

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 446 517**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.09.2005 E 05784765 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2013 EP 1922415**

54 Título: **Uso tanto de RD9 como de IS6110 como dianas de ácido nucleico para el diagnóstico de la tuberculosis, y provisión de dianas IS6110 y RD9 combinadas-adaptables**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.03.2014

73 Titular/es:

**BIO-RAD INNOVATIONS (100.0%)
3, Boulevard Raymond Poincaré
92430 Marnes-La-Coquette, FR**

72 Inventor/es:

**CLAREBOUT, GERVAIS y
SAVOYE, CHANTAL**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 446 517 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

5 Usó tanto de RD9 como de IS6110 como dianas de ácido nucleico para el diagnóstico de la tuberculosis, y provisión de dianas IS6110 y RD9 combinadas-adaptables

Campo de la invención

10 La presente se refiere a la tuberculosis, y más particularmente al diagnóstico de la tuberculosis. El recurso de la invención hace uso tanto de RD9 como de IS6110 como dianas de ácido nucleico para el diagnóstico de la tuberculosis. La presente invención permite discriminar notablemente entre especies de *Mycobacterium*. Por tanto permite un diagnóstico preciso, y de este modo proporciona una herramienta ventajosa para la selección del tratamiento apropiado.

Sumario de la invención

15 La presente invención se refiere a la tuberculosis, y más particularmente al diagnóstico de la tuberculosis. El recurso de la invención hace uso tanto de RD9 como de IS6110 como dianas de ácido nucleico para el diagnóstico de la tuberculosis. La presente invención de este modo proporciona un recurso que está específicamente adaptado para la detección de micobacterias que pertenecen al complejo de *Mycobacterium tuberculosis* (MtbC). El recurso de la invención posibilita adicionalmente discriminar *M. tuberculosis* y *M. canetti* por un lado, de las otras cepas del MtbC (tal como *M. bovis*) por otro lado.

20 De acuerdo con una característica ventajosa, la presente invención proporciona dianas RD9 e IS6110 combinadas-adaptables, que están especialmente adaptadas a la aplicación de una PCR combinada, de modo que dicha detección de MtbC y dicha discriminación de especies puede conseguirse en una única ejecución de amplificación.

25 De acuerdo con la realización de PCR combinada, el recurso de la invención permite ventajosamente la amplificación de dos dianas de ácido nucleico diferentes de forma combinada, concretamente una diana RD9 y una diana IS6110. Con el recurso de la invención, se necesita solamente una única ejecución de amplificación para detectar una micobacteria que pertenece al MtbC, y para discriminar *M. tuberculosis* y *M. canetti* por un lado, de las otras cepas del MtbC por otro lado. El recurso de la invención también tiene la ventaja de ser de rendimiento rápido y fiable: los resultados pueden estar disponibles el mismo día que el día de la recogida de la muestra del paciente. Adicionalmente es específico, sensible y fiable.

Antecedentes de la invención

35 La Organización Mundial de la Salud estima que un tercio de la población global está infectada con bacilos de tuberculosis, y que el 5-10% de las personas que están infectadas con bacilos de tuberculosis (pero no están infectados con VIH) llegan a estar enfermos o a ser infecciosos en algún momento durante su vida. Se estima que se produjeron 1,75 millones de muertes por tuberculosis en 2003. El VIH y los bacilos de tuberculosis adicionalmente forman una combinación letal, acelerando cada uno el progreso del otro.

40 Las cepas que son resistentes de forma natural a un fármaco anti-tuberculosis se han documentado en cada país estudiado. Por ejemplo, *M. bovis* es resistente de forma natural a pirazidamida. Además, han surgido cepas de bacilos de tuberculosis que desarrollaron una resistencia a fármacos anti-tuberculosis principales principalmente debido a un cumplimiento discontinuo, parcial o irregular del tratamiento médico. Una forma particularmente peligrosa de tuberculosis resistente a fármacos es la tuberculosis resistente a múltiples fármacos, que se define como la enfermedad causada por los bacilos de tuberculosis resistentes a al menos isoniazida y rifampicina, los dos fármacos anti-tuberculosis más potentes. Las tasas de tuberculosis resistente a múltiples fármacos son elevadas en algunos países, especialmente en la antigua Unión Soviética, y amenazan los esfuerzos del control de la tuberculosis.

45 Los bacilos que causan la tuberculosis en mamíferos (seres humanos y/o animales) son micobacterias que están agrupadas dentro de lo que se conoce como el complejo de *Mycobacterium tuberculosis* (MtbC). El complejo de *Mycobacterium tuberculosis* comprende notablemente las siguientes micobacterias: *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium bovis* (incluyendo el BCG-Bacilo de Calmette-Guerin-*M. bovis* atenuado), *Mycobacterium canetti*, *Mycobacterium caprae*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium pinnipedii*, *Mycobacterium tuberculosis*.

50 Las micobacterias agrupadas en el complejo de *Mycobacterium tuberculosis* se caracterizan por una similitud del 99,9% a nivel de nucleótidos y secuencias idénticas de ARNr 16S.

55 A pesar del grado inusualmente elevado de conservación en sus genes constitutivos, las micobacterias del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* difieren ampliamente en términos de tropismo de hospedador, fenotipos, y patogenicidad. Algunos son patógenos exclusivamente humanos (*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. canetti*), algunos son patógenos exclusivamente de roedores (*M. microti*), mientras que otras pueden tener un amplio espectro de hospedador (*M. bovis*, *M. caprae*). *M. bovis* y *M. caprae* pueden causar enfermedad en un amplio intervalo de animales domésticos o salvajes como ganado bovino y cabras, así como en seres humanos. Se ha informado de

que *M. microti* infecta a roedores pequeños como topillos y más recientemente también seres humanos (Niemann et al., 2000 *Emerg. Infect. Dis.* 6: 539-542; Kubica et al., 2003, *J. Clin. Microbiol.* 41 3070-3077.). Parece que *M. pinnipedii* es el huésped natural para focas, aunque el organismo también es patogénico en cobayas, conejos, seres humanos, dantas (*Tapirus terrestres*) y, posiblemente, ganado bovino (Cousin et al., 2003, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 1305-1314).

Se han identificado catorce regiones de diferencia, que varían en tamaño de 2 a 12,7 kb, que están ausentes de BCG de *M. bovis*, pero presentes en el genoma de *M. tuberculosis* H37Rv. Se mencionan como RD1 a RD14 (véase Gordon et al. 1999, *Mol. Microbiol.* 32, 643-655; Behr et al. 1999, *Science* 284, 1520-1523). La nomenclatura RD que se usa en este documento es la de Brosch et al. (Brosch et al. 2000, *Molecular Genetics of Mycobacteria*, eds. Hatfull, G.F., y Jacobs, W.R., Jr. (Am. Soc. Microbiol., Washington, DC), pág. 19-36). Diez de dichas catorce regiones RD BCG⁻ H37Rv⁺ están altamente conservadas entre las cepas de *M. tuberculosis*, con relación a otros miembros del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* (RD1, RD2, RD4, RD7, RD8, RD9, RD10, RD12, RD13, RDM; Brosch et al. 2002, *PNAS USA*, 99(6), 3684-3689).

Se han descrito seis regiones que están ausentes del genoma de *M. tuberculosis* H37Rv, con relación a otros miembros del complejo de *Mycobacterium tuberculosis*:

- cinco deleciones relacionadas con H37Rv, mencionadas como RvD1 a RvD5, y
- la región conocida como deleción 1 específica de *M. tuberculosis* (TbD1),

(Gordon et al. 1999, *Mol. Microbiol.* 32, 643-655; Brosch et al. 1999, *Infect. Immun.* 67, 5768-5774).

TbD1 se identificó originalmente como una región de 2.153-pb que estaba específicamente ausente del gen *mmpL6* de casi todas las cepas de *M. tuberculosis* (Brosch et al. 2002, *PNAS USA* 99:3684-3689). En base a la presencia o ausencia de la región TbD1, las cepas de *M. tuberculosis* pueden dividirse en tipos "ancestrales" y "modernos", respectivamente. Las cepas de Beijing, Haarlem y Africana responsables de las mayores epidemias son tipos modernos (Kremer et al. 1999, *J. Clin. Microbiol.* 37, 2607-2618; Brosch et al. 2002, *PNAS USA*, 99(6), 3684-3689).

Los signos clínicos y síntomas de tuberculosis no son suficientemente específicos para constituir en sí y por sí mismos un diagnóstico fiable de tuberculosis.

Por lo tanto se realiza el diagnóstico a través del análisis de micobacterias de una muestra biológica, pretendido para detectar la presencia o ausencia de una micobacteria que pertenezca al MtbC.

Se han utilizado diversas características micobacterianas biológicas y moleculares para identificar aislados de MtbC.

Tradicionalmente se ha usado una serie de ensayos clásicos basados en propiedades de crecimiento, fenotípicas y bioquímicas para segregar los miembros del MtbC (Haas et al. 1997, *J. Clin. Microbiol.* 35, 663-666; Niemann et al. 2000, *J. Clin. Microbiol.* 38, 3231-3234).

Sin embargo, estos ensayos pueden ser lentos, engorrosos, imprecisos, no reproducibles, y tardar mucho tiempo. Adicionalmente pueden no dar un resultado inequívoco en todos los casos, impidiendo de este modo su uso como herramienta de diagnóstico para la tuberculosis.

Las herramientas actuales de detección para el diagnóstico de la tuberculosis comprenden notablemente:

- microscopía (observación directa y/o tinción celular),
- cultivo celular,
- un kit Gen-Probe®.

Las micobacterias son bastoncillos pleomórficos no móviles. Las colonias de *M. bovis* aparecen uniformes y disgénicas (es decir, colonias pequeñas), mientras que las colonias de *M. tuberculosis* son desiguales y eugénicas (es decir, colonias grandes). La observación directa de las colonias bacterianas es, sin embargo, no muy específica. Ni es muy sensible, ya que la muestra contendrá una concentración relativamente elevada de células micobacterianas (>10⁴/ml).

Los organismos que pertenecen al género *Mycobacterium* tienen una envuelta celular única que contiene ácidos micólicos y tiene elevado contenido de lípidos. Como las células son hidrófobas y tienden a agregarse juntas, son impermeables a los tintes habituales, tal como la tinción Gram. Se conocen como "bacilos ácido-resistentes) porque su envuelta celular rica en lípidos, que es relativamente impermeable a diversos colorantes básicos salvo que los colorantes se combinen con fenol. Una vez teñidas, las células resisten a la decoloración con disolventes orgánicos acidificados, y por lo tanto se llaman "ácido-resistentes". Actualmente, se usan dos tipos de colorantes ácido-resistentes en laboratorios de micobacteriología clínica. Un tipo es carbolfucsina (métodos de Ziehl-Neelsen [ZN] o Kinyoun), y el otro es fluorocromo (auramina o auramina-rodamina). Como elemento característico, retienen coloración con fucsina o auramina después de tratamiento sucesivo o simultáneo con ácido y alcohol.

Aunque la especificidad de la microscopía ácido-resistente es excelente para especies micobacterianas, la sensibilidad no es óptima. La sensibilidad de la microscopía está influida por numerosos factores, tales como la prevalencia y gravedad de la enfermedad, el tipo de muestra, la calidad de la recogida de muestras, la cantidad de micobacterias presentes en la muestra, el método de procesamiento (directo o concentrado), el método de centrifugación, la técnica de tinción, y la calidad del examen.

Se recomienda que se informe de un resultado negativo solamente después del examen de al menos 100 (en países de bajos ingresos) y preferiblemente 300 (en países industrializados) campos visuales por inmersión microscópica (o campos visuales fluorescentes equivalentes).

Por lo tanto, cuando se realiza la microscopía correctamente, puede llevar mucho tiempo y ser laboriosa. Los falsos negativos debido a fatiga también pueden contribuir a una sensibilidad disminuida.

Las micobacterias son bacilos de crecimiento lento, con un tiempo de generación habitual de 12 a 18 horas. Las colonias habitualmente llegan a ser visibles solamente después de un tiempo de incubación de 3 semanas a 10 semanas. Las muestras que contienen una baja concentración de células micobacterianas adicionalmente necesitan varios subcultivos. El cultivo de micobacterias en medios específicos es una técnica que permite la identificación de la especie particular de *Mycobacterium* contenida en la muestra biológica. Sin embargo, consume mucho tiempo, especialmente para aquellos pacientes que están solamente en el inicio del proceso infeccioso.

Se han desarrollado ensayos de hibridación de ácidos nucleicos para detectar micobacterias en una muestra biológica. Los primeros ensayos utilizaban hibridación directa de sondas. Sin embargo, la concentración en células de *Mycobacterium* contenidas en una muestra recogida de un paciente es habitualmente demasiado baja para dar una señal de hibridación positiva. Por lo tanto se han desarrollado ensayos que utilizan amplificación por PCR.

Por ejemplo, el kit Gen-Probe® comercializado como kit "de ensayo directo de *Mycobacterium tuberculosis* Amplified™", o kit de ensayo MTD, (Gen-Probe Inc., San Diego, California 92121, Estados Unidos) utiliza la amplificación de ARNr específico de MtbC (Amplificación Mediada por Transcripción), seguido por detección del amplicón de acuerdo con el método Gen-Probe HPA (Ensayo de Protección de Hibridación).

Un ensayo MTD positivo indica que la muestra contiene micobacterias del MtbC. Debido a problemas de inhibición, y a una sensibilidad insuficiente, un ensayo MTD negativo sin embargo no excluye la posibilidad de aislar un organismo MtbC de la muestra. El ensayo MTD no discrimina adicionalmente entre las diversas especies de *Mycobacterium*; y más particularmente no discrimina *M. bovis* de *M. tuberculosis*.

El diagnóstico de la tuberculosis está complicado adicionalmente por el hecho de que aquellas personas que reciben vacunación con BCG son positivas a *M. bovis* (por ejemplo, sus muestras de orina son positivas a *M. bovis*). Por tanto, una persona puede ser positiva a *M. bovis*, sin ser un portador de tuberculosis.

En estas circunstancias, es de vital importancia detectar si la muestra biológica contiene una micobacteria de MtbC que no sea *M. bovis*, y más particularmente que sea *M. tuberculosis*.

Por tanto, existe la necesidad de una herramienta de diagnóstico que sea aplicable a muestras originarias de mamíferos, y más particularmente de seres humanos, que pudiera discriminar *M. tuberculosis* de las otras cepas principales de MtbC, y más particularmente de *M. bovis*.

Existe la necesidad de un ensayo de diagnóstico MtbC más rápido y fiable, y preferiblemente para un diagnóstico rápido y fiable de si la muestra biológica es susceptible de contener una micobacteria que pertenezca al MtbC, que no sea *M. bovis* (MtbC+Mb-), más preferiblemente un diagnóstico rápido y fiable de si la muestra biológica es susceptible de contener células de *M. tuberculosis* (Mt+), o si no contiene células de *M. tuberculosis* (Mt-).

La presente invención proporciona dicho ensayo y herramientas. El recurso de la invención está especialmente adaptado a la amplificación, especialmente a la amplificación por PCR, y como característica ventajosa, a PCR combinada. De acuerdo con la realización de PCR combinada de la presente invención, pueden amplificarse dos dianas diferentes de ácido nucleico en combinación, es decir, en una única ejecución de amplificación: una diana se selecciona apropiadamente en IS6110, y la otra diana se selecciona apropiadamente en RD9.

IS6110 y RD9 son conocidas para los especialistas en la técnica. Las secuencias IS6110, por ejemplo, se han descrito en el documento EP 0 490 951 B1 (US 5.597.911; US 5.807.672; US 5.837.455) y en el documento EP 0 461 045 B1 (US 5.776.693), en el nombre del INSTITUT PASTEUR. La secuencia IS6110 de *M. tuberculosis* H37Rv (IS6110 secuencia de referencia) está disponible con el número de acceso X17348 M29899.

Las secuencias de RD9 se han descrito, por ejemplo, en el documento WO 00/55632 en el nombre del INSTITUT PASTEUR (documento EP 1161562 A1; y solicitud o solicitudes de patente homólogas estadounidenses). La secuencia RD9 de *M. tuberculosis* H37Rv (RD9 secuencia de referencia) comprende las secuencias cobL, Rv2073c, Rv 2074 y Rv2075c. La secuencia RD9 de *M. tuberculosis* H37Rv corresponde a la secuencia que se extiende desde la posición 250.271 a la posición 254.176 de la secuencia del genoma de *M. tuberculosis* H37Rv, que está disponible con el número de acceso BX842578 (segmento 7/13 del genoma de *M. tuberculosis* H37Rv).

ZINK A. R. et al. ("Molecular strain identification of the *Mycobacterium tuberculosis* complex in archival tissue samples." JOURNAL OF CLINICAL PATHOLOGY, vol. 57, n° 11, noviembre de 2004, páginas 1185-1192) describe un método para detectar una micobacteria del MtbC, caracterizado por que comprende la detección de dos secuencias de ácido nucleico diana. En particular, todas las muestras se ensayaron para la presencia de ADN del complejo de *M. tuberculosis* mediante la amplificación de un fragmento de 123 pb de la secuencia de inserción IS6110. La pérdida de la región de diferencia 9 (RD9) también se consideró.

A conocimiento del solicitante, ninguna técnica previa desvela recursos que serían apropiados para la detección de IS6110 y RD9 en PCR combinada; y ninguna técnica previa desvela las subsecuencias IS6110 y RD9 seleccionadas como dianas combinadas-adaptables de acuerdo con la presente invención (por ejemplo, SEC ID N° 2 y SEC ID N° 8 de la presente invención).

