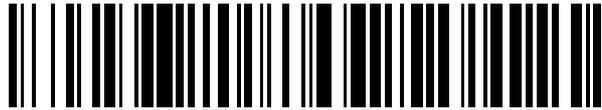


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 533 924**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.02.2006 E 10190717 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.10.2014 EP 2351857**

54 Título: **Composiciones y métodos para detectar ácidos nucleicos específicos de patógenos en la orina**

30 Prioridad:

**17.02.2005 IT RM20050067**  
**25.05.2005 US 137934**  
**16.06.2005 US 691186 P**  
**10.02.2006 US 351799**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**16.04.2015**

73 Titular/es:

**TROVAGENE, INC. (100.0%)**  
**11055 Flintkote Avenue**  
**San Diego, CA 92121, US**

72 Inventor/es:

**MILKONYAN, HOVSEP;**  
**CANNAS, ANGELA;**  
**TOMEI, LOUIS DAVID y**  
**UMANSKY, SAMUIL R.**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

**ES 2 533 924 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

Composiciones y métodos para detectar ácidos nucleicos específicos de patógenos en la orina

Antecedentes de la invención

5 Existen en la actualidad tres tipos de sistemas de diagnóstico *in vitro* ampliamente utilizados para la detección de patógenos no virales. Estos son el cultivo directo del agente patógeno a partir de la muestra biológica; análisis inmunológicos basados en la detección de productos o antígenos del agente infeccioso; y análisis inmunológicos indirectos que pueden detectar los anticuerpos producidos contra el agente infeccioso durante la infección.

10 En el primer sistema, la principal desventaja es que se debe considerar que la muestra biológica está en riesgo de transmisión del agente patógeno. En el segundo y tercer sistema, las desventajas incluyen la recuperación de la muestra lo que es a menudo invasivo, y una muestra potencialmente infecciosa cuando se ha recogido. En el tercer sistema, una desventaja importante es que a menudo existen pocas posibilidades de discriminar entre infecciones pasadas y actuales.

15 Más recientemente, se han desarrollado métodos de diagnóstico molecular basados en la detección de los ácidos nucleicos del agente patógeno en las muestras de sangre o plasma, o en los cultivos celulares, tomados del paciente. Estos análisis son generalmente mucho más sensibles que los análisis inmunológicos. Sin embargo, pueden requerir la presencia de un equipo especial y personal cualificado. Además, las muestras biológicas - en el caso de plasma, sangre, o cultivos celulares -son difíciles de almacenar sin ser alterados, excepto bajo condiciones de temperatura controlada, y se consideran un riesgo biológico para el personal que las manipulan.

20 Recientemente, se han descrito métodos de diagnóstico molecular basados en el ADN transrenal (ADN-Tr) para monitorizar el progreso de los trasplantes alogénicos, para diagnosticar el sexo de un feto, y para detectar la presencia de marcadores tumorales. (Botezatu et al. *Clinical Chemistry* 46(8):1078-84 (2000); Su et al. *Ann. NY Acad. Sci.* 1022:81-89 (2004)). Por ejemplo, la Patente estadounidense N° 6.251.638 describe un método analítico para la detección de ADN fetal masculino en la orina de mujeres embarazadas. La Patente estadounidense N° 6.287.820 describe un sistema dirigido al diagnóstico de tumores, en particular de adenocarcinomas de colon y de páncreas. La Patente estadounidense N° 6.492.144 describe que el método de análisis de ácido nucleico de ADN-Tr se puede utilizar para monitorizar el progreso de los trasplantes alogénicos. La presencia de ADN transrenal en la orina, en forma de fragmentos de ácidos nucleicos de menos de 1000 pares de bases también fue descrita en Al-Yatama et al. (2001), *Prenat Diagn*, 21:399-402; y en Utting, M., et al. (2002), *Clin Cancer Res*, 8:35-40. Keiko Koide, et al., *Prenat Diagn*, 2005; 25: 604-607; Mengjun Wang, et al., *Clinical Chemistry*, 2004, 50: 211-213; Y.-H. Su, et al., *J. Mol. Diagn.*, 2004, 6: 101-107.

