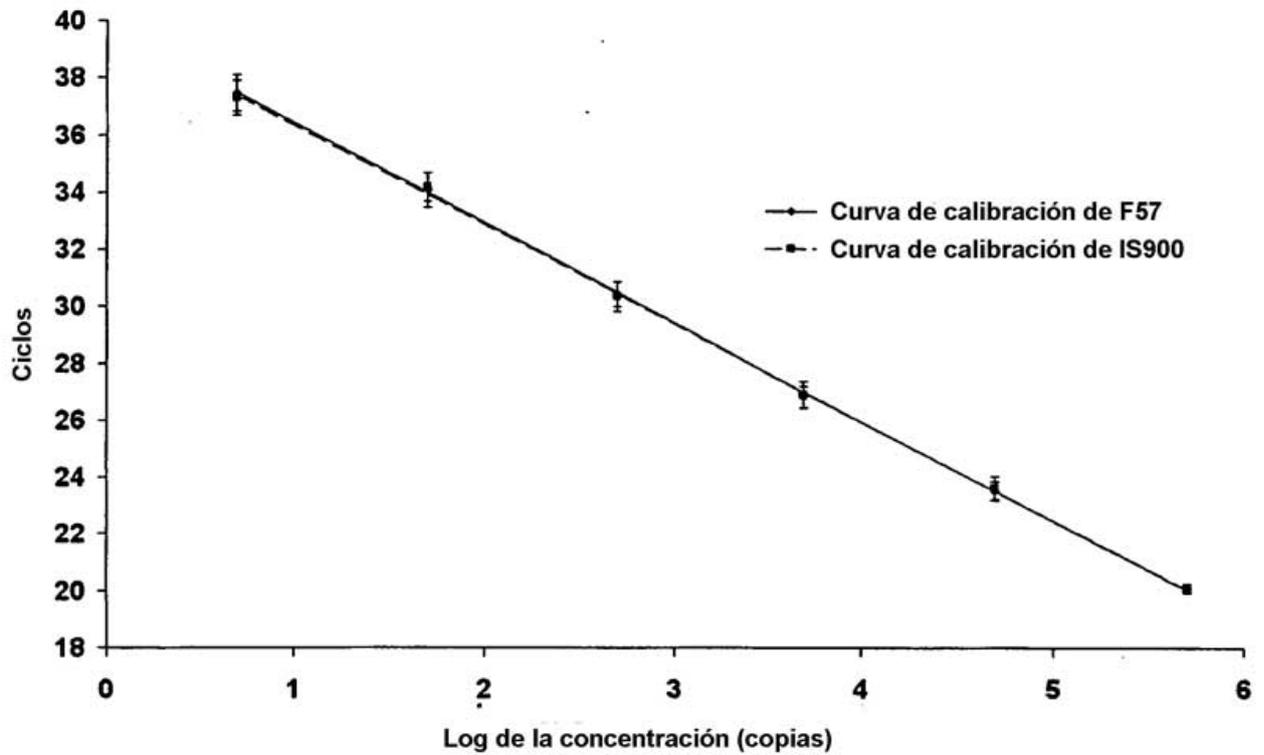


Figura 1. Diagrama que compara la PCR en tiempo real de *f57* e *IS900* que oscila entre 10^5 y 10^0 copias por $1 \mu\text{l}$ (correspondientes a 5×10^5 - 5×10^0 copias por reacción de PCR en tiempo real). La ecuación de regresión y los valores de fiabilidad R^2 para ambas curvas son los siguientes: gradiente para el plásmido Tuor (PCR en tiempo real de *IS900*) - $y = -3,46963x + 39,84290$; $R^2 = 0,99952$ y gradiente para el plásmido Beren (PCR en tiempo real de *F57*) - $y = -3,49555x + 39,93065$; $R^2 = 0,9978$.