5 El recurso de la invención está especialmente adaptado para la provisión de información micobacteriana muy detallada y precisa en una única ejecución de amplificación. La invención de este modo proporciona un medio rápido, fiable, específico y sensible para el diagnóstico de la tuberculosis. Por tanto el diagnóstico puede ser rápido y preciso, lo que es inmediato beneficio para el paciente.

10 El recurso de la invención también puede usarse como herramienta para evaluar si un tratamiento médico particular puede tener, o está teniendo algún efecto positivo contra la infección. Como discrimina *M. tuberculosis* de las otras cepas principales de *MtbC*, y más particularmente *M. tuberculosis* de *M. bovis*, el recurso de la invención posibilita adicionalmente tener en cuenta la resistencia a los fármacos anti-tuberculosis y adicionalmente evitar la administración de tratamientos inapropiados. Evita adicionalmente el desarrollo consecuente de bacilos resistentes.

15 Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra una subsecuencia de RD9 de *M. tuberculosis* H37RV (secuencia Rv2075c de 1464 nucleótidos; SEC ID N° 19), y, en caracteres en negrita, la secuencia de la SEC ID N°7 de la invención (posiciones 351-600 dentro de Rv2075c). La secuencia la diana RD9 de la SEC ID N° 8 de la invención (posiciones 390-561 dentro de Rv2075c) se muestra en caracteres en negrita y subrayados.

20 La Figura 2 muestra la secuencia IS6110 de *M. tuberculosis* H37RV (1360nt; SEC ID N° 20). La subsecuencia de la SEC ID N° 1 (posiciones 361-600), seleccionada dentro de IS6110 de acuerdo con la presente invención se muestra en caracteres en negrita. La secuencia de la diana IS6110 de la SEC ID N° 2 de la invención (posiciones 372-572) se muestra en caracteres en negrita y subrayados.

Descripción detallada de la invención

30 En la presente solicitud, cada uno de dicho *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium canetti*, *Mycobacterium caprae*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium pinnipedii*, y *Mycobacterium tuberculosis* se entiende como constituyendo una especie distinta desde un punto de vista de nomenclatura. *M. bovis* comprende *M. bovis*, así como el BCG de *M. bovis* atenuado (por ejemplo, *M. bovis* Pasteur, o *M. bovis* Tokio) que derivan de *M. bovis*.

35 Como se demuestra por una bibliografía extensiva en el campo, cada una de dichas especies es conocido por los especialistas en la técnica (véase, por ejemplo, Kremer et al. 1999, *J.Clin. Microbiol.* 37, 2607-2618; Goh et al. 2001, *J. Clin. Microbiol.* 39, 3705-3708; Van Soolingen et al. 1998, *J. Clin. Microbiol.* 36, 1840-1845).

Las cepas ilustrativas comprenden notablemente:

- 40 - ATCC 27294, ATCC 25177, ATCC 51910 para *M. tuberculosis*,
- ATCC 25420, ATCC 35711 para *M. africanum* (subtipo I),
- ATCC 19422, ATCC 35782, ATCC 11152 para *M. microti*,
- ATCC 19210, ATCC 35725, ATCC 35726, ATCC 35730 para *M. bovis*,
- ATCC 27290, ATCC 35736, ATCC 35737 para BCG de *M. bovis*,
- 45 - La cepa CIP 105776 de *M. caprae* disponible en la Institut Pasteur Collection (o disponible en la ATCC con el número ATCC BAA 824).

ATCC es: American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard Manassas, Virginia 20110-2209.

La Institut Pasteur Collection o CIP («Collection de l'Institut Pasteur») es: Collection de l'Institut Pasteur, Institut Pasteur, 25-28 rue du Docteur Roux, F-75724 Paris Cedex 15, Francia.

50 La presente invención resulta de la selección apropiada y uso de dos ácidos nucleicos micobacterianos, concretamente RD9 e IS6110.

IS6110 y RD9 son conocidos para los especialistas en la técnica.

IS6110 es un elemento tipo IS, que consta de 1360 nucleótidos en la cepa de referencia de *M. tuberculosis* H37Rv.

La secuencia IS6110 de *M. tuberculosis* H37Rv está disponible con el número de acceso X17348 M29899.

55 RD9 es una región de diferencia, que consta de 1464 nucleótidos en la cepa de referencia de *M. tuberculosis* H37Rv. La secuencia RD9 de *M. tuberculosis* H37Rv corresponde a las posiciones 250.271-254.176 de la secuencia del genoma de *M. tuberculosis* H37Rv, que está disponible con el número de acceso BX842578 (segmento 7/13 del genoma de *M. tuberculosis* H37Rv).

60 El uso tanto de RD9 como de IS6110 de acuerdo con la presente invención permite la discriminación de *M. tuberculosis* y *M. canetti* por un lado, de las otras cepas del *MtbC*, y más particularmente de *M. bovis*, por otro lado. El uso tanto de RD9 como de IS6110 permite:

- detectar una micobacteria del *MtbC*.
- 65 - discriminar *M. tuberculosis* y *M. canetti* por un lado, de las otras cepas del *MtbC* por otro lado.

La presente invención se refiere al uso tanto de RD9 como de IS6110 como dianas de ácido nucleico, para la detección específica y sensible de una micobacteria del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* (MtbC), y/o para la discriminación específica y sensible de *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium canetti* por un lado, de las otras cepas de dicho MtbC por otro lado.

5 La presente invención se refiere al uso tanto de RD9 como de IS6110 como dianas de ácido nucleico, para el diagnóstico *in vitro* de la tuberculosis.

La presente invención por tanto se refiere al uso tanto de:

- 10 - al menos un par de cebadores de amplificación o sonda de hibridación dirigidos a IS6110, y
 - al menos un par de cebadores de amplificación o sonda de hibridación dirigidos a RD9,

para la detección específica y sensible de una micobacteria del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* (MtbC), y/o para la discriminación específica y sensible de *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium canetti* por un lado, de las otras cepas de dicho MtbC por otro lado. Dicho uso es apropiado para el diagnóstico *in vitro* de la tuberculosis.
 15 Preferiblemente, dicho al menos un par de cebadores de amplificación o sonda de hibridación dirigidos a IS6110 es un par de cebadores de amplificación o sonda de hibridación específico de IS6110, y dicho al menos un par de cebadores de amplificación o sonda de hibridación dirigido a RD9 es un par de cebadores de amplificación o sonda de hibridación específico de RD9. Por par de cebadores o sonda específica, en este documento se entiende un par de cebadores o sonda que no reacciona de forma cruzada con ningún ácido nucleico micobacteriano diferente a su
 20 diana (IS6110 o RD9), y que preferiblemente no reacciona de forma cruzada con ningún ácido nucleico humano.

El recurso de la invención está especialmente adaptado para la amplificación, y más particularmente para la amplificación por PCR. Como característica ventajosa, el recurso de la invención está especialmente adaptado a PCR combinada. La presente invención por tanto se refiere al uso tanto de RD9 como de IS6110 como dianas de
 25 ácido nucleico, donde dichos IS6110 y RD9 se abordan en una PCR combinada.

De acuerdo con la realización de PCR combinada de la invención, se abordan dos dianas diferentes de ácido nucleico para amplificación en combinación, es decir, en una única ejecución de amplificación: una diana se selecciona apropiadamente dentro del ácido nucleico IS6110, y la otra diana se selecciona apropiadamente dentro del ácido nucleico RD9.

30 Las dianas de ácido nucleico Rd9 e IS6110 específicas seleccionadas de acuerdo con la presente invención posibilitan:

- detectar una micobacteria del MtbC,
 - discriminar *M. tuberculosis* y *M. canetti* por un lado, de las otras cepas del MtbC por otro lado, y
 35 - diseñar cebadores que puedan usarse en combinación, es decir, cebadores que sigan siendo específicos y sensibles incluso cuando se usan en una única ejecución de amplificación combinada.

De acuerdo con la presente invención, cuando se ensaya una muestra biológica para la presencia (+) o ausencia (-) de RD9 y de IS6110, una respuesta RD9- IS6110+ significa que la muestra contiene una micobacteria del complejo de *Mycobacterium tuberculosis*, que no es *M. tuberculosis* (es decir, MtbC+ Mt-). Cualquier otra respuesta RD9
 40 IS6110, excepto RD9- IS6110-, significa que la muestra contiene una micobacteria del complejo de *Mycobacterium tuberculosis*, que es *M. tuberculosis* o *M. canetti* (es decir, MtbC+ y (Mt+ o canetti+)).

Tabla 1:

Resultado de ensayo (presente invención)	Significado (presente invención)
RD9-IS6110+	micobacteria del complejo de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , que <u>no</u> es <i>M. tuberculosis</i>
RD9+ IS6110+	micobacteria del complejo de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , que es <i>M. tuberculosis</i> o <i>M. canetti</i>
RD9+ IS6110-	micobacteria del complejo de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , que es <i>M. tuberculosis</i>
RD9- IS6110-	no una micobacteria del complejo de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>

45 La presente invención proporciona adicionalmente un diagnóstico detallado en la especie *M. tuberculosis*:

- una respuesta RD9+ IS6110- significa que la muestra biológica contiene una cepa ancestral de *M. tuberculosis*, y
 - una respuesta RD9+ IS6110+ significa que la muestra biológica contiene una cepa de tipo moderno de *M. tuberculosis*, o la muy rara *M. canetti*.

50 La invención por lo tanto discrimina cepas ancestrales de *M. tuberculosis* de cepas de tipo moderno de *M. tuberculosis*, y evita el problema de resultados falsos negativos, que en la técnica previa a veces se encontraban cuando se usaba IS6110 como único marcador.

Tabla 2:

Resultado de ensayo (presente invención)	Significado (presente invención)
RD9+ IS6110-	M. tuberculosis ancestral
RD9+ IS6110+	M. tuberculosis tipo moderno, o M. canetti

Las cepas ancestrales en este documento se definen como cepas de *M. tuberculosis* TbD1⁺, mientras que las cepas modernas de *M. tuberculosis* se definen como cepas de *M. tuberculosis* TbD1⁻.

5 La secuencia de los genes *mmpS6* y *mmpL6* de la cepa ancestral de *M. tuberculosis* nº 74 que contiene la región TbD1 se depositó en la base de datos EMBL con el número de acceso AJ426486 (las 2.153 pb de TbD1 se extienden desde la posición 340 a la posición 2492 de AJ426486).

10 El método de PCR y los cebadores de TbD1 descritos en Brosch et al. 2002, PNAS USA 99:3684-3689 pueden usarse para evaluar si TbD1 está presente o ausente de una muestra biológica; véase la Tabla 1 en el material de apoyo de dicha publicación de Brosch et al., que describe los cebadores TbD1intS.F y TbD1intS.R (CGT TCA ACC CCA AAC AGG TA - SEC ID Nº 15 - y AAT CGA ACT CGT GGA ACA CC - SEC ID Nº 16 -, respectivamente), y los cebadores TBD1fla1-f y TBD1fla1-R (CTA CCT CAT CTT CCG GTC CA - SEC ID Nº 17 - y CAT AGA TCC CGG ACA TGG TG - SEC ID Nº 18 -, respectivamente).

15 Ejemplos de cepas de *M. tuberculosis* de tipo moderno comprenden notablemente el aislado de *M. tuberculosis* H37Rv, y el aislado de *M. tuberculosis* H37Ra.

El genoma completo del aislado de *M. tuberculosis* H37Rv se ha secuenciado (Cole et al. 1998, Nature, 393, 537-544). La secuencia también está disponible en el ID MTBH37RV, número de acceso AL123456.

20 TbD1 (delección específica 1 de *M. tuberculosis*) está ausente de aproximadamente el 87% de las cepas de *M. tuberculosis*, incluyendo cepas representativas de las epidemias principales tales como los grupos Haarlem, Beijin y África (Kremer et al. 1999, J. Clin. Microbiol. 37, 2607-2618; Brosch et al. 2002, PNAS USA, 99(6), 3684-3689).

M. canetti tiene una rara prevalencia entre pacientes humanos que muestran síntomas tipo tuberculosis. Por tanto, una respuesta RD9+ IS6110+ muy frecuentemente indicará MtbC+ y Mt+ (es decir, una micobacteria del complejo de *Mycobacterium tuberculosis*, que es *M. tuberculosis*).

Si, no obstante, se deseara discriminar entre la presencia de *M. tuberculosis* (es decir, Mt+) y la presencia de *M. canetti* (es decir, canetti+), están disponibles medios apropiados para los especialistas en la técnica.

30 De hecho, *M. canetti* es muy rara, una variante uniforme de *M. tuberculosis*, y habitualmente se aísla de pacientes de, o con conexión con, África.

Aunque comparte secuencias idénticas de ARNr 16S con los otros miembros del complejo de *M. tuberculosis*, y contiene todas las regiones RD RvD, así como la región TbD1, las cepas de *M. canetti* difieren en muchos aspectos, incluyendo polimorfismos en ciertos genes constitutivos, el número de copias de IS1081, la morfología de las colonias, y el contenido de lípidos de la pared celular, y notablemente:

35 i. *M. canetti* ha demostrado portar 26 secuencias espaciadoras únicas en la región DR que ya no están presentes en ningún otro miembro del complejo de *M. tuberculosis* (Van Embden et al. 2000, J. Bacteriol. 182, 2393-2401);

40 ii. *M. canetti* puede caracterizarse por la ausencia de una región RD^{can} específica, descrita en Brosch et al. 2002, PNAS USA, 99(6), 3684-3689, que solapa parcialmente con RD12, y a veces también se menciona como delección RD12-can. La secuencia de delección de RD12-can del aislado de *M. canetti* 14000059, con relación al genoma de *M. tuberculosis* H37Rv, se depositó en la base de datos EMBL con el número de acceso AJ583833.;

45 iii. *M. canetti* puede caracterizarse por la presencia de una única copia de la secuencia de inserción IS1081 (IS1081 de *M. bovis* está disponible con el número de acceso X61270);

iv. Las células de *M. canetti* forman colonias uniformes, mientras que las células de *M. tuberculosis* forman colonias desiguales.

Por tanto, en cualquier situación en que los especialistas en la técnica quisieran discriminar *M. tuberculosis* de *M. canetti*, puede usarse una cualquiera de, o varias características de i a iv.

50 En resumen:

Tabla 3:

Complejo de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>				
		TbD1	RD9	IS6110
M. tuberculosis	Ancestral (familia de África oriental - India)	+	+	-
	Moderna (familia de América Latina y Mediterránea)	-	+	+
M. africanum		+	-	+

Complejo de Mycobacterium tuberculosis			
	TbD1	RD9	IS6110
M. bovis	+	-	+
M. bovis - BCG	+	-	+
M. canetti	+	+	+
M. caprae	+	-	+
M. microti	+	-	+
M. pinnipedii	+	-	+

Los patrones mostrados en la anterior Tabla 3 son los típicos, es decir, los observados en la inmensa mayoría de, sino todas, las cepas que pertenecen a las especies indicadas.

5

Las dianas de ácido nucleico seleccionadas dentro de dichos ácidos nucleicos RD9 e IS6110 se proporcionan adicionalmente. Estas dianas de ácido nucleico RD9 e IS6110 seleccionadas tienen un nivel mucho mayor de especificidad, necesario para aplicaciones de diagnóstico: su detección indica fiablemente que están presentes ácidos nucleicos RD9 e IS6110 en la muestra ensayada, sin confusión con cualquier otro ácido nucleico, ya sea de origen microbiano o mamífero. Estas dianas seleccionadas permiten de forma ventajosa diseñar cebadores que puedan usarse en combinación (es decir, en la misma ejecución de amplificación), permaneciendo aún muy sensibles y muy específicos.

10

Dichos cebadores no conducen a hibridación cruzada, reteniendo de este modo la especificidad requerida, y permaneciendo tan sensibles como una UFC de micobacteria por muestra (véase el siguiente ejemplo).

15

Las dianas de ácido nucleico RD9 e IS6110 seleccionadas tienen la secuencia:

- de la SEC ID N° 2 para la diana IS6110, o la secuencia que es completamente complementaria a la misma sobre la longitud completa de dicha SEC ID N° 2,
- de la SEC ID N° 8 para la diana RD9, o la secuencia que es completamente complementaria a la misma sobre la longitud completa de dicha SEC ID N° 8.

20

La diana IS6110 de la SEC ID N° 2 es un fragmento de IS6110 de M. tuberculosis H37Rv (número de acceso X17348 M29899), desde la posición 372 a 572 (posiciones de inicio y final incluidas):

25

```

372          cagcaacgct aattaacggt tcatcgccga tcatcagggc caccgcgagg
421 gccccgatgg tttgcggtgg ggtgtcgagt cgatctgcac acagctgacc gagctgggtg
481 tgccgatcgc cccatcgacc tactacgacc acatcaaccg ggagcccagc gcgcgcgagc
541 tgcgcgatgg cgaactcaag gagcacatca gc

```

30

(= SEC ID N° 2 = de 372 a 572)

La diana RD9 de la SEC ID N° 8 es un fragmento de RD9 de M. tuberculosis H37Rv. La secuencia RD9 del genoma de M. tuberculosis H37Rv se extiende desde la posición 250.271 hasta la posición 254.176 de la secuencia de H37Rv disponible con el número de acceso BX842578. La secuencia RV2075c, que está contenida dentro de la secuencia RD9 de M. tuberculosis H37Rv, se extiende desde la posición 252.713 hasta la posición 254.176 de la secuencia de H37Rv disponible con el número de acceso BX842578. La diana RD9 de la SEC ID N° 8 se extiende desde la posición 390 a 561 (posiciones de inicio y final incluidas) de dicha secuencia Rv2015c, concretamente:

35

```

390          t aagcgctgc
401 ggattggccg gtggacgggt cgggttggcc aacgccgtgg ccagcgtgga
451 gtcctcgtaa tagcggacca gtcgccaagc gtagacaccg cggccatagg
501 tggcatcgca ggccgggtat gcccggtagc cggagttcga gccgctttcc
551 agctcaacgc c

```

40

45

(= SEC ID N° 8 = de 390 a 561)

La presente divulgación por tanto se refiere a una serie de dos polinucleótidos adecuados para su uso como secuencias molde de referencia en el diseño de cebadores que puedan usarse en combinación en una única ejecución de amplificación para detectar una micobacteria del complejo de Mycobacterium tuberculosis (MtbC), y/o para discriminar Mycobacterium tuberculosis y Mycobacterium canetti por un lado, de las otras cepas de dicho MtbC por otro lado, donde uno de dichos dos polinucleótidos molde de referencia es un fragmento de RD9, siendo el otro un fragmento de IS6110, donde dicho fragmento de IS6110 consiste en la secuencia de la SEC ID N° 2, o en la secuencia que es completamente complementaria a la SEC ID N° 2 sobre la longitud completa de la SEC ID N° 2, y donde dicho fragmento de RD9 consiste en la secuencia de la SEC ID N° 8, o la secuencia que es completamente complementaria a la SEC ID N° 8 sobre la longitud completa de la SEC ID N° 8.