35 La presencia de ADN transrenal ha sido explicada a través del fenómeno de la apoptosis. Durante el proceso de la muerte celular la mayoría del ADN nuclear se convierte en nucleosomas y oligómeros, (Umansky, S.R., et al. 1982, *Biochim. Biophys. Acta* 655:9-17), que finalmente son digeridos por macrófagos o células vecinas. Sin embargo, una parte de este ADN degradado escapa al metabolismo fagocítico, y puede encontrarse en el torrente sanguíneo (Lichtenstein, A.V., et al. 2001, *ann NY Acad Sci*, 945:239-249), y, como se confirma en las patentes anteriormente mencionadas, también en la orina.

40 La aplicación de este sistema a infecciones por microorganismos patógenos no ha sido nunca estudiada. Anteriormente, tan solo se conocía que el ADN procariótico podía ser aislado del sedimento de orina que contenía bacterias (Frasier, et al. 1992, *Acta Virol*, 36:83-89). Durante una infección patógena, los procariotas y parásitos son generalmente ingeridos por las células del sistema inmunológico, tales como macrófagos y células dendríticas. Los procariotas son entonces disueltos por las vesículas fagolisosomales. El ADN procariota es liberado entonces por la célula y una parte de este ADN entra en la corriente sanguínea de cualquiera de dos maneras. O bien la célula que realiza la ingestión se vuelve apoptótica y se rompe (Navarre, W.V. 2000; *Cell Microbiol* 2:265-273); o las vesículas fagolisosomales liberan los fragmentos del procariota (incluyendo el ADN fragmentado) en la corriente sanguínea (Friedlander, A.M. 1978, *Infect Immune* 22:148-154). Sin embargo, estos ácidos nucleicos fragmentados nunca han sido detectados en la orina del sujeto infectado.

La presente invención describe un método para detectar la presencia de un patógeno no viral en un sujeto a través de la detección de secuencias de ADN del patógeno en la orina del sujeto.

## Resumen de la invención

50 La invención proporciona un método para el diagnóstico de una infección de un sujeto a través de la detección de la presencia de un patógeno, mediante la presencia de ácidos nucleicos del patógeno en una muestra de orina del sujeto. El método de la invención se utiliza también para validar el diagnóstico de una infección de un sujeto a través de la detección de la presencia de ácidos nucleicos de patógenos en una muestra de orina del sujeto, en donde un

diagnóstico previo ya ha sido realizado mediante un método de la presente invención u otro método de diagnóstico. El método de la invención se utiliza también para determinar la eficacia del tratamiento de una infección por patógeno no viral en un sujeto detectando la presencia o ausencia de un ácido nucleico del patógeno no viral en la orina del sujeto. Más específicamente, el método de la invención se utiliza para identificar una infección patógena no viral resistente a fármacos en un sujeto, detectando la presencia o ausencia de un ácido nucleico del patógeno no viral en la orina del sujeto después de que el sujeto haya sido tratado para la infección con un fármaco. El método de la invención también se utiliza para determinar la probabilidad de una patología a partir de la infección del sujeto por un patógeno no viral en un sujeto en riesgo de ello. Más específicamente, el método de la invención se utiliza para genotipar un patógeno no viral que ha infectado a un sujeto, mediante la detección y genotipado de ácidos nucleicos del patógeno en la orina del sujeto.

La invención proporciona un método para diagnosticar una infección por *Mycobacterium tuberculosis* en un sujeto, que comprende detectar la presencia de un ácido nucleico de *Mycobacterium tuberculosis* libre de células en una fracción soluble de una muestra de orina del sujeto, diagnosticando de ese modo la infección por *Mycobacterium tuberculosis*. En un modo de realización del método para diagnosticar una infección por *Mycobacterium tuberculosis* en un sujeto, el método además comprende la etapa de cuantificar el ácido nucleico.