50

55

Dicho fragmento de IS6110 ventajosamente es el fragmento que se extiende desde la posición 372 hasta 572 de la secuencia IS6110 de la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv, incluidas las posiciones de inicio y final (la secuencia de IS6110 de *M. tuberculosis* H37Rv está disponible con el número de acceso X17348 M29899).

5 Dicho fragmento de RD9 ventajosamente es el fragmento que se extiende desde la posición 390 hasta 561 de la secuencia RD9 de la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv, incluidas las posiciones de inicio y final (la secuencia del segmento 7/13 del genoma de *M. tuberculosis* H37Rv está disponible con el número de acceso BX842578; RD9 corresponde a las posiciones 252.713-254.176 de esta secuencia).

10 Los cebadores diseñados a partir de dichas secuencias molde de referencia de modo que puedan conducir la amplificación de dicha diana IS6110 seleccionada de la SEC ID N° 2, y la amplificación de dicha diana RD9 seleccionada de la SEC ID N° 8, pueden usarse en combinación en una única ejecución de amplificación ofreciendo aún al mismo tiempo una detección y discriminación específicas y sensibles.

15 La presente divulgación también se refiere a cada una de dichas secuencias molde de referencia individualmente, es decir, a un polinucleótido adecuado para su uso como secuencia molde de referencia en el diseño de cebadores que puedan usarse en combinación en una única ejecución de amplificación para detectar una micobacteria del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* (MtbC), y/o para discriminar *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium canettii* por un lado, de las otras cepas de dicho MtbC por otro lado, donde dicho polinucleótido molde de referencia se selecciona entre dicha serie de dos polinucleótidos.

20 La presente invención de este modo proporciona cebadores de amplificación y sondas específicas y sensibles que siguen siendo sensibles y específicas cuando se usan en combinación, y que posibilitan de este modo conseguir dicha detección de MtbC y dicha discriminación de especies en una única ejecución de amplificación. Estos cebadores y sondas ventajosamente se diseñan por referencia a dichas dianas IS6110 y RD9.

25 Los métodos de amplificación, especialmente la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y métodos basados en PCR son conocidos en la técnica (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Maniatis, Fritsch, y Sambrook, CSHL Press; Molecular Biology of the Cell, Alberts et al.; PCR Primer: A Laboratory Manual, Dieffenbach y Dveksler, CSHL Press; The Polymerase Chain Reaction, Mullis, Ferre, y Gibbs, Birkhauser Boston Press; Gene quantification, Ferre, Birkhauser Boston Press.)

30 La presente invención describe ácidos nucleicos (oligonucleótidos y polinucleótidos) que están especialmente adaptados para la implementación de una PCR combinada sobre una muestra biológica, y más particularmente de una PCR al menos doble (dos dianas, es decir, IS6110 y RD9), más preferiblemente de al menos PCR triple (dos dianas, es decir, IS6110 y RD9, y un control interno).

35 Por PCR combinada, en la presente se entiende cualquier reacción de PCR que tiene como propósito la amplificación de más de una diana. Por ejemplo, PCR combinada incluye PCR doble (dos dianas), PCR triple (tres dianas), y PCR combinada superior.

40 Naturalmente, los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención también son adecuados para otros protocolos, incluyendo protocolos simples, protocolos combinados, protocolos de punto final, protocolos cualitativos, protocolos cuantitativos, combinaciones de los mismos, y similares.

45 Por ácido nucleico, en la presente se entiende cualquier ácido nucleico: puede ser sintético o no, recombinante o de origen natural, lineal o circular. Esto incluye ADN y ARN. El ácido nucleico puede ser monocatenario o bicatenario o incluso de triple hélice. Puede proceder de diversas fuentes biológicas, tales como microorganismos (bacterias y similares), u organismos superiores, como células de mamífero (por ejemplo, células humanas, o células de mamífero no humano). El ácido nucleico también puede comprender ADN total, ARN total, ADN genómico, ADN mitocondrial, ADN plasmídico, ADN BAC, y mezclas de los mismos. Además, el ácido nucleico puede asumir diversos estados de pureza.

50 Por muestra, en la presente se entiende cualquier tipo de muestra, de origen natural o no. Preferiblemente, dicha muestra es de origen biológico. Dicha muestra también puede proceder un sobrenadante de cultivo celular. En una realización preferida, dicha muestra es o derivad de un aspirado bronquial, un lavado bronquial, esputo, tejidos pulmonares, fluido cefalorraquídeo, sangre, orina. Dicha muestra también puede resultar de una etapa preliminar. Por ejemplo, dicha muestra puede obtenerse mediante un procedimiento de purificación y/o extracción. En particular, dicha muestra puede resultar de un proceso de separación y/o purificación y/o extracción realizado sobre una muestra biológica. Dicha muestra también puede ser una muestra de control. Las muestras de control incluyen muestras como control de calidad, control positivo, control negativo, control cuantitativo, y control de calibración. Dicho control puede ser interno así como externo. Cualquier muestra de acuerdo con la presente invención puede estar presente varias veces. Por ejemplo, dicha muestra puede proporcionarse duplicada, triplicada, cuadruplicada, o multiplicada más veces, lo que es ventajoso en el caso de experimentos cuantitativos.

65 Los especialistas en la técnica están familiarizados con la noción de molde diana. Dicho molde diana puede ser cualquier ácido nucleico, cuya presencia tiene que evaluarse en dicho método. Dicho molde diana es posiblemente,

pero no necesariamente, el ácido nucleico a amplificar en dicho método (amplificación de PCR).

Por polinucleótido, en la presente se entiende cualquier polímero de nucleótidos, donde los nucleótidos pueden ser ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos, didesoxirribonucleótidos, nucleótidos degenerados, y similares. Dichos nucleótidos son preferiblemente monocatenarios, pero también pueden ser bicatenarios. La longitud de dichos polinucleótidos puede variar, y está habitualmente por debajo de 500 nucleótidos (nt), preferiblemente en el intervalo de 50-400 nt, más preferiblemente 100-300 nt, incluso más preferiblemente 150-250 nt. Por ejemplo, la diana IS6110 seleccionada de la SEC ID N° 2 es de 201 nt, y la diana RD9 seleccionada de la SEC ID N° 8 es de 172 nt.

Por oligonucleótido, en la presente se entiende cualquier polímero corto de nucleótidos, donde los nucleótidos pueden ser ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos, didesoxirribonucleótidos, nucleótidos degenerados, y similares. Dichos oligonucleótidos son preferiblemente monocatenarios. La longitud de dichos oligonucleótidos puede variar, y está habitualmente por debajo de 150 nucleótidos (nt), preferiblemente en el intervalo de 10-100 nt, más preferiblemente 15-60 nt, incluso más preferiblemente 18-50 nt. Dichos oligonucleótidos pueden albergar modificaciones químicas, tales como marcas o marcadores, por ejemplo marcaje radiactivo, fluorescente, biotinilado, dig. Un oligonucleótido de acuerdo con la invención puede ser directo (con sentido) o inverso (antisentido). Además, conviene destacar que aunque pueden mencionarse funciones preferidas en relación a algunos oligonucleótidos de acuerdo con la presente invención, es obvio que un oligonucleótido dado puede asumir varias funciones, y puede usarse de diferentes modos de acuerdo con la presente invención. Ejemplo, un oligonucleótido puede usarse como cebador, o como sonda. Además, cuando se describe un oligonucleótido como útil como sonda, los especialistas en la técnica entienden que la secuencia complementaria de este oligonucleótido es igual de útil como sonda para abordar el mismo amplificación. Además, también es obvio que cualquier cebador adecuado para un ensayo combinado, también puede, dentro del significado de la presente invención, usarse en un protocolo simple.

Los oligonucleótidos de acuerdo con la invención incluyen especialmente cebadores de PCR y sondas. Salvo que se indique de otro modo, las secuencias de ácido nucleico se dan en la dirección 5' a 3'. Dichos oligonucleótidos pueden estar en muchas formas, por ejemplo, en estado seco, en solución/suspensión con el disolvente deseado y la concentración deseada. Los especialistas en la técnica conocerían los disolventes, concentraciones, condiciones de almacenamiento que son adecuados para los oligonucleótidos de la invención. En particular, los especialistas en la técnica conocerían el modo de preparar dichos oligonucleótidos como soluciones madre. Los oligonucleótidos de acuerdo con la invención también pueden asumir diversos grados de pureza, según el criterio de los especialistas en la técnica, por ejemplo, por cromatografía HPLC.

En la presente solicitud, cuando un producto, tal como un ácido nucleico, un polinucleótido, un oligonucleótido, un cebador, una sonda, un amplificación, una secuencia molde de referencia, etc., se dice que comprende una secuencia definida, el alcance de dicha expresión debe entenderse como abarcando también la situación en que dicho producto consta de dicha secuencia definida.

La noción de cebador o cebador de PCR es conocida por los especialistas en la técnica. Por ejemplo, incluye un oligonucleótido capaz de hibridar con un molde diana en condiciones de rigurosidad adecuadas, y que permite la elongación de la hebra por polimerasa. La longitud típica de un cebador es de 10-30 nt, preferiblemente 10-18 nt, más preferiblemente 15-18 nt, por ejemplo, 15, 16, 17 o 18 nt.

Las condiciones de rigurosidad adecuadas comprenden notablemente condiciones de elevada rigurosidad. Condiciones ilustrativas de alta rigurosidad son temperatura y condiciones iónicas usadas durante hibridación y/o lavado de ácidos nucleicos. Las "condiciones altamente rigurosas" así como los factores que afectan a la tasa de hibridación son conocidos por los especialistas en la técnica, y pueden hallarse en, por ejemplo, Maniatis et al. 1982, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory. Generalmente, las condiciones altamente rigurosas se seleccionan para que sean de aproximadamente 5 a 20°C inferiores al punto de fusión térmico TM del oligonucleótido a una fuerza iónica y pH definidos. La T_m es la temperatura (en fuerza iónica y pH definidos) a la cual el 50% de una secuencia diana complementaria hibrida con una sonda perfectamente apareada. Para híbridos ADN-ADN, la T_m puede obtenerse de forma aproximada de la ecuación de Meinkoth y Walh (Anal. Biochem. 1984, 138:267-284): $T_m = 69,3 + 0,41x(CG)\% - 650/L$, donde L es la fuerza de la sonda en nucleótidos. "Condiciones altamente rigurosas" también se refiere a un procedimiento de lavado.

Se dan otras condiciones ilustrativas de rigurosidad en los siguientes ejemplos.

La noción de sonda también es conocida para los especialistas en la técnica. Por ejemplo, incluye un oligonucleótido capaz de hibridar con un molde diana en las condiciones de hibridación deseadas. La longitud típica de una sonda es de 50-60 nt, preferiblemente 15-40 nt, más preferiblemente 15-30 nt, mucho más preferiblemente 15-28 nt, por ejemplo, 16-27 nt. Preferiblemente, dicha sonda está marcada de forma fluorescente. Sin embargo, está claro para los especialistas en la técnica que en ciertas condiciones, se puede usar un cebador como sonda y viceversa. Además, se destaca en este documento que los productos de acuerdo con la invención, especialmente, entre otros, los oligonucleótidos, no están limitados al uso pretendido en este documento mencionado, sino que en su lugar tienen que interpretarse ampliamente, independientemente del destino indicado. Por ejemplo, una reivindicación a un producto (oligonucleótido) para un uso particular debe interpretarse como si indicara un producto (oligonucleótido) que de hecho es adecuado para el uso indicado. Por tanto, un oligonucleótido adecuado para su uso como cebador en un protocolo combinado también está claramente adaptado a un protocolo simple dentro del significado de la presente invención.

Son conocidos en la técnica diversos formatos (tipos) de sondas, incluyendo sondas Taqman™ (sondas de hidrólisis), balizas moleculares (sondas de baliza o sondas de baliza molecular), y sondas Scorpion™.

Las sondas de ácido nucleico pueden comprender agentes intercalantes, tales como uno o varios colorantes intercalantes, dentro de su secuencia de nucleótidos.

5 En una realización preferida, las sondas de acuerdo con la invención pueden sintetizarse todas y usarse en el formato de baliza molecular.

La estructura de las balizas moleculares es la siguiente. Una corta secuencia de nucleótidos (llamado brazo de baliza) que no está relacionada con la secuencia diana se une covalentemente a ambos extremos de la sonda. De este modo se une un corto brazo no relacionado en 5' de la sonda, y se marca con un resto fluorescente (es decir, colorante fluorescente o marcador fluorescente). Otro brazo tampoco relacionado se une al extremo 3' de la sonda y se marca con un resto inactivador de la fluorescencia. Por tanto, las balizas moleculares tienen un fluoróforo y un inactivador en extremos opuestos. El brazo corto 5' es totalmente complementaria a que está en 3' de modo que pueden hibridar juntos, y por tanto pueden asumir una estructura de horquilla cuando no están hibridados con la diana en solución. En esta conformación de horquilla, el inactivador y el colorante fluorescente están suficientemente cerca entre sí para permitir una eficaz inactivación del fluoróforo. Sin embargo, cuando la sonda encuentra una molécula diana, está favorecida la hibridación con respecto a la conformación en horquilla cuando se eligen adecuadamente los valores de la T_m del brazo de baliza y de la T_m de la sonda (teóricamente: T_m de la sonda > T_m del brazo de baliza > T_m del cebador, donde T_m es la temperatura de fusión de interés). El fluoróforo y el inactivador se alejan entre sí y entonces el fluoróforo puede emitir fluorescencia cuando se ilumina mediante excitación de luz adecuada. Según procede la PCR, se acumula producto de amplificación, y la cantidad de fluorescencia en cualquier ciclo dado depende de la cantidad de producto de amplificación presente en ese momento. (Véase, por ejemplo, Sanjay Tyagi y Fred Russell Kramer, Nature Biotechnology 1996, volumen 14, páginas 303-308; Nature Biotechnology 1998, volumen 16, páginas 49-53). Por supuesto, también es posible unir el fluoróforo al extremo 3', uniéndolo al mismo tiempo el inactivador al extremo 5'. Esquemáticamente, dicha sonda puede tener las siguientes fórmulas (formato de baliza molecular):

5' Fluoróforo-(brazo 1)-sonda-(brazo)-Inactivador 3'
5' Inactivador-(brazo 1)-sonda-(brazo 2)-Fluoróforo 3'

30 donde brazo 1 y brazo 2 pueden ser cualquier secuencia corta de nucleótidos, por ejemplo, en el intervalo de 3-10 nucleótidos, preferiblemente 5, 6, 7 nucleótidos, lo que permite la formación de la estructura de horquilla en condiciones de rigurosidad adecuadas, es decir, el brazo 1 y el brazo 2 son totalmente complementarios para hibridar en condiciones de rigurosidad deseadas (las condiciones de rigurosidad de PCR convencional incluyen, por ejemplo, una temperatura de hibridación de 55 a 65°C y una concentración de Mg de 4 a 8 mM). Sin embargo, el brazo 1 y el brazo 2 no están relacionados con la secuencia diana de la sonda, es decir, la conformación de horquilla resultante de la hibridación entre el brazo 1 y el brazo 2 es esencialmente la única estructura secundaria posible para la sonda cuando no está hibridada. Los especialistas en la técnica conocerían el modo de elegir dichos brazos para una sonda dada. Por ejemplo, formatos de baliza posibles incluyen:

40 CGTGCG-(secuencia de la sonda)-CGCACG
ATGCGG-(secuencia de la sonda)-CCGCAT

45 Por fluoróforo, se entiende en este documento cualquier marcador/colorante fluorescente conocido en la técnica. Ejemplos de dichos marcadores fluorescentes adecuados incluyen Fam, Hex, Tet, Joe, Rox, Tamra, Max, Edans, colorantes Cy tales como Cy5, Fluoresceína, Cumarina, Eosina, Rodamina, Bodipy, Alexa, Azul Cascade, Amarillo Yakima, Amarillo Lucifer y Rojo Texas (todos ellos marcas registradas).

50 Por inactivador, en este documento se entiende cualquier inactivador conocido en la técnica. Ejemplos de dichos inactivadores incluyen Dabcyl, Dark Quencher, Eclipse Dark Quencher, ElleQuencher, Tamra, BHQ y QSY (todos ellos marcas registradas).

Los especialistas en la técnica conocerían las combinaciones de colorante/inactivador que son adecuadas cuando se diseña una sonda.

55 En una realización preferida de acuerdo con la invención, pueden elegirse las propiedades espectrales de dichas sondas para que no interfieran entre sí. En particular, cuando se usan sondas en combinación, cada sonda individual puede tener su propio fluoróforo espectralmente diferente de forma significativa de las otras, es decir, los espectros de absorción/emisión son esencialmente no solapantes. Esto permite ventajosamente la detección combinada de bajo ruido para todas las sondas individuales, asegurando que las señales individuales no interfieren entre sí en la detección. Ejemplos de colorante que pueden usarse juntos en combinación incluyen Fam con Tamra, Fam con Tamra con Rojo Texas. Todos los oligonucleótidos y polinucleótidos proporcionados pueden mantenerse por separado, o parcialmente mezclados, o totalmente mezclados.

60 Dichos oligonucleótidos y polinucleótidos pueden proporcionarse en forma seca, o solubilizados en un disolvente adecuado, según el criterio de los especialistas en la técnica. Los disolventes adecuados incluyen TE, agua calidad PCR, y similares.

65 La presente invención se refiere a un par de cebadores que se ha diseñado de modo que pueda conducir a la amplificación de dicha diana IS6110 seleccionada de la SEC ID N° 2, y a un par de cebadores que se ha diseñado

de modo que pueda conducir a la amplificación de dicha diana RD9 seleccionada de la SEC ID N° 8.

La presente invención por tanto se refiere a una serie de cebadores, que comprende al menos dos pares de cebadores. Dichos al menos dos pares de cebadores son adecuados para la detección específica y sensible de una micobacteria del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* (MtbC), y/o para la discriminación específica y sensible de *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium canetti* por un lado, de las otras cepas de dicho MtbC por otro lado. Dichos al menos dos pares de cebadores tienen secuencias tales que pueden usarse en forma combinada en una única ejecución de amplificación ofreciendo aún al mismo tiempo una detección y discriminación específicas y sensibles.

Dichos al menos dos pares de cebadores son un par de cebadores de IS6110 que consiste en un cebador directo de IS6110 y un cebador inverso de IS6110, y un par de cebadores de RD9 que consiste en un cebador directo de RD9 y un cebador inverso de RD9. Dicho cebador directo de RD9 es un fragmento 5'-terminal de 10 a 18 nucleótidos de la secuencia de la SEC ID N° 8, partiendo dicho fragmento 5'-terminal del primer nucleótido 5' de dicha SEC ID N° 8.

Dicho cebador inverso de RD9 es un fragmento 5'-terminal de 10 a 18 nucleótidos de la secuencia que es completamente complementaria de dicha SEC ID N° 8 sobre la longitud completa de dicha SEC ID N° 8, partiendo dicho fragmento 5'-terminal del primer nucleótido 5' de dicha secuencia complementaria.

Dicho cebador directo de IS6110 es un fragmento 5'-terminal de 10 a 18 nucleótidos de la secuencia de la SEC ID N° 2, partiendo dicho fragmento 5'-terminal del primer nucleótido 5' de dicha SEC ID N° 2.

Dicho cebador inverso de IS6110 es un fragmento 5'-terminal de 10 a 18 nucleótidos de la secuencia que es completamente complementaria de dicha SEC ID N° 2 sobre la longitud completa de dicha SEC ID N° 2, partiendo dicho fragmento 5'-terminal del primer nucleótido 5' de dicha secuencia complementaria.

Cada uno de dichos cebadores preferiblemente es un fragmento de 10 a 18 nucleótidos, 11 a 18 nucleótidos, 12 a 18 nucleótidos, 13 a 18 nucleótidos, 14 a 18 nucleótidos, 15 a 18 nucleótidos, 16 a 18 nucleótidos, 17 a 18 nucleótidos, por ejemplo, 17 nucleótidos.

Dicho cebador directo RD9 puede comprender ventajosamente la secuencia de la SEC ID N° 1 (cebador RD389).

Dicho cebador inverso de RD9 puede comprender ventajosamente la secuencia de la SEC ID N° 12 (cebador RD561).

Dicho cebador directo de IS6110 puede comprender ventajosamente la secuencia de la SEC ID N° 5 (cebador IS368).

Dicho cebador inverso de IS6110 puede comprender ventajosamente la secuencia de la SEC ID N° 6 (cebador IS569).

Preferiblemente, dichos cebadores directo e inverso de IS6110 son (independientemente uno del otro) de 10-18 nucleótidos por ejemplo, de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, o 18 nucleótidos. Más preferiblemente, dichos cebadores directo e inverso de IS6110 son (independientemente uno del otro) de 14-18 nucleótidos por ejemplo, de 15-18, 15-17, por ejemplo 15, 16 o 17 nucleótidos.

Preferiblemente, dichos cebadores directo e inverso de RD9 son (independientemente uno del otro) de 10-18 nucleótidos por ejemplo, de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, o 18 nucleótidos. Más preferiblemente, dichos cebadores directo e inverso de RD9 son (independientemente uno del otro) de 14-18 nucleótidos por ejemplo, de 15-18, 15-17, por ejemplo 15, 16 o 17 nucleótidos.

La presente divulgación también se refiere a cada uno de dichos pares de cebadores, y cada uno de dichos cebadores, como una entidad individual.

La presente divulgación, por tanto, se refiere a un par de cebadores seleccionado entre dicha serie de al menos dos pares de cebadores (es decir, un par de cebadores de RD9, o un cebadores de IS6110 primer), y a un cebador seleccionado entre dicho par de cebadores (es decir, un cebador directo de RD9, un cebador inverso de RD9, un cebador directo de IS6110, un cebador inverso de IS6110).

El uso de un par de cebadores que se ha diseñado de modo que pueda conducir a la amplificación de dicha diana IS6110 seleccionada de la SEC ID N° 2, y un par de cebadores que se ha diseñado de modo que pueda conducir a la amplificación de dicha diana RD9 seleccionada de la SEC ID N° 8, como cebadores de amplificación sobre una muestra biológica que contiene una micobacteria de MtbC que es diferente de la cepa de referencia de *M. tuberculosis* H37Rv, conducirá a la producción de un amplicón IS6110 y/o de un amplicón RD9, cuyas secuencias respectivas pueden variar ligeramente de las secuencias de referencia de la SEC ID N° 2 y/o SEC ID N° 8, respectivamente, dependiendo de la secuencia de ácido nucleico de la cepa micobacteriana particular de MtbC presente en dicha muestra.

Por ejemplo:

- cuando la presente invención se implementa sobre una muestra biológica que contiene una micobacteria de MtbC que es un tipo moderno de *M. tuberculosis*, se obtendrá un amplicón tanto RD9 como IS6110,
- cuando la presente invención se implementa sobre una muestra biológica que contiene una micobacteria de MtbC que es una *M. tuberculosis* ancestral, se obtendrá un amplicón RD9, pero no amplicón IS6110,
- cuando la presente invención se implementa sobre una muestra biológica que contiene una micobacteria de MtbC que no es *M. tuberculosis*, y que no es *M. canetti*, se obtendrá un amplicón IS6110, pero no amplicón RD9.

En cuando la micobacteria de MtbC contenida en dicha muestra biológica no es *M. tuberculosis* H37Rv, los amplicones obtenidos pueden tener secuencias variantes, con relación a dichas secuencias de referencia IS6110 y RD9 de la SEC ID N° 2 y N° 8. Dichas secuencias variantes tendrán aproximadamente el mismo tamaño que las

secuencias de referencia de la SEC ID N° 2 o la SEC ID N° 8, respectivamente.

Por ejemplo, un amplicón IS6110 obtenible por implementación de la presente invención tendrá un tamaño que varía de 190 a 210 nucleótidos, preferiblemente de 195 a 205 nucleótidos, más preferiblemente de 199 a 203 nucleótidos, y un amplicón RD9 obtenible por implementación de la presente invención tendrá un tamaño que varía de 160 a 185

5 nucleótidos, preferiblemente de 165 a 180 nucleótidos, más preferiblemente de 170 a 174 nucleótidos. Dichas secuencias variantes mostrarán un elevado grado de identidad con dichas secuencias de referencia de la SEC ID N° 2 o la SEC ID N° 8, respectivamente.

Por ejemplo, un amplicón IS6110 obtenible por implementación de la presente invención compartirá un mínimo del 95% de identidad de secuencia con la secuencia de referencia de la SEC ID N° 2, y un amplicón RD9 obtenible por

10 implementación de la presente invención compartirá un mínimo del 95% de identidad de secuencia con la secuencia de referencia de la SEC ID N° 8. Preferiblemente, dicha identidad de secuencia mínima será del 96%, 97%, 98%, o 99%. Dicho % de identidad se calcula sobre la longitud completa de dicha secuencia de referencia de la SEC ID N° 2 o la SEC ID N° 8, respectivamente. Dichas secuencias variantes que tienen un elevado grado de identidad puede caracterizarse, como alternativa, por el hecho de que hibridan con dicha secuencia de referencia IS6110 de la SEC

15 ID N° 2, o con dicha secuencia de referencia RD9 de la SEC ID N° 8, en condiciones altamente rigurosas. Las "condiciones altamente rigurosas" así como los factores que afectan a la tasa de hibridación son conocidos por los especialistas en la técnica, y pueden hallarse en, por ejemplo, Maniatis et al. 1982, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory. "Condiciones altamente rigurosas" ilustrativas, por ejemplo, comprenden hibridación en SSC 6x o SSPE 6x a 68°C en solución acuosa o a 42°C en presencia de formamida al 50%, y comprenden condiciones de

20 lavado de dicha secuencia variante hibridada con dicha secuencia de referencia en una solución acuosa que contiene SSC 0,1x y SDS 0,2, a temperatura ambiente durante 2-60 min., seguido de incubación en una solución que contiene SSC 0,1x a una temperatura aproximadamente 12-20°C por debajo de la Tm calculada del híbrido detectado, durante 2-60 min. Pueden hallarse otras condiciones altamente rigurosas ilustrativas en los siguientes ejemplos.

25 Por tanto, la presente divulgación también se refiere a dichos amplicones IS6110 y/o RD9 obtenibles por implementación de la presente invención sobre una muestra biológica que contiene una micobacteria de MtbC, y más particularmente una micobacteria de MtbC que es diferente de la cepa de referencia de M. tuberculosis H37Rv. La presente divulgación más particularmente se refiere a:

30 - cualquier polinucleótido que tenga un tamaño que varía de 190 a 210 nucleótidos, preferiblemente de 195 a 205 nucleótidos, más preferiblemente de 199 a 203 nucleótidos, y que

35

- comparte un mínimo del 95% de identidad de secuencia con la secuencia de referencia de la SEC ID N° 2 o con la secuencia que es completamente complementaria a la SEC ID N° 2 sobre la longitud completa de la SEC ID N° 2 (preferiblemente, una identidad de secuencia mínima del 96%, 97%, 98%, o 99%), y/o
- hibrida con la secuencia de referencia de la SEC ID N° 2 o con la secuencia que es completamente complementaria a la SEC ID N° 2 sobre la longitud completa de la SEC ID N° 2 en condiciones altamente rigurosas, y a

40 - cualquier polinucleótido que tenga un tamaño que varía de 160 a 185 nucleótidos, preferiblemente de 165 a 180 nucleótidos, más preferiblemente de 170 a 174 nucleótidos, y que

45

- comparte un mínimo del 95% de identidad de secuencia con la secuencia de referencia de la SEC ID N° 8 o con la secuencia que es completamente complementaria a la SEC ID N° 8 sobre la longitud completa de la SEC ID N° 8 (preferiblemente, una identidad de secuencia mínima del 96%, 97%, 98%, o 99%), y/o
- hibrida con la secuencia de referencia de la SEC ID N° 8 o con la secuencia que es completamente complementaria a la SEC ID N° 8 sobre la longitud completa de la SEC ID N° 8 en condiciones altamente rigurosas.

50 La presente divulgación se refiere a sondas que son adecuadas para la detección de los amplicones obtenibles por el uso de un par de cebadores de IS6110 y un par de cebadores de RD9 como cebadores en una reacción de amplificación realizada sobre una muestra biológica. Ventajosamente, dicha sonda es:

55 - la secuencia de la SEC ID N° 8, o la secuencia que es completamente complementaria a la SEC ID N° 8 sobre la longitud completa de la SEC ID N° 8, o un fragmento de al menos 15 nucleótidos de dicha secuencia de la SEC ID N° 8 o de dicha secuencia complementaria, o

60 - la secuencia de la SEC ID N° 2, o la secuencia que es completamente complementaria a la SEC ID N° 2 sobre la longitud completa de la SEC ID N° 2, o un fragmento de al menos 15 nucleótidos de dicha secuencia de la SEC ID N° 2 o de dicha secuencia complementaria.

Preferiblemente, dicho fragmento de al menos 15 nucleótidos de dicha SEC ID N° 2 o SEC ID N° 8 es de menos de 30 nucleótidos, más preferiblemente es de 15-28 nucleótidos por ejemplo, de 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 o 28 nucleótidos, mucho más preferiblemente de 20-25 nucleótidos por ejemplo, de 23 nucleótidos.

65 La presente divulgación más particularmente se refiere a las siguientes sondas dirigidas a amplicón:

- la secuencia de la SEC ID N° 8, o la secuencia que es completamente complementaria a la SEC ID N° 8 sobre la longitud completa de la SEC ID N° 8, o un fragmento de al menos 15 nucleótidos y de menos de 29 nucleótidos de dicha secuencia de la SEC ID N° 8 o de dicha secuencia complementaria, o
- la secuencia de la SEC ID N° 2, o la secuencia que es completamente complementaria a la SEC ID N° 2 sobre la longitud completa de la SEC ID N° 2, o un fragmento de al menos 15 nucleótidos y de menos de 29 nucleótidos de dicha secuencia de la SEC ID N° 2 o de dicha secuencia complementaria.

Una sonda ventajosa adecuada para la detección de un amplicón RD9 es un fragmento de la secuencia que es complementaria a la SEC ID N° 8, donde dicho fragmento comprende la secuencia de la SEC ID N° 9 (sonda RD441). Preferiblemente, esta sonda dirigida a RD9 tiene menos de 30 nucleótidos, más preferiblemente 15-28 nucleótidos por ejemplo, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 o 28 nucleótidos, mucho más preferiblemente 20-25 nucleótidos, por ejemplo 23 nucleótidos.

Una sonda ventajosa adecuada para la detección de un amplicón IS6110, se caracteriza por que es un fragmento de la SEC ID N° 2 que comprende la secuencia de la SEC ID N° 3 (sonda IS503). Preferiblemente, esta sonda dirigida a IS6110 tiene menos de 30 nucleótidos, más preferiblemente 15-28 nucleótidos por ejemplo, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 o 28 nucleótidos, mucho más preferiblemente 20-25 nucleótidos por ejemplo, 23 nucleótidos.

Las sondas de la divulgación pueden comprender uno o varios agentes intercalantes dentro de su secuencia, tal como uno o varios colorantes intercalantes.

Las sondas de la divulgación pueden comprender al menos un brazo de baliza, preferiblemente dos brazos de baliza, uno en cada uno de sus extremos terminales (por ejemplo, CGTGCG-(secuencia sonda)-CGCACG; o ATGCGG-(secuencia sonda)-CCGCAT). Las sondas con baliza ventajosas comprenden notablemente la sonda de la SEC ID N° 10 (que es la sonda de la SEC ID N° 9 en formato baliza), y la sonda de la SEC ID N° 4 (que es la sonda de la SEC ID N° 3 en formato baliza).

Una sonda de la divulgación puede comprender un fluoróforo en su extremo 5' y/o un inactivador en su extremo 3', por ejemplo Tamra o Fam en su extremo 5', y/o Dabcyl en su extremo 3'.

La presente divulgación también se refiere a una serie de PCR, que consiste en al menos un par de cebadores de la invención y al menos una sonda de la invención. Más particularmente se refiere a una serie de PCR que consiste en al menos un par de cebadores de RD9 de la invención y al menos una sonda de RD9 de la invención, y a una serie de PCR que consiste en al menos un par de cebadores de IS6110 de la invención y al menos una sonda de IS6110 de la invención.

También se proporciona control interno (IC) adecuado que está especialmente adaptado para la implementación de la invención.

Se proporcionan oligonucleótidos y polinucleótidos adecuados para su uso como control interno (IC) en la detección específica y sensible de una micobacteria del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* (MtbC), y/o para la discriminación específica y sensible de *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium canetti* por un lado, de las otras cepas de dicho MtbC por otro lado.

Un oligonucleótido o polinucleótido IC de la presente divulgación ventajosamente comprende:

a. dos secuencias de sitio de unión a cebador, donde una de dichas dos secuencias de sitio de unión a cebador que está localizado 5' en relación el otro de dichas dos secuencias de sitio de unión a cebador es idéntica a un miembro de un par de cebadores de la invención (un par de cebadores de IS6110 o un par de cebadores de RD9), y la otra de dichas dos secuencias de sitio de unión a cebador es completamente complementaria al otro miembro del mismo par de cebadores de la invención, y

b. una secuencia que no está relacionada con *Mycobacterium*, que está localizada entre dichas dos secuencias de sitio de unión a cebador.

Preferiblemente, dicha secuencia no relacionada con *Mycobacterium* tampoco está relacionada con ningún ácido nucleico humano, más preferiblemente no relacionada con ningún ácido nucleico de mamífero.