En otro modo de realización del método para diagnosticar una infección por *Mycobacterium tuberculosis* en un sujeto, la detección se realiza mediante un método seleccionado de PCR, PCR anidada, PCR semi-anidada, hibridación, SSCP, LCR, SDA y apareamiento con sondas moleculares que son específicas para el patógeno no viral. En un aspecto de esta realización, se utiliza un conjunto de cebadores para el método, en donde el conjunto de cebadores comprende un cebador directo y un cebador inverso. Opcionalmente, el cebador directo se selecciona de SEQ ID NOs: 34 y 39 y el cebador inverso se selecciona de SEQ ID NOs: 35, 36 y 40.

En otro modo de realización del método para diagnosticar una infección por *Mycobacterium tuberculosis* en un sujeto, el sujeto es un mamífero. En un aspecto de este modo de realización, el mamífero es un humano.

#### Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una fotografía de las reacciones de PCR realizadas en orina humana con cebadores específicos para la b-actina humana resuelta por electroforesis.

La Figura 2 es una fotografía de reacciones de PCR realizadas en orina de conejo con cebadores específicos para b-globina de conejo resuelta por electroforesis.

La Figura 3 es una fotografía de reacciones de PCR semi-anidada realizada en orina humana a partir de pacientes infectados por TB o sanos, con cebadores específicos para secuencias de *Mycobacterium tuberculosis* resuelta por electroforesis.

La Figura 4 es una fotografía de reacciones de PCR semi-anidada realizada en sobrenadantes y gránulos de orina humana centrifugada a partir de pacientes infectados por TB y sanos antes y después del tratamiento con cebadores específicos para secuencias de *Mycobacterium tuberculosis* resuelta por electroforesis.

La Figura 5 muestra fotografías de reacciones de PCR semi-anidada realizadas en orina humana a partir de pacientes infectados por TB con cebadores específicos para secuencias de *Mycobacterium tuberculosis* de 129/67 pb (panel izquierdo) y 330/69 pb (panel derecho), resueltas por electroforesis.

La Figura 6 es una fotografía de reacciones de PCR semi-anidada realizadas en orina humana a partir de pacientes infectados activamente por TB y pacientes dos meses después del tratamiento para TB con cebadores específicos para secuencias de *Mycobacterium tuberculosis* resueltas por electroforesis.

#### Descripción detallada de la invención

La invención se basa, en parte, en el descubrimiento descrito en la presente patente de que los ácidos nucleicos patógenos se pueden detectar en la orina de un sujeto infectado con el patógeno. En algunos casos, los ácidos nucleicos provenientes de organismos patógenos cruzan la barrera renal y pasan a la orina de mamíferos. Los ácidos nucleicos que cruzan la barrera renal, denominados en la presente patente ácidos nucleicos transrenales, y más específicamente el ADN transrenal tienden a ser menores de 1.000 pb de longitud, pero tienen preferiblemente menos de 500 pb de longitud, y más preferiblemente menores de 250-300 pb de longitud o menores de 250 pb de longitud. Mientras que se había mostrado en el pasado que el ADN de células de mamíferos, cancerígenas o no cancerígenas sobre las que la hipótesis era que morían por apoptosis en el cuerpo de un sujeto, puede ser capaz de cruzar la barrera renal, esta es la primera vez que sea mostrado que el ADN de patógenos también cruza esta barrera. Además, los ácidos nucleicos provenientes de patógenos que se encuentran en el riñón verterían ácidos

nucleicos específicos de patógenos en la orina sin cruzar la barrera renal. Pueden existir otros mecanismos por los que ácidos nucleicos específicos de patógenos pasan a la orina de un sujeto infectado con el patógeno.

En base a este descubrimiento, la invención proporciona un método para la detección de un patógeno no viral en la orina de un sujeto. El método de la invención se utiliza para detectar ácidos nucleicos transrenales derivados de un microorganismo patógeno que atraviesan la barrera renal y están presentes en la orina de un sujeto. En la presente patente se describen métodos para el aislamiento, amplificación y detección de estos ácidos nucleicos transrenales.