Un IC ilustrativo puede constar de 92 bases:

- 17 bases localizadas en la región del extremo 5', y 17 bases localizadas en la región del extremo 3', que son idénticas, y respectivamente, completamente complementarias a los cebadores de IS6110, respectivamente (IS368 y IS569 de la SEC ID N° 5 y 6, respectivamente),
- estando las 58 bases restantes no relacionadas con las micobacterias (secuencia aleatoria).

Por ejemplo, un kit de la divulgación puede comprender un oligonucleótido o polinucleótido IC que se amplifica por un par de cebadores de IS6110, tal como el oligonucleótido IC de la SEC ID N° 13.

La presente divulgación proporciona adicionalmente sondas IC que están especialmente adaptadas para la detección de un oligonucleótido o polinucleótido IC de la invención (hibridando con dicha secuencia de control). Una sonda IC ilustrativa es la sonda de la SEC ID N° 14 (SIM ATTO 590).

La presente divulgación también se refiere a un kit para la detección específica y sensible de una micobacteria del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* (MtbC), y/o para la discriminación específica y sensible de *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium canetti* por un lado, de las otras cepas de dicho MtbC por otro lado, y a un kit para el diagnóstico *in vitro* de la tuberculosis. Un kit de la presente divulgación comprende:

- 5
- al menos una serie de dos pares de cebadores de la invención, y/o
 - al menos un par de cebadores de la invención, y/o
 - al menos un cebador de la invención, y/o
 - al menos una serie de dos oligonucleótidos molde de referencia de la invención, y/o
- 10
- al menos un polinucleótido molde de referencia de la invención, y/o
 - al menos una sonda de una cualquiera de la invención.

Un kit de la divulgación puede comprender notablemente una serie de PCR de la divulgación (es decir, al menos un par de cebadores de la divulgación, y al menos una sonda de la divulgación).

- 15
- En el kit de acuerdo con la divulgación, los ácidos nucleicos (cebadores, sondas) pueden mantenerse por separado, o parcialmente mezclados, o totalmente mezclados.

Dichos ácidos nucleicos pueden proporcionarse en forma seca, o solubilizados en un disolvente adecuado, según el criterio del especialista en la técnica. Disolventes adecuados incluyen TE, agua de calidad PCR, y similares.

- 20
- Dichos reactivos son conocidos para los especialistas en la técnica, e incluyen agua, como agua sin nucleasa, agua sin ADNasa, agua calidad PCR; sales, como magnesio, potasio; tampones tales como Tris; enzimas, incluyendo polimerasas, tales como Taq, Vent, Pfu (todas ellas marcas registradas), polimerasa activable, transcriptasa inversa, y similares; nucleótidos como desoxinucleótidos, didesoxinucleótidos, dNTP, dATP, dTTP, dCTP, dGTP, dUTP; otros reactivos, como DTT y/o inhibidores de RNasa; y polinucleótidos como poliT, polidT, y otros oligonucleótidos, por ejemplo cebadores.
- 25

El kit de acuerdo con la divulgación puede comprender controles de PCR. Dichos controles son conocidos en la técnica, e incluyen controles de calidad, controles positivos, controles negativos, controles internos (IC), controles cuantitativos, controles cuantitativos internos, así como rangos de calibración. El control interno para dicha etapa de PCR puede ser un molde que no esté relacionado con el molde diana en la etapa de PCR. Dichos controles también

- 30
- pueden comprender cebadores de control y/o sondas de control. Por ejemplo, en el caso de detección de micobacterias del MtbC, es posible usar como control interno, un polinucleótido elegido dentro de un gen cuya presencia se excluye en una muestra originaria de un cuerpo humano (por ejemplo, de un gen vegetal), y cuyo tamaño y contenido en GC es equivalente a los de la secuencia diana.
- 35

Un kit de la divulgación puede contener un oligonucleótido o polinucleótido IC de la invención, y/o una sonda IC de la invención.

Un kit de acuerdo con la divulgación puede contener medios para extraer y/o purificar el ácido nucleico de una muestra biológica, por ejemplo de aspirado bronquial, lavado bronquial, esputo, fluido cefalorraquídeo, orina, sangre, suero, plasma. Dichos medios son bien conocidos para los especialistas en la técnica.

- 40
- Un kit de la divulgación puede comprender un tampón de lisis para la extracción del ácido nucleico, por ejemplo un tampón de lisis que contenga una resina aniónica que se una a iones divalentes.

La lisis se realiza preferiblemente en presencia de detergentes y en presencia de una resina aniónica que se une a iones divalentes tales como las perlas Chelex X-100. Como característica ventajosa, dicha resina aniónica también es un agente caotrópico. Ejemplos de un tampón de lisis apropiado comprenden el tampón de lisis que contiene un 8% de resina Chelex X-100 (Bio-Rad, ref: 142-1253), NP-40 al 0,5% (Sigma, ref: Igepal 1-3021), Tween 20 al 0,5% (VWR, ref: 28829296) en tampón Tris 10 mM (Sigma, ref: T-6791), EDTA 1 mM, (Sigma ref: E-1644) pH 8,3.

- 45
- El kit de acuerdo con la divulgación puede contener instrucciones para el uso del mismo. Dichas instrucciones pueden ser ventajosamente un panfleto, una tarjeta, o similares. Dichas instrucciones también pueden estar presentes en dos formas: una detallada, que reúne información exhaustiva acerca del kit y el uso del mismo, incluyendo posiblemente también datos bibliográficos; y una forma de guía rápida o memo, por ejemplo en forma de una tarjeta, que reúne información esencial necesaria para el uso del mismo.
- 50

En una realización preferida, dicho kit es un kit de diagnóstico, especialmente un kit de diagnóstico *in vitro*, es decir un kit de diagnóstico de la tuberculosis.

La presente invención también se refiere a un método para detectar una micobacteria del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* (MtbC) en una muestra biológica, y/o para discriminar *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium canetti* por un lado, de las otras cepas de dicho MtbC por otro lado.

- 55
- Un método de la invención comprende la detección de dos secuencias de ácido nucleico diana, donde una de dichas dos secuencias diana es IS6110 o un fragmento de la misma, y la otra secuencia diana es RD9 o un fragmento de la misma, donde la detección de la presencia de dicha diana RD9 y de la presencia o ausencia de dicha diana IS6110 es indicativa de la presencia en dicha muestra biológica de una micobacteria que pertenece al MtbC, que es *M. tuberculosis* o *M. canetti*, donde la detección de la ausencia de dicha diana RD9 y de la presencia de dicha diana IS6110 es indicativa de la presencia en dicha muestra biológica de una micobacteria que pertenece al MtbC, que no es *M. tuberculosis*, donde la detección de la ausencia de dicha diana RD9 y la ausencia de dicha diana IS6110 es indicativa de la ausencia en dicha muestra biológica de una micobacteria que pertenece al MtbC.
- 60

65

La detección de la presencia de dicha diana RD9, y de la presencia o ausencia de dicha diana IS6110 es notablemente indicativa de la presencia en dicha muestra biológica de una micobacteria que pertenece al MtbC, que no es *M. bovis*.

5 Ventajosamente, notablemente para una implementación de PCR combinada del método, dicha secuencia diana RD9 consiste en la secuencia de la SEC ID N° 8, o en la secuencia que es completamente complementaria a la SEC ID N° 8 sobre la longitud completa de la SEC ID N° 8, y dicha secuencia diana IS6110 consiste en la secuencia de la SEC ID N° 2, o en la secuencia que es completamente complementaria a la SEC ID N° 2 sobre la longitud completa de la SEC ID N° 2.

10 La detección de la presencia de dicha diana RD9 y de la ausencia de dicha diana IS6110 es indicativa de la presencia en dicha muestra biológica de una micobacteria que pertenece al MtbC, que es *M. canetti*, o una cepa ancestral de *M. tuberculosis*.

15 La detección de la presencia de dicha diana RD9 y de la presencia de dicha diana IS6110 es indicativa de la presencia en dicha muestra biológica de una micobacteria que pertenece al MtbC, que es *M. canetti*, o una cepa de tipo moderno de *M. tuberculosis*.

La detección de la ausencia de dicha diana RD9 y de la presencia de dicha diana IS6110 es indicativa de la presencia en dicha muestra biológica de una micobacteria que pertenece al MtbC, que es *M. bovis*, *M. africanum*, *M. caprae*, *M. microti*, o *M. pinnipedii*.

20 De acuerdo con una característica ventajosa, el método puede implementarse por PCR.

De acuerdo con una característica muy ventajosa, el método puede implementarse en PCR combinada, notablemente mediante el uso de al menos un par de cebadores de la invención (al menos un par de cebadores de IS6110 y/o al menos uno de RD9) como cebadores de amplificación.

25 Un método de la invención puede comprender el uso de al menos una sonda de la invención como sonda de hibridación y/o como sonda de detección.

La presente invención se refiere a un método in vitro para el diagnóstico de la tuberculosis, caracterizado por que se determina la presencia o ausencia de una micobacteria del MtbC en una muestra biológica, y/o la presencia o ausencia de una cepa de *M. tuberculosis* o *M. canetti* en una muestra biológica, y/o la presencia o ausencia de una micobacteria del MtbC, que no es *M. tuberculosis*, en una muestra biológica, mediante implementación de dicho método de detección de MtbC y/o de discriminación de especies del MtbC sobre dicha muestra biológica.

35 Adicionalmente se proporciona un método para extraer el ácido nucleico de una muestra biológica para el análisis del MtbC. La lisis se realiza preferiblemente en presencia de detergentes y en presencia de una resina aniónica que se une a iones divalentes tal como las perlas Chelex X-100. Como característica ventajosa, dicha resina aniónica también es un agente caotrópico. Ejemplos del tampón de lisis apropiado comprenden el tampón de lisis que contiene un 8% de resina Chelex X-100 (Bio-Rad, ref: 142-1253), NP-40 al 0,5% (Sigma, ref: Igepal 1-3021), Tween 20 al 0,5% (VWR, ref: 28829296) en tampón Tris 10 mM (Sigma, ref: T-6791), EDTA 1 mM, (Sigma, ref: E-1644) pH 8,3.

40 La presente invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos, dados solamente con fines ilustrativos.

Ejemplo 1 (muestras bacterianas in vitro - especificidad y sensibilidad):

1. Material y métodos:

1.1. Extracción del ácido nucleico:

50 Se recogieron células bacterianas de 100 cultivos de diferentes cepas (54 cepas bacterianas diferentes de *Mycobacterium*; 26 cepas de *Mycobacterium* que no pertenecen al MtbC; 5 cepas de *M. bovis*, incluyendo 4 BCG de *M. bovis*; 23 cepas de *M. tuberculosis*; 6 cepas diferentes de *M. tuberculosis* o *M. bovis*, pero que pertenecen al MtbC - *M. pinnipedii*, *M. caprae*, 3 cepas de *M. africanum*, *M. microti*; 1 cepa de *M. canetti*).

55 La lisis se realiza en presencia de detergentes y en presencia de perlas Chelex X-100 (es decir, una resina aniónica que se une a iones divalentes). Como característica ventajosa, dicha resina aniónica también es un agente caotrópico.

60 Composición del tampón de lisis: 8% de resina Chelex X-100 (Bio-Rad, ref: 142-1253), NP-40 al 0,5% (Sigma, ref: Igepal 1-3021), Tween 20 al 0,5% (VWR, ref: 28829296) en tampón Tris 10 mM (Sigma, ref: T-6791), EDTA 1 mM, (Sigma, ref: E-1644) pH 8,3.

Procedimiento:

- 200 µl de muestra biológica
- 65 - 400 µl de tampón de lisis
- añadir 10 µl de control interno (IC) líquido

- agitar con vórtice 30"
- incubación 10 min. a 95°C
- centrifugación 5 min. a 8000 rpm
- PCR sobre 10 µl de sobrenadante

5 El control negativo se consigue reemplazando los 200 µl de muestra biológica, por 200 µl de tampón fosfato, pH 6,8 a 25 mM.

10 El IC se añade en la fase de extracción. Está en forma líquida. Se añaden diez µl del IC a los 200 µl de muestra biológica. La solución de IC contiene $9,6 \cdot 10^4$ copias de IC en 10 µl, para obtener $1,6 \cdot 10^3$ copias por ensayo de PCR después de la extracción (dilución 1/60).

1.2. Cebadores y sondas:

15 1.2.1. Sistema IS6110

Datos de EMBL sobre IS6110 =

20	LOCUS	MTIS6110 ADN lineal de 1360 pb BCT 07-JUL-2002
	DEFINICIÓN	elemento tipo IS IS6110 de Mycobacterium tuberculosis
	ACCESO	X17348 M29899
25	VERSIÓN	X17348.1 GI:48695
	PALABRAS CLAVE	elemento de inserción IS6110; transposón
	FUENTE	Mycobacterium tuberculosis H37Rv

30 Subsecuencia seleccionada dentro de IS6110 =

```

361 gctcgaccgg cagcagcgt aattaacggt tcatcgccga tcatcagggc caccgcgagg
421 gccccgatgg ttgcggtgg ggtgtcgagt cgatctgcac acagctgacc gagctgggtg
35 481 tgccgatcgc cccatcgacc tactaccgacc acatcaaccg ggagcccagc cgccgagcgc
541 tgcgcatggt cgaacttcaag gagcacatca gcgcggtcca cgccgccaac tacggtgttt
(= SEC ID Nº 1 = de 361 hasta 600)

```

40 En la anterior SEC ID Nº 1, se muestran subrayadas las secuencias de los cebadores y la sonda que se usan en el sistema IS6110:

- de 372 a 387: cebador directo IS368;
- de 506 a 528: sonda IS503;
- de 556 a 572: secuencia complementaria del cebador inverso IS569.

45 Secuencia diana de amplificación de IS6110 en formato monocatenario=

```

372          cagcagcgt aattaacggt tcatcgccga tcatcagggc caccgcgagg
50 421 gccccgatgg ttgcggtgg ggtgtcgagt cgatctgcac acagctgacc gagctgggtg
481 tgccgatcgc cccatcgacc tactacgacc acatcaaccg ggagcccaagc cgccgagcgc
541 tgcgcatggt cgaactcaag gagcacatca gc
(= SEC ID Nº 2 = de 372 hasta 572)

```

Sonda de IS6110:

55 Sonda IS503 = CGACCACATCAACCGGGAGCCCA (SEC ID Nº 3)
 Brazos Molecular Beacon® = ATGCGG y CCGCAT
 Colorante indicador e inactivador = Tamra® y Dabcyl®
 IS503 en formato Beacon®: sonda IS503MB =
 60 5'-Tamra-ATGCGGCGACCACATCAACCGGGAGCCCAACCGCAT- Dabcyl-3' (SEC ID Nº 4)

Cebador directo de IS6110:

65 Cebador IS368 = 5'-CAGCACGCTAATTACCC-3' (SEC ID Nº 5)

Cebador inverso de IS6110:

Cebador IS569 = 5'-GCTGATGTGCTCCTTGA-3' (**SEC ID N° 6**)

5 1.2.2. Sistema RD9:

LOCUS BX842578 ADN lineal de 1464 pb BCT 10-JUN-2004

DEFINICIÓN genoma completo de Mycobacterium tuberculosis H37Rv; segmento 7/13

10

ACCESO BX842578 REGIÓN: complemento (252713..254176)

Desde la posición 250.271 hasta la posición 254.176: secuencia de RD9

Desde la posición 252.713 hasta la posición 254.176 de BX842578: secuencia de Rv2075c (subsecuencia de RD9).

15

Subsecuencia seleccionada dentro de RD9 (subsecuencia seleccionada dentro de la secuencia Rv2075c contenida dentro de RD9):

20

```

351 tgaccccgca atcggtcacg gccggcacct tcggcqqggg t aagcgctgc
401 ggattggccg gtggacgggt cgggttgcc aacgccgtgg ccagcgtgga
451 gtcctcgtaa tagcggacca gtcgccaagc gtagacaccg cggccatagg
501 tggcatcgca ggccgggtat ggccggtagc cggagttcga gccgctttcc
551 agctcaacgc cgcctccagtc gaagacggcg gccgaccaac ctggcgaca

```

(= SEC ID N° 7 = de 351 hasta 600)

25

En la anterior SEC ID N° 7, se muestran subrayadas las secuencias de los cebadores y la sonda que se usan en el sistema RD9:

- de 390 a 406: cebador directo RD389;
- 30 - de 441 a 464: secuencia complementaria de la sonda RD441;
- de 545 a 561: secuencia complementaria del cebador inverso RD561.

Secuencia diana de amplificación de RD9 en formato monocatenario =

35

```

390 t aagcgctgc
401 ggattggccg gtggacgggt cgggttgcc aacgccgtgg ccagcgtgga
451 gtcctcgtaa tagcggacca gtcgccaagc gtagacaccg cggccatagg
501 tggcatcgca ggccgggtat ggccggtagc cggagttcga gccgctttcc
551 agctcaacgc c

```

40

(= SEC ID N° 8 = de 390 hasta 561)

Sonda de RD9:

Sonda RD441 = GCTATTACGAGGACTCCACGCTGG (**SEC ID N° 9**)

45

Brazos Molecular Beacon® = CGTGCG y CGCACG

Colorante indicador e inactivador = Fam y DabcyI®

RD441 en formato Beacon®: sonda RD441 MB =

5'-Fam-CGTGCGGCTATTACGAGGACTCCACGCTGGCGCACG-DabcyI-3' (**SEC ID N° 10**)

50 Cebador directo de RD9:

RD389 = 5'-TAAGCGCCTGCGGATTG-3' (**SEC ID N° 11**)

Cebador inverso de RD9:

55

RD 561 = 5'-GGCGTTGAGCTGGAAAG- 3' (**SEC ID N° 12**)

1.3. Control interno (IC):

60 El control interno (IC) consiste en una secuencia monocatenaria. El IC se selecciona para que comprenda una secuencia que no esté relacionada con las secuencias diana de amplificación, estando flanqueada dicha secuencia no relacionada en 5' y 3' por secuencias que son secuencias diana apropiadas para uno de los pares de cebadores que se usan en la reacción de PCR (par de cebadores de IS6110, o par de cebadores de RD9).

65 El IC comprende una secuencia en su región final 5', y otra secuencia en su región final 3', donde dicha secuencia contenida en 3' hibrida con un miembro del par de cebadores de IS6110, y dicha secuencia contenida en 5' hibrida

con la secuencia complementaria del otro miembro del mismo par de cebadores de IS6110. Preferiblemente, dicha secuencia contenida en 3' es completamente complementaria a un miembro del par de cebadores de IS6110, y dicha secuencia contenida en 5' tiene la misma secuencia que el otro miembro del mismo par de cebadores de IS6110.

5 Como alternativa, puede usarse un par de cebadores de RD9 en lugar de un par de cebadores de IS6110: el propósito es tener un IC que se amplifique por uno de los pares de cebadores que se implementan en la ejecución de PCR, pero que comprende entre dicha secuencia contenida en 5' y dicha secuencia contenida en 3' una secuencia que no está relacionada con *Mycobacterium*, preferiblemente no relacionada con ácidos nucleicos bacterianos y de mamífero.

10 El IC del presente ejemplo contiene en su región final 5' una secuencia que es idéntica a un miembro del par de cebadores de IS6110, y en su región final 3', una secuencia que es completamente complementaria al otro miembro del mismo par de cebadores de IS6110.

15 El IC del presente ejemplo consta de 92 bases:

- 17 bases localizadas en la región final 5' y 17 bases localizadas en la región final 3', que son idénticas y, respectivamente, completamente complementarias a los cebadores de IS6110 (IS368 y IS569 de la SEC ID N° 5 y 6, respectivamente),
- 20 - estando las 58 bases restantes no relacionadas con micobacterias (secuencia aleatoria).

El IC del presente ejemplo tiene la siguiente secuencia:

25 **ATTGGATCCCAGCACGCTAATTACCCAGTATCAGATGACGTGGCAGCCATGA**
GAGTGGGACAGTCGTCCTTCAAGGAGCACATCAGCGGATC (SEC ID N° 13)

En la anterior SEC ID N° 13, se muestran subrayados (de 5' a 3'):

- IS368 (cebador directo de IS6110 de la SEC ID N° 5),
- 30 - la sonda IC, y
- la secuencia diana de IS569 (es decir, la secuencia complementaria del cebador inverso de IS6110 de la SEC ID N° 6).

35 Sonda IC = SIM ATTO 590 = GACGTGGCAGCCATGAGAGTGGG (**SEC ID N° 14**), a la cual se añaden brazos de baliza en sus extremos 5' y 3' terminales.

1.4. Condiciones experimentales ilustrativas para PCR triple:

Reactivos:

- 40 Hot Start Taq Polimerasa Qiagen (5U/μl, ref 203205), que contiene el tampón de PCR
- dNTP: Promega ref U151x (4X 25 mM)
- MgCl₂: Sigma, ref M-2670
- PVP10: Sigma, ref: PVP-10
- 45 Glicerol: VWR, ref: 24388295

Termociclador.

50 iQ1 (Bio-Rad)

Composición de la mezcla de PCR 1X:

55 En la mezcla de PCR 1X, se añaden: 0,2 μM de la sonda de RD9 en formato baliza (SEC ID N° 10), 0,2 μM de la sonda IC (SEC ID N° 14) en formato baliza, 0,4 μM de la sonda de IS6110 en formato baliza (SEC ID N° 4), 0,5 μM de cada uno de dichos cuatro cebadores, glicerol al 5%, PVP 10 al 0,3%, 2U de Taq Polimerasa, 1 mM de dNTP y 5 mM final de MgCl₂.

Se añaden diez microlitros de ADN a esta mezcla.

Termociclado:

- 60 - Primer ciclo: 15' a 95°C,
- Repetido 50 veces:

65 Segundo ciclo: 30" a 95°C
Tercer ciclo: 30" a 59°C
Cuarto ciclo: 30" a 72°C

- Temperatura mantenida a 20°C hasta la abertura del aparato

2. Resultados:

5 2.1. Especificidad de los cebadores y sondas cuando se usan en combinación:

Los cebadores y sondas seleccionados de IS6110 y RD9 son específicos de MtbC: no muestran homología significativa con un ácido nucleico diferente del de las micobacterias del MtbC.

10 Ventajosamente, los cebadores y sonda seleccionados de IS6110 y RD9 siguen siendo específicos incluso cuando se usan en combinación triple.

Su especificidad de "calidad triple" puede ilustrarse sobre lisados bacterianos.

Se comprobó la presencia de ADN por amplificación eficaz de ADN 16S.

Una respuesta IC positiva valida el ensayo de tuberculosis por PCR.

15 Los resultados en combinación triple fueron los siguientes:

Tabla 4:

Cepas bacterianas	IS6110	RD9	IC
54 cepas bacterianas diferentes de Mycobacterium	-	-	+
26 cepas de Mycobacterium que pertenecen al MtbC	-	-	+
5 cepas de M. bovis, incluyendo 4 BCG de M. bovis	+	-	+
23 cepas de M. tuberculosis	+	+	+
6 cepas diferentes de M. tuberculosis o M. bovis, pero que pertenecen al MtbC (<i>M. pinnipedii</i> , <i>M caprae</i> , 3 cepas de <i>M. africanum</i> , <i>M microti</i>)	+	-	+
<i>M. canetti</i>	+	+	+

Los resultados detallados se muestran en la siguiente tabla 5.

Tabla 5:

Cepas bacterianas	IS6110	RD9
<i>Escherichia coli</i> , cepa clínica	-	-
<i>Citrobacterfreundii</i> , cepa clínica	-	-
<i>Salmonella typhi</i> , cepa clínica	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> , cepa clínica	-	-
<i>Enterococcus faecium</i> , cepa clínica	-	-
<i>Corynebacterium pseudodiphtheriticum</i> , CIP 103420 T	-	-
<i>Corynebacterium diphtheriae</i> , CIP 100161T	-	-
<i>Aeromonas hydrophila</i> , CIP 103561	-	-
<i>Enterobactercloacae</i> , CIP 103624	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> , CIP 76,25	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , CIP 76,10	-	-
<i>Neisseria meningitidis</i> , cepa clínica	-	-
<i>Serratia marcescens</i> , cepa clínica	-	-
<i>Acinetobacter Iwoffii</i> , cepa clínica	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> , CIP 104298	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i> , CIP 103656	-	-
<i>Streptococcus oralis</i> , CIP 103216	-	-
<i>Streptococcus mutans</i> , CIP 103694	-	-
<i>Streptococcus pyogenes</i> , CIP 104226	-	-
<i>Streptococcus pneumoniae</i> , CIP 104340	-	-
<i>Acinetobacter baumannii</i> , CIP 103572	-	-
<i>Burkholderia cepacia</i> , CIP 80.24T	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae subsp ozaenae</i> , CIP 52.212	-	-

ES 2 446 517 T3

Cepas bacterianas	IS6110	RD9
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> cepa H37rv, ATCC25618	+	+
<i>Neisseria mucosa</i> , cepa clínica	-	-
<i>Bacteroides fragilis</i> , CIP 77.16	-	-
<i>Fusobacterium nucleatum</i> , CIP 101130	-	-
<i>Nocardia asteroides</i> , cepa clínica	-	-
<i>Rhodococcus equi</i> , cepa clínica	-	-
<i>Bordetella pertussis</i> , cepa clínica	-	-
<i>Mycoplasma orale</i> , ATCC23714	-	-
<i>Mycobacterium mucogenicum</i> , cepa clínica	-	-
<i>Mycobacterium bovis</i> BCG, cepa clínica	+	-
<i>Mycobacterium bovis</i> BCG, cepa clínica	+	-
<i>Mycobacterium africanum</i> , cepa clínica	+	-
<i>Mycobacterium africanum</i> , cepa clínica	+	-
<i>Mycobacterium africanum</i> , cepa clínica	+	-
<i>Bacteroides fragilis</i> , cepa clínica	-	-
<i>Bacteroides fragilis</i> , cepa clínica	-	-
<i>Bacteroides fragilis</i> , cepa clínica	-	-
<i>Mycobacterium chelonae</i> , DSMZ 43804	-	-
<i>Mycobacterium haemophilum</i> , DSMZ 44634	-	-
<i>Neisseria cinerea</i> , cepa clínica	-	-
<i>Mycobacterium celatum</i> , DSMZ 44243	-	-
<i>Mycobacterium scrofulaceum</i> , DSMZ 43992	-	-
<i>Mycobacterium malmoense</i> , DSMZ 44163	-	-
<i>Propionibacterium acnes</i> , DSMZ 1897	-	-
<i>Moraxella catarrhalis</i> , DSMZ 9143	-	-
<i>Mycobacterium peregrinum</i> , DSMZ 43271	-	-
<i>Eikenella corrodens</i> , DSMZ 8340	-	-
<i>Micromonas micros</i> , DSMZ 20468	-	-
<i>Prevotella melaninogenica</i> , DSMZ 7089	-	-
<i>Veillonella parvula</i> , DSMZ 2007	-	-
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> , ATCC 25177	+	+
<i>Mycobacterium microti</i> , ATCC 11152	+	-
<i>Actinomyces naeslundii</i> ATCC 12104	-	-
<i>Legionella pneumophila</i> , ATCC 33152	-	-
<i>Streptomyces coelicolor</i> ATCC BAA-471	-	-
<i>Chlamydia pneumoniae</i> , cepa CWL-029, ATCC VR-1310	-	-
<i>Chlamydia trachomatis</i> , serovar D cepa UW-3/CX	-	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i> , cepa clínica	-	-
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> , cepa clínica	-	-
<i>Salmonella enteritidis</i> , cepa clínica	-	-
<i>Legionella micdadei</i> , cepa clínica	-	-
<i>Mycobacterium genavense</i> , DSMZ 44424	-	-
<i>Mycobacterium interjectum</i> , DSMZ 44064	-	-
<i>Mycobacterium saskatchewanense</i> , DSMZ 44616	-	-
<i>Mycobacterium pinnipedii</i> , Institut Pasteur	+	-
<i>Mycobacterium caprae</i> , Institut Pasteur	+	-

2.2. Sensibilidad de la PCR:

Se realizó PCR triple por duplicado sobre un lisado de *M. tuberculosis* H37Rv pre-contada. Los resultados fueron los siguientes (tabla 6):

5

Tabla 6:

	Solución bacteriana		Ct		Media	Desviación típica	RFU	
	UFC/ml	UFC/10 μ l	1	2			1	2
IS 6110 Tamra	1,2 10 ⁷	1,2 10 ⁵	17,3	17,3	17,3	0	900	900
	1,2 10 ⁵	1,2 10 ³	23,3	23,4	23,35	0,07	875	875
	1,2 10 ³	12	31,2	30,3	30,75	0,63	500	575
	1,2 10 ²	1,2	35,5	35,8	35,65	0,21	300	400
	12	0,12	41,3	41,3	41,3	0	150	200
RD9 FAM	1,2 10 ⁷	1,2 10 ⁵	20,3	19,7	20	0,42	2250	2250
	1,2 10 ⁵	1,2 10 ³	27,2	27	27,1	0,14	2000	1750
	1,2 10 ³	12	34,8	34,3	34,55	0,35	1300	1300
	1,2 10²	1,2	38,3	38,4	38,35	0,07	1000	1000
	12	0,12	//	//	//	//	//	//
IC ATTO 590	1,2 10 ⁷	1,2 10 ⁵	33,2	33,3	33,25	0,07	80	800
	1,2 10 ⁵	1,2 10 ³	32,2	31,9	32,05	0,212	800	900
	1,2 10 ³	12	31,3	31,4	31,35	0,07	1200	1200
	1,2 10 ²	1,2	31,0	31,1	31,05	0,07	1300	1300
	12	0,12	31,6	31,1	31,35	0,35	1600	1400

Umbral de detección de PCR:

- 10 - 12 UFC/ml para IS6110, que corresponde a 0,12 copias por PCR
 - 120 UFC/ml para RD9, que corresponde a 1,2 copias por PCR

Los cebadores seleccionados de IS6110 y RD9 ventajosamente tienen una especificidad por *M. tuberculosis* (+ la muy rara *M. canetti*), y retienen esta especificidad cuando se usan en combinación. Adicionalmente permiten una detección altamente sensible (casi tan poco como 1 copia por muestra).

15

Ejemplo 2 (muestras recogidas de seres humanos - ejemplo comparativo):

Se realizó PCR combinada como se ha descrito en el anterior ejemplo 1, pero sobre muestras recogidas de pacientes humanos (Percy Hospital, Francia):

20

- muestra de fluido cefalorraquídeo (CSF),
- muestra de lavado bronquial,
- muestra de aspirado bronquial,
- muestra de esputo.

25

Antes del análisis, las muestras respiratorias se sometieron a pre-tratamiento de digestión-descontaminación. De hecho, la mayoría de las muestras sometidas para cultivo micobacteriano están contaminadas con una diversidad de organismos que pueden superar rápidamente a las micobacterias. Por tanto, las micobacterias se recuperan de forma óptima de las muestras clínicas a través del uso de procedimientos que reducen o eliminan las bacterias contaminantes liberando al mismo tiempo a las micobacterias atrapadas en mucina y células. El método de digestión-descontaminación más ampliamente usado es el método de N-Acetil-L-Cisteína (NALC)-NaOH. Las muestras se descontaminaron con hidróxido sódico al 1% (concentración final)-N-acetilcisteína y se concentraron por centrifugación a 3.000 x g durante 20 min. de acuerdo con procedimientos convencionales (Metchock, B. G., F. S. Nolte, y R. J. Wallace, Jr. 1999, *Mycobacterium*, p. 399-437. En P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover, y R. H. Tenover (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 7ª ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.). Los sedimentos se resuspenden con tampón fosfato (0,067 M, pH 6,8). Las muestras entonces están listas para analizarse por ensayo de microscopía, cultivo o biología molecular. Las muestras de fluido cefalorraquídeo (CSF) se analizan directamente.

40

Se realizó análisis comparativo por:

- cultivos bacterianos y microscopía, o
- con el ensayo Gen-Probe MTD.

5 Se realizaron cultivos bacterianos como se describe en Kent y Kubica ("Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory", 1985, U.S. Dpt. Of Public Health and Human Services, Atlanta, GA, EEUU), y en Roberts, Koneman y Kim ("Mycobacterium", 1991, páginas 304-339; En A. Barlows et al. (ed.), Manual of Clinical Microbiology, American Society for Microbiology, Washington D.C., EEUU).

10 Más particularmente, se realizaron cultivos de Lowenstein-Jensen (LJ) como se describe en Petran et al. 1971, Health Lab. Sci. 8: 225-230. El medio de cultivo LJ comprende sales minerales, almidón de patata, glicerina, verde malaquita (antiséptico), y huevo (albúmina). Los cultivos se realizan en tubos con tapón a rosca. Se resuspenden tres gotas del sedimento de centrifugación en tampón fosfato y se depositan sobre la parte superior de la gelosa inclinada. Se inoculan de dos a seis tubos (dependiendo del volumen de la muestra) y se incuban a 37°C. Los tubos se cierran sin apretar (para permitir la evaporación de cualquier exceso de líquido) y se incuban en una posición inclinada. Las muestras se observan una vez a la semana durante al menos 8 semanas. La observación hecha en la semana 1 permite detectar la contaminación por bacterias comensales o la presencia de una micobacteria de crecimiento rápido. Cuando a parece una colonia, se hace un frotis teñido de Ziehl-Neelsen para comprobar que hay bacilos resistentes a ácido-alcohol presentes, antes de declarar que el cultivo es positivos a micobacterias.

20 Se realizó ensayo de microscopía por tinción con fucsina como se describe en Kent y Kubica ("Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory", 1985, U.S. Dpt. Of Public Health and Human Services, Atlanta, GA, EEUU). Las interpretaciones recomendadas para presentar los resultados del frotis se dan en la Tabla 7.

Tabla 7 (valores de microscopía):

Observación en microscopía (aumento x1000)	Valor de microscopía
observación directa es negativa	Z0
1-9 bacilos por 100 campos	Z1
1-9 bacilos por 10 campos	Z2
1-9 bacilos por campo	Z3
más de 10 bacilos por campo	Z4

25 El ensayo Gen-Probe MTD se realizó de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Se implementa con el kit Gen-Probe® comercializado como kit "de ensayo directo de Mycobacterium tuberculosis Amplified™" (Gen-Probe Inc., San Diego, California 92121, EEUU). El ensayo Gen-Probe MTD utiliza la amplificación y detección de ARN específico de MtbC. En resumen, se sonicaron muestras biológicas, se sometieron a desnaturalización por calor, después se sometieron a amplificación de acuerdo con el método Gen-Probe TMA (amplificación mediada por transcripción), y se sometieron a detección de amplicón de acuerdo con el método Gen-Probe HPA (ensayo de protección por hibridación).

30 Un ensayo MTD positivo indica que la muestra contiene micobacterias del MtbC (debido a problemas de inhibición, y de insuficiente sensibilidad, un ensayo MTD negativo no excluye, sin embargo, la posibilidad de aislar un organismo del MtbC de la muestra).

35 Los resultados fueron los siguientes:

Tabla 8:

Muestra	Microscopía		Ensayo de cultivo			Ensayo Gen-Probe		Presente invención					Especies del MtbC
	valor	Resultado del cultivo	Duración del cultivo (días)	Especies identificadas	Detección del MtbC	RD9 (Fam)	IS6110 (Tamra)	IC (ATTO 590)	Resultado del MtbC	Especies del MtbC			
ba	ZO	positivo	24	<i>M. gordonae</i>	np	ND	ND	34,7	negativo	negativo			
pus	Z3	positivo	12	<i>M. tuberculosis</i>	positivo	29,6 +/- 0,14	28,5 +/- 0,56	32,4	positivo	<i>M. tuberculosis</i> *			
ba	Z4	positivo	13	<i>M. tuberculosis</i>	positivo	35,425 +/- 0,17	29,665 +/- 0,148	36,235 +/- 0,219	positivo	<i>M. tuberculosis</i> *			
bw	Z4	positivo	13	<i>M. tuberculosis</i>	positivo	33,1 +/- 1,13	37,75 +/- 1,34	32,25	positivo	<i>M. tuberculosis</i> *			
ba	ZO	positivo	22	<i>M. tuberculosis</i>	positivo	1 valor 40,72	1 valor 40,08	36,34 +/- 0,18	positivo débil	<i>M. tuberculosis</i> *			
ba	Z4	positivo	14	<i>M. tuberculosis</i>	positivo	34,16 +/- 0,09	28,49 +/- 0,41	35,485 +/- 0,19	positivo	<i>M. tuberculosis</i> *			
bw	Z3	positivo	14	<i>M. tuberculosis</i>	np	35,1	32,6 +/- 0,98	32,45 +/- 0,4	positivo	<i>M. tuberculosis</i> *			
CSF	ZO	negativo	//	//	negativo	ND	ND	33,15 +/- 0,21	negativo	negativo			
ba (con adiciones de <i>M. africanum</i>)	np			<i>M. africanum</i>	np	ND	33,45 +/- 0,77	31,44 +/- 0,43		<i>MtbC diferente de Mt o Mc</i>			
ba (con adiciones de <i>M. bovis</i>)	np			<i>M. bovis</i>	np	ND	46,289 +/- 0,44	30,89 +/- 0,5	positivo	<i>MtbC diferente de Mt o Mc</i>			

* *M. tuberculosis*, o la muy rara *M. canetti*
ND = no detectado
np = no realizado
MtbC diferente de Mt o Mc = cepa micobacteriana que pertenece al MtbC, pero que no es *M. tuberculosis* (Mt) ni *M. canetti* (Mc)
ba = aspirado bronquial
bw = lavado bronquial
con adiciones= muestra que se ha infectado artificialmente
CSF = fluido cefalorraquídeo

Los resultados obtenidos con los cebadores y sondas de la presente invención implementados en PCR combinada se correlacionan con los obtenidos con el método de cultivo tradicional, y con el kit Gen-Probe. La presente invención es mucho más rápida que el método de cultivo tradicional.

5 La presente invención también es más precisa que el ensayo Gen-Probe MTD: el ensayo MTD da una respuesta solamente MtbC positiva / MtbC negativa; la conclusión de *M. tuberculosis* que habitualmente se obtiene del ensayo MTD es solamente una suposición basada en el hecho de que hay una alta probabilidad de que el paciente que tiene síntomas de tipo tuberculosis, y que es MTD positivo, esté infectado por una cepa de *M. tuberculosis*. La presente invención determina directamente que la cepa es *M. tuberculosis* (o la muy rara - y fácilmente identificable - *M. canetti*), y que no es otra cepa del MtbC, y particularmente que no es *M. bovis* (es decir, una cepa que puede estar presente en la muestra debido a vacunación con BCG).

10 La presente invención permite adicionalmente discriminar entre aquellas *M. tuberculosis* del tipo ancestral (respuesta RD9+ IS6110-), y aquellas *M. tuberculosis* del tipo moderno (respuesta RD9+ IS6110+).

LISTADO DE SECUENCIAS

15 <110> BIO-RAD PASTEUR

<120> Uso tanto de RD9 como de IS6110 como dianas de ácido nucleico para el diagnóstico de la tuberculosis, y provisión de dianas IS6110 y RD9 combinadas-adaptables

20 <130>B6377-FP/KP

<160>20

25 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 240

<212> ADN

30 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 1

gctcgaccgg ccagcacgct aattaacggt tcatcgccga tcatcagggc caccgcgagg	60
gccccgatgg ttgcggtgg ggtgtcgagt cgatctgcac acagctgacc gagctgggtg	120
tgccgatcgc cccatcgacc tactacgacc acatcaaccg ggagcccagc cgccgcgagc	180
tgcgcgatgg cgaactcaag gagcacatca gccgcgtcca cgccgccaac tacggtgttt	240

35 <210>2

<211>201

<212> ADN

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

40 <400> 2

cagcacgcta attaacggtt catcgccgat catcagggcc accgcgaggg ccccgatggt	60
ttgcggtggg gtgtcgagtc gatctgcaca cagctgaccg agctgggtgt gccgatcgcc	120
ccatcgacct actacgacca catcaaccgg gagcccagcc gccgcgagct gcgcatggc	180
gaactcaagg agcacatcag c	201

45 <210>3

<211>23

<212> ADN

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

50 <400> 3

cgaccacatc aaccgggagc cca 23

ES 2 446 517 T3

<210>4
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*
 5
 <400> 4
 atgcggcgac cacatcaacc gggagccac cgcac 35
 <210>5
 10 <211> 17
 <212> ADN
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*
 <400> 5
 15 cagcagccta attaccc 17
 <210>6
 <211> 17
 <212> ADN
 20 <213> *Mycobacterium tuberculosis*
 <400> 6
 gctgatgtgc tcctga 17
 25 <210>7
 <211> 250
 <212> ADN
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*
 30 <400> 7
tgaccccgca atcggtcac gccggcacct tcggcggggg aagcgcctgc ggattggccg 60
gtggacgggt cgggttggcc aacgccgtgg ccagcgtgga gtcctcgtaa tagcggacca 120
gtcgcgaagc gtagacaccg cggccatagg tggcatcgca ggccgggtat ggccggtagc 180
cggagttcga gccgctttcc agctcaacgc cgctccagtc gaagacggcg gccgaccaac 240
ctggcgcaca 250
 <210>8
 35 <211> 172
 <212> ADN
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*
 <400> 8
 40 **taagcgcctg cggattggcc ggtggacggg tcgggttggc caacgccgtg gccagcgtgg 60**
agtcctcgtg atagcggacc agtcgccaaag cgtagacacc gcggccatag gtggcatcgc 120
aggccgggta tggccggtag ccggagttcg agccgcttcc cagctcaacg cc 172
 <210>9
 45 <211> 24
 <212> ADN
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*
 <400> 9
 50 gctattacga ggactccacg ctgg 24
 <210> 10
 <211>36
 <212> ADN

ES 2 446 517 T3

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 10
 5 cgtgctggcta ttacgaggac tccacgctgg cgcacg 36

<210> 11
 <211>17
 <212> ADN
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

10 <400> 11
 taagcgctg cggattg 17

15 <210> 12
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

20 <400> 12
 ggcggtgagc tggaaag 17

25 <210> 13
 <211>92
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Control interno de PCR

30 <400> 13

attggatccc agcacgctaa ttacccagta tcagatgacg tggcagccat gagagtggga 60

cagtcgtcct tcaaggagca catcagcgga tc 92

35 <210> 14
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Sonda PCR para control interno

<400> 14
 gacgtggcag ccatgagagt ggg 23

45 <210> 15
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

50 <400> 15
 cgttcaacct caaacaggta20

55 <210> 16
 <211>20
 <212> ADN
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

60 <400> 16
 aatcgaactc gtggaacacc20

<210> 17
 <211> 20
 <212> ADN

ES 2 446 517 T3

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 17
ctacctcatc ttccggtcca 20

5

<210> 18
<211> 20
<212> ADN
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

10

<400> 18
catagatccc ggacatggtg 20

15

<210> 19
<211> 1464
<212> ADN
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

20

<400> 19

tc	atggcggc	agtagg	taaat	gcaccc	aggc	gccacc	ggcg	ggcccc	ggcca	cggcgtg	cag	60	
ac	gggcgttc	tgattg	cccc	ttcggg	gcag	ggtaa	agttc	gcgccg	atgg	ctgtgc	aggc	120	
tag	ggcagcc	ccggc	gaaga	ccacgg	gtgc	cggcgt	cacg	gtccac	ctgc	ctgccg	cgctc	180	
cc	gacaggcc	gcagg	gtgtg	ggtcac	cgc	cgatgc	ggcg	accgag	cggc	catccg	cgcc	240	
ct	gagggcg	catgct	ccgg	caccgg	cacg	cggttc	gttc	ggtgccc	agc	tccaca	acga	300	
cg	cctgaatg	cggccg	tctt	cgggg	agcag	ctgatc	gaag	ccgaac	agat	tgacccc	gc	360	
at	cggctatc	gccggc	acct	tcggc	gggg	aagcgc	ctgc	ggattg	gccg	gtggac	gggt	420	
cgg	gttgcc	aacgcc	gtgg	ccagc	gtga	gtcctc	gtaa	tagcgg	acca	gtcgcc	aagc	480	
g	tagacaccg	cggccat	ag	tggcat	cgc	ggccgg	gtat	ggccgg	tagc	cggagt	tcga	540	
g	ccgctttcc	agctca	acgc	cgctcc	agtc	gaagac	ggcg	gccgacc	aac	ctggcg	caca	600	
ag	acccgacg	agcacg	gtc	gtgcg	ccgga	tgcgcg	gatt	tcctccc	cg	acacgt	cgag	660	
tg	gaagcggg	acacag	ccgt	tggtgg	cacg	ccggg	ccggg	ttggg	acgg	agataa	ggct	720	
tgt	tccgtcc	gcacgc	ccga	acactt	ggtc	gaggg	tagcc	accacc	gact	catacg	ccga	780	
cg	gttcttc	agctgg	tcct	ccagg	tagag	caggat	gacc	tcctcg	gtat	gccccg	gtgc	840	
gt	tcaaccag	ttggcg	atct	gcggc	agcac	tgtggc	cagc	agagg	ttcga	cggtg	cagcc	900	
tag	gttcg	ttcttc	ggtc	ccagcc	cg	acacac	gg	acgccc	ggg	cgccg	tgcc	960	
ct	cgaggcgg	ggcaag	tagt	gcagg	tctag	ctcgag	cgcg	cggacg	tcga	tgtcg	agctg	1020	
tt	gggccaac	gacagc	tgct	ggtttg	agtc	tgcg	tcgag	accgtg	aacg	aatcg	ctgag	1080	
g	ctgttg	gaac	gagttg	tcg	agcca	ctgag	tttc	cgcagc	ggca	ccgggt	cttg	1140	
ca	acgc	atcc	tggaac	ccgcg	cggtgc	gatg	caccca	agac	tgtagg	tagg	catcac	gcgc	1200
gg	cctgggtc	accggt	gcg	cgagc	ggaag	cacgc	caccgc	gcatc	gggca	caccgac	gcg	1260	
gc	gacactcc	gcagcg	accg	cgtcgg	cgaa	cttgc	cgagc	gccacg	cagg	ggatc	gcaac	1320	
c	gggcttatt	acgtca	cagg	atgcgg	tggtg	cgaggg	cgga	gcggg	cacct	ggtagg	catc	1380	
gg	cgccacc	ggtgcc	cg	ttatca	acac	cacggc	caag	gcgccc	atga	gggccg	cgct	1440	
ct	gcagccat	cgggcg	cg	gcat								1464	

ES 2 446 517 T3

<210> 20
 <211> 1360
 <212> ADN
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

5

<400> 20

```

cgatgaaccg ccccggcatg tccggagact ccagttcttg gaaaggatgg ggtcatgtca    60
ggtggttcat cgaggaggta cccgccggag ctgctgagc gggcgggtgcg gatggtcgca    120
gagatccgcg gtcagcacga ttcggagtgg gcagcgatca gtgaggtcgc cgtctactt    180
ggtgttggtc gcgcgggagc ggtgcgtaag tgggtgcgcc aggcgcaggt cgatgccggc    240
gcacggcccc ggaccacgac cgaagaatcc gctgagctga agcgccttagc ggccgggaaa    300
cgccgaattg cgaagggcga acgcgatttt aaagaccgcg tcggctttct tcgcggccga    360
gctcgaccgg ccagcacgct aattaacggt tcatcgccga tcatcagggc caccgcgagg    420
gccccgatgg tttgcggtgg ggtgtcgagt cgatctgcac acagctgacc gagctgggtg    480
tgccgatcgc cccatcgacc tactacgacc acatcaaccg ggagcccagc cgccgcgagc    540
tgccgatcgc cgaactcaag gagcacatca gccgcgtcca cgccgccaac tacggtgttt    600
acggtgcccg caaagtgtgg ctaaccctga accgtgaggg catcgaggtg gccagatgca    660
ccgtcgaacg gctgatgacc aaactcggcc tgtccgggac caccgcggc aaagcccgca    720
ggaccacgat cgctgatccg gccacagccc gtcccgcga tctcgtccag cgccgcttcg    780
gaccaccagc acctaaccgg ctgtgggtag cagacctcac ctatgtgtcg acctgggcag    840
ggttcgccta cgtggccttt gtcaccgacg cctacgtcgc aggatcctgg gctggcgggt    900
cgcttccacg atggccacct ccatggctct cgaecgcatc gagcaagcca tctggacccg    960
ccaacaagaa ggcgtactcg acctgaaaga cgttatccac catacggata ggggatctca   1020
gtacacatcg atccgggtca gcgagcggct cgccgaggca ggcaccaac cgtcggtcgg   1080
agcggtcgga agctcctatg acaatgcact agccgagacg atcaacggcc tatacaagac   1140
cgagctgatc aaaccggca agccctggcg gtccatcgag gatgtcgagt tggccaccgc   1200
gcgctgggtc gactggttca accatcgccg cctctaccag tactgcggcg acgtcccgcc   1260
ggtcgaactc gaggtgcct actacgctca acgccagaga ccagccgccg gctgaggtct   1320
cagatcagag agtctccgga ctaccgggg cggttcacga                               1360
    
```

10

REIVINDICACIONES

1. Serie de cebadores, que comprende al menos dos pares de cebadores, adecuados para la detección específica y sensible de una micobacteria del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* (MtbC), y/o para la discriminación específica y sensible de *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium canetti* por un lado, de las otras cepas de dicho MtbC por otro lado,
 5 donde dichos dos pares de cebadores tienen secuencias tales que pueden usarse en combinación en una única ejecución de amplificación ofreciendo aún al mismo tiempo una detección y discriminación específicas y sensibles, donde dichos dos pares de cebadores son un par de cebadores de IS6110 que consiste en un cebador directo de IS6110 y un cebador inverso de IS6110, y un par de cebadores de RD9 que consiste en un cebador directo de RD9
 10 y un cebador inverso de RD9, donde dicho cebador directo de RD9 es un fragmento 5'-terminal de 10 a 18 nucleótidos de la secuencia de la SEC ID N° 8, partiendo dicho fragmento 5'-terminal del primer nucleótido 5' de dicha SEC ID N° 8, donde dicho cebador inverso de RD9 es un fragmento 5'-terminal de 10 a 18 nucleótidos de la secuencia que es completamente complementaria de dicha SEC ID N° 8 sobre la longitud completa de dicha SEC ID N° 8, partiendo dicho fragmento 5'-terminal del primer nucleótido 5' de dicha secuencia complementaria,
 15 donde dicho cebador directo de IS6110 es un fragmento 5'-terminal de 10 a 18 nucleótidos de la secuencia de la SEC ID N° 2, partiendo dicho fragmento 5'-terminal del primer nucleótido 5' de dicha SEC ID N° 2, donde dicho cebador inverso de IS6110 es un fragmento 5'-terminal de 10 a 18 nucleótidos de la secuencia que es completamente complementaria de dicha SEC ID N° 2 sobre la longitud completa de dicha SEC ID N° 2, partiendo dicho fragmento 5'-terminal del primer nucleótido 5' de dicha secuencia complementaria.
2. Serie de cebadores de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada por que** dicho cebador directo de RD9 comprende la secuencia de la SEC ID N° 11.
- 25 3. Serie de cebadores de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada por que** dicho cebador inverso de RD9 comprende la secuencia de la SEC ID N° 12.
- 30 4. Serie de cebadores de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada por que** dicho cebador directo de IS6110 comprende la secuencia de la SEC ID N° 5.
5. Serie de cebadores de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada por que** dicho cebador inverso de IS6110 comprende la secuencia de la SEC ID N° 6.
- 35 6. Serie de dos polinucleótidos, donde uno de dichos dos polinucleótidos es un fragmento de RD9, siendo el otro un fragmento de IS6110, donde dicho fragmento de RD9 consta de la secuencia de la SEC ID N° 8, o la secuencia que es completamente complementaria a la SEC ID N° 8 sobre la longitud completa de la SEC ID N° 8,
 y
 40 donde dicho fragmento de IS6110 consta de la secuencia de la SEC ID N° 2, o la secuencia que es completamente complementaria a la SEC ID N° 2 sobre la longitud completa de la SEC ID N° 2.
7. Composición de amplificación, que comprende la serie de cebadores de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, y al menos uno de los dos siguientes amplicones:
 45 - un amplicón IS6110, que tiene un tamaño que varía de 190 a 210 nucleótidos, y que comparte un mínimo del 95% de identidad de secuencia con la secuencia de la SEC ID N° 2 o con la secuencia que es completamente complementaria a la SEC ID N° 2 sobre la longitud completa de la SEC ID N° 2;
 50 - un amplicón RD9, que tiene un tamaño que varía de 160 a 185 nucleótidos, y que comparte un mínimo del 95% de identidad de secuencia con la secuencia de la SEC ID N° 8 o con la secuencia que es completamente complementaria a la SEC ID N° 8 sobre la longitud completa de la SEC ID N° 8.
8. La composición de amplificación de la reivindicación 7, que comprende al menos uno de los dos siguientes amplicones:
 55 - un amplicón IS6110, que tiene un tamaño que varía de 199 a 203 nucleótidos, y que comparte un mínimo del 98% de identidad de secuencia con la secuencia de la SEC ID N° 2 o con la secuencia que es completamente complementaria a la SEC ID N° 2 sobre la longitud completa de la SEC ID N° 2;
 60 - un amplicón RD9, que tiene un tamaño que varía de 170 a 174 nucleótidos, y que comparte un mínimo del 98% de identidad de secuencia con la secuencia de la SEC ID N° 8 o con la secuencia que es completamente complementaria a la SEC ID N° 8 sobre la longitud completa de la SEC ID N° 8.
9. La composición de amplificación de la reivindicación 7 u 8, que comprende dicho amplicón IS6110 y dicho amplicón RD9.
 65

10. Uso de una sonda en la detección de un amplicón producido *in vitro* por la serie de cebadores de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde dicha sonda es:

i) la secuencia de la SEC ID N° 8, o la secuencia que es completamente complementaria a la SEC ID N° 8 sobre la longitud completa de la SEC ID N° 8, o un fragmento de al menos 15 nucleótidos y de menos de 29 nucleótidos de dicha secuencia de la SEC ID N° 8 o de dicha secuencia complementaria, o

ii) la secuencia de la SEC ID N° 2, o la secuencia que es completamente complementaria a la SEC ID N° 2 sobre la longitud completa de la SEC ID N° 2, o un fragmento de al menos 15 nucleótidos y de menos de 29 nucleótidos de dicha secuencia de la SEC ID N° 2 o de dicha secuencia complementaria.

11. El uso de la reivindicación 10, donde dicho amplicón está contenido en una composición de amplificación que comprende la serie de cebadores de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5.

12. El uso de reivindicación 10 u 11, donde dicho amplicón está contenido en la composición de amplificación de una cualquiera de las reivindicaciones 7-9.

13. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 10-12, donde dicha detección del amplicón se usa para el diagnóstico *in vitro* de la tuberculosis o para la detección de una micobacteria del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* (MtbC) en una muestra biológica.

14. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 10-13, donde dicha sonda es un fragmento de la secuencia que es complementaria a la SEC ID N° 8, donde dicho fragmento comprende la secuencia de la SEC ID N° 9.

15. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 10-13, donde dicha sonda es un fragmento de la SEC ID N° 2, donde dicho fragmento comprende la secuencia de la SEC ID N° 3.

16. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 10-15, donde dicha sonda comprende adicionalmente al menos un brazo de baliza.

17. El uso de acuerdo con la reivindicación 16, donde dicha sonda es la secuencia de la SEC ID N° 10.

18. El uso de acuerdo con la reivindicación 16, donde dicha sonda es la secuencia de la SEC ID N° 4.

19. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10-18, donde dicha sonda comprende adicionalmente un fluoróforo en su extremo 5' y/o un inactivador en su extremo 3'.

20. Uso de al menos dos sondas en el diagnóstico *in vitro* de la tuberculosis o en la detección de una micobacteria del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* (MtbC) en una muestra biológica o para discriminar *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium canetti* por un lado, de las otras cepas de dicho MtbC por otro lado, donde una de dichas al menos dos sondas es:

i) la secuencia de la SEC ID N° 8, o la secuencia que es completamente complementaria a la SEC ID N° 8 sobre la longitud completa de la SEC ID N° 8, o un fragmento de al menos 15 nucleótidos y de menos de 29 nucleótidos de dicha secuencia de la SEC ID N° 8 o de dicha secuencia complementaria,

y donde la otro de dichas al menos dos sondas es:

ii) la secuencia de la SEC ID N° 2, o la secuencia que es completamente complementaria a la SEC ID N° 2 sobre la longitud completa de la SEC ID N° 2, o un fragmento de al menos 15 nucleótidos y de menos de 29 nucleótidos de dicha secuencia de la SEC ID N° 2 o de dicha secuencia complementaria.

21. El uso de la reivindicación 20, donde dicha sonda definida en la reivindicación 20 i) es un fragmento de la secuencia que es complementaria a la SEC ID N° 8, donde dicho fragmento comprende la secuencia de la SEC ID N° 9.

22. El uso de la reivindicación 20 o 21, donde dicha sonda definida en la reivindicación 20 ii) es un fragmento de la SEC ID N° 2 que comprende la secuencia de la SEC ID N° 3.

23. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 20-22, donde cada una de dichas al menos dos sondas comprende adicionalmente al menos un brazo de baliza.

24. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 20-23, donde cada una de dichas al menos dos sondas comprende adicionalmente un fluoróforo en su extremo 5' y/o un inactivador en su extremo 3'.

25. Serie de PCR, que consiste en al menos una sonda, cuya secuencia es la definida en una cualquiera de las reivindicaciones 10-19, y en la serie de cebadores de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5.

26. Kit para la detección específica y sensible de una micobacteria del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* (MtbC), y/o para la discriminación específica y sensible de *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium canetti* por un lado, de las otras cepas de dicho MtbC por otro lado, **caracterizado por que** comprende:

- 5 - al menos una serie de cebadores de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, y/o
 - al menos una serie de dos polinucleótidos de la reivindicación 6.

27. Kit para el diagnóstico *in vitro* de la tuberculosis, **caracterizado por que** comprende al menos uno entre los siguientes elementos:

- 10 - al menos una serie de cebadores de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5,
 - al menos una serie de dos polinucleótidos de la reivindicación 6.

15 28. El kit de la reivindicación 26 o 27, que comprende adicionalmente al menos una sonda, cuya secuencia es la definida en una cualquiera de las reivindicaciones 10-19.

20 29. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 26-28, que comprende adicionalmente un oligonucleótido o polinucleótido adecuado para su uso como control interno (IC) en la detección específica y sensible de una micobacteria del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* (MtbC), y/o para la discriminación específica y sensible de *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium canetti* por un lado, de las otras cepas de dicho MtbC por otro lado, **caracterizado por que** dicho oligonucleótido o polinucleótido IC comprende:

- 25 a. dos secuencias de sitio de unión a cebador, donde una de dichas dos secuencias de sitio de unión a cebador que está localizada en 5' con relación a la otra de dichas dos secuencias de sitio de unión a cebador es idéntica a un miembro de un par de cebadores seleccionado entre los dos pares de cebadores definidos en una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, y la otra de dichas dos secuencias de sitio de unión a cebador es completamente complementaria al otro miembro del mismo par de cebadores seleccionado, y
 b. una secuencia que no está relacionada con *Mycobacterium*, que está localizada entre dichas dos secuencias de sitio de unión a cebador;

30 y/o la sonda IC de la SEC ID N° 14.

30. El kit de la reivindicación 29, donde la secuencia de dicho oligonucleótido IC es la secuencia de la SEC ID N° 13.

35 31. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 26-30, **caracterizado por que** comprende adicionalmente un tampón de lisis para la extracción del ácido nucleico.

40 32. Kit de acuerdo con la reivindicación 31, **caracterizado por que** dicho tampón de lisis contiene una resina aniónica que se une a iones divalentes.

45 33. Método para detectar una micobacteria del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* (MtbC) en una muestra biológica, y/o para discriminar *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium canetti* por un lado, de las otras cepas de dicho MtbC por otro lado, **caracterizado por que** comprende la detección de dos secuencias de ácido nucleico diana por PCR usando los dos pares de cebadores de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 como cebadores de amplificación, donde una de dichas dos secuencias diana es IS6110 o un fragmento de la misma, y la otra secuencia diana es RD9 o un fragmento de la misma, donde la detección de la presencia de dicha diana RD9 y de la presencia o ausencia de dicha diana IS6110 es indicativa de la presencia en dicha muestra biológica de una micobacteria que pertenece al MtbC, que es *M. tuberculosis* o *M. canetti*,
 50 donde la detección de la ausencia de dicha diana RD9 y de la presencia de dicha diana IS6110 es indicativa de la presencia en dicha muestra biológica de una micobacteria que pertenece al MtbC, que no es *M. tuberculosis*, donde la detección de la ausencia de dicha diana RD9 y la ausencia de dicha diana IS6110 es indicativa de la ausencia en dicha muestra biológica de una micobacteria que pertenece al MtbC.

55 34. Método de acuerdo con la reivindicación 33, **caracterizado por que** dicha secuencia diana RD9 consta de la secuencia de la SEC ID N° 8, o la secuencia que es completamente complementaria a la SEC ID N° 8 sobre la longitud completa de la SEC ID N° 8, y dicha secuencia diana IS6110 consta de la secuencia de la SEC ID N° 2, o la secuencia que es completamente complementaria a la SEC ID N° 2 sobre la longitud completa de la SEC ID N° 2.

60 35. Método de acuerdo con la reivindicación 33 o 34, **caracterizado por que** la detección de la presencia de dicha diana RD9 y de la ausencia de dicha diana IS6110 es indicativa de la presencia en dicha muestra biológica de una micobacteria que pertenece al MtbC, que es *M. canetti*, o una cepa ancestral de *M. tuberculosis*.

65 36. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 33-35, **caracterizado por que** la detección de la presencia de dicha diana RD9 y de la presencia de dicha diana IS6110 es indicativa de la presencia en dicha

muestra biológica de una micobacteria que pertenece al MtbC, que es *M. canetti*, o una cepa de tipo moderno de *M. tuberculosis*.

- 5 37. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 33-36, **caracterizado por que** la detección de la ausencia de dicha diana RD9 y de la presencia de dicha diana IS6110 es indicativa de la presencia en dicha muestra biológica de una micobacteria que pertenece al MtbC, que es *M. bovis*, *M. africanum*, *M. caprae*, *M. microti*, o *M. pinnipedii*.
- 10 38. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 33-37, **caracterizado por que** dicha PCR se implementa en combinación.
- 15 39. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 33-38, **caracterizado por que** dicha PCR se implementa usando al menos una sonda, cuya secuencia se define en una cualquiera de las reivindicaciones 10-19, como sonda de detección.
- 20 40. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 33-39, donde la composición de amplificación producida por dicha PCR comprende un amplicón producido por uno de dichos dos pares de cebadores y/o un amplicón producido por el otro de dichos dos pares de cebadores.
- 25 41. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 33-40, donde la composición de amplificación producida por dicha PCR comprende uno o los dos amplicones definidos en una cualquiera de las reivindicaciones 7-9.
- 30 42. Método *in vitro* para el diagnóstico de la tuberculosis, **caracterizado por que** la presencia o ausencia de una micobacteria del MtbC en una muestra biológica, y/o la presencia o ausencia de una cepa de *M. tuberculosis* o *M. canetti* en una muestra biológica, y/o la presencia o ausencia de una micobacteria del MtbC, que no es *M. tuberculosis*, en una muestra biológica, se determina por implementación del método de una cualquiera de las reivindicaciones 33-41 sobre dicha muestra biológica.
- 35 43. Uso de:
- al menos una serie de cebadores de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, y/o
- al menos una serie de dos polinucleótidos de la reivindicación 6,
en el diagnóstico *in vitro* de la tuberculosis o en la detección de una micobacteria del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* (MtbC) en una muestra biológica o para discriminar *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium canetti* por un lado, de las otras cepas de dicho MtbC por otro lado.

252713 tcatggcg
 252721 gcagtaggta atgcaccag gcgcccagg cggcccggc caggcgtgc agcgggctg
 252781 tctgattgcc cgttcgggc aggttaaagt cgcgccat ggctgtcag gctagggcag
 252841 cccggcgaa gaccacgggt gcggcgtca cggtcacat cctgccgcg tcccacagg
 252901 ccgcagggtg tgggtcacc cactgacgg cagcccagg gccatcccg cctgcaggg
 252961 ccatgctcc ggcaccgga cgggttctgt ccggtgcca gctccacaac gacgctgaa
 253021 tgcggccgtc ttcggggagc agctgatca agccgaacag atgaccccg caatcgtca
 253081 **tcgcccggcac cttgggggg gtaagggcct gggattggc cggtagcgg gtcgggttgg**
 253141 **ccaacgcct gcccagcgt ggtcctcgt aatagcggac cagtcgcaa gcgtagacac**
 253201 **cgggccata ggtggctcg caggccgggt atggccgta gccggattc ggcgcttt**
 253261 **ccagctcaac gcgctccag tcgaagcgg cggccacca acctggcga caagaccga**
 253321 cgagcacggc tcgtgcggc gatgcggga tttcctccc gacacgtcg agtggaaagg
 253381 ggacacagcc gttggtgga cgcggggcc ggttggagc gtagataagg ctgttccgt
 253441 ccgcacggcc caacacttg tcgagggtag ccaccacga ctacacgcc gacgcttct
 253501 tcagctggtc ctccaggtag agcaggtga cctcctcgt atgcccgggt gcgttaacc
 253561 agttggcgt ctgcggcagc actgtggcca gcagaggttc gacggtgcag cctaggttcg
 253621 cgttcttcgg tcccagccc tgacacacgg tgaccgggg ggcgccgtg cctcggagg
 253681 gggcaagta gtgcaggtct agctcgagcg cgcggacgtc gatgtcagc tgttggggca
 253741 acgacagctg ctggtttgag tctgcgtgag agaccgtga cgaatcgtg aggctgtga
 253801 acgagtgtg cgtgccgagc cactgattt cccgcagcgg caccgggtct tgcaacgcat
 253861 cctggaaccy cgcggtgca tgcaacccaag actgtaggta ggcacacgc gcggcctggg
 253921 tcacccgggtg cgcgagcga agcacgcacc gcgcacggg cacaccgacg cggcgacact
 253981 ccgcagcgcac cgcgtcggcg aacttgcca gcgccacga ggggatcga accgggctta
 254041 ttacgtcaca ggatgcggtg ggcgagggcg ggcggggcac ctggtaggca tcggcggcca
 254101 ccggtgccgc ggttatcaac accacggcca aggcgcccac gaggcggcg ctctgcagcc
 254176 atcggggcgcg gggcat

Secuencia Rv2075c de RD9 de M. tuberculosis H37Rv (1464 nucleótidos) - SEC ID N° 19

En negrita = subsecuencia RD9 de la SEC ID N° 7 seleccionada dentro de Rv2075c (posiciones 351-600 en Rv2075c)
 En negrita y subrayada = secuencia diana RD9 de la SEC ID N° 8 (posiciones 390-561 en Rv2075c)

FIGURA 1

1 cgatgaaccg cccggcatg tccggagact ccagttcttg gaaaggatgg ggtcatgtca
 61 ggtggttcat cgaggagga cccgctggag ctgctgagc gggcggtgcg gatgctgca
 121 gagatcccg gtcagcacga ttcggagtgg gcagcgatca gtgaggtcgc ccgtctactt
 181 ggtgtggct gcgcggagac ggtgcgtaag tgggtgctgc aggcgaggt cgatgccggc
 241 gcacggcccg ggaccacgac cgaagaatcc gctgagctga agcgccttagc ggcgggacaa
 301 gcccgaattg cgaaggcga acgcatttt aaagaccgcg t'cggcttct tccgcccga
 361 **gctcgaccgg ccagcacgct aattaagct tcatacgcga tcatacgggc caccgaggg**
 421 **gccccgatgg ttgctgagtg ggtgctgagt cgatctgcac acagctgacc gagctgggtg**
 481 **tgcgctcgc cccatcgacc tactagacc acatcaaccg ggagcccagc cgcgagagc**
 541 **tgcgctgaggg cgaactcaag gagcacatca gcgctgaca cgcgcacaac tacggtgttt**
 601 acggtgcccg caaagtgtgg ctaacctga accgtgaggg catcgaggtg gccagatgca
 661 ccgtcgaacg gctgatgacc aaactcgccc t'gtccgggac caccgcggc aaagcccgca
 721 ggaccacgat cgtgatccg gccacagccc gtcccgcga tctcgtccag cgcgccttcg
 781 gaccaccagc acctaacgg ctgtgggtag cagacctcac ctatgtgtcg acctggggcag
 841 gtttcgcta cgtggccttt gtaccgagc cctacgtcgc aggatcctgg gctggcgggt
 901 cgttccacg atggccacct ccattgtcct cgacgcgac gagcaagcca tctggaccgg
 961 ccaacaagaa ggcgtactcg acctgaaaga cgttatccac catacggata ggggatctca
 1021 gtacacatcg atccggttca gcgagcggct cgcagaggca ggcatccaac cgtcggtcgg
 1081 agcggtcgga agtccctatg acaatgact agccgagacg atcaacggcc tatacaagac
 1141 cgagctgac aaaccggca agccttggcg gtccatcgag gatgtcagat tggcccaccg
 1201 gcgctgggtc gactggttca acctcgccc cctctaccag tactgcccg acctcccgc
 1261 ggtcgaactc gaggctgct actacgttca acgccagaga ccagcccgcg gctgaggtct
 1321 cagatcagag agtctccgga ctacccggg cggttcaacga

Secuencia IS6110 de M. tuberculosis H37Rv (1360 nt) - SEC ID N° 20

En negrita = subsecuencia de la SEC ID N° 1 (posiciones 361-600), seleccionada dentro de IS6110
 En negrita y subrayada = secuencia diana IS6110 de la SEC ID N° 2 (posiciones 372-572)

FIGURA 2