Un método descrito en la presente patente el aislamiento de ADN de la orina de un sujeto incluye las siguientes etapas. La orina se centrifuga en primer lugar o se filtra para separar células y detritus de células de la orina. Se añade a continuación EDTA/Tris HCl a la orina para unirse a iones bivalentes y para ajustar el pH a aproximadamente pH 8. A esta solución se añade a continuación una sal caotrópica, por ejemplo isotiocianato de guanidina a una concentración final de al menos 3 M. A continuación, se añade una resina de sílice a la orina a la que se une el ADN. Esta resina se lava a continuación, y el ADN se eluye de la misma, aislando de ese modo el ADN transrenal.

El ADN aislado de la orina de un sujeto puede ser entonces amplificado para ser detectado. Los métodos de amplificación incluyen reacción en cadena de la polimerasa (PCR), PCR anidada, PCR semi-anidada, análisis de polimorfismo conformacional de cadena simple (SSCP), reacción en cadena de la ligasa (LCR) y amplificación por desplazamiento de cadena (SDA). La detección de los ADN transrenales también se realiza a través de hibridación de al menos una sonda marcada.

La amplificación y detección de ácidos nucleicos urinarios de un patógeno no viral puede ser utilizada para detectar la presencia del patógeno, y de ese modo diagnosticar la infección de un sujeto con el patógeno y para diagnosticar patologías asociadas con la infección de un sujeto por el patógeno. Además, la detección del patógeno puede ser utilizada para monitorizar el tratamiento de infecciones y patologías asociadas con el patógeno. También, la detección del patógeno puede ser utilizada para sugerir el tratamiento para un sujeto en el que el patógeno es detectado. Estos tratamientos pueden ser utilizados para aliviar síntomas que están asociados con la detección del patógeno, o un diagnóstico de infección por el patógeno.

La especie bacteriana que se puede detectar utilizando el método de la invención es *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*, MTB o TB).

### **Detección de presencia de microorganismos patógenos**

#### *Bacterias*

#### *Mycobacterium tuberculosis*

La tuberculosis sigue siendo la segunda causa más común de muerte por enfermedad infecciosa en el mundo, a pesar de los avances en la implementación de las estrategias de control en la última década (Elzinga G, et al. Lancet 2004;363:814-9). Los síntomas de la tuberculosis incluyen tos que empeora por las mañanas (algunas veces con hemoptisis, sangre en esputo), dolor en el pecho, dificultad para respirar, sudoración nocturna, y signos de neumonía. En la enfermedad avanzada, puede haber una extrema pérdida de peso. Sin embargo, aún no se ha descubierto todavía una prueba basada en una alta sensibilidad molecular para la detección de *Mycobacterium tuberculosis*. Un tratamiento efectivo de la tuberculosis activa es la piedra angular del control de la tuberculosis, y se ha mostrado que un simple aumento del 1% en la tasa de detección de casos activos puede salvar miles de vidas y evitar miles de casos nuevos de tuberculosis en países de alta incidencia (Currie CS, et al. AIDS. 2003;17:2501-8). Consecuentemente, la disponibilidad de nuevas herramientas de diagnóstico que son más precisas y accesibles beneficiará enormemente a pacientes individuales y contribuirá de manera significativa al control de la enfermedad.

Los avances en el conocimiento de la estructura genética del bacilo tuberculoso han contribuido recientemente al desarrollo de diversos métodos moleculares nuevos para la detección e identificación de *Mycobacterium tuberculosis* a partir de cultivos o directamente de muestras biológicas (Drobniewski FA, et al. Lancet Infect Dis. 2003 ;3:141-7). Las pruebas diagnósticas moleculares que implican la detección de secuencias de ácidos nucleicos específicos podrían ser utilizadas para el diagnóstico rápido de tuberculosis tanto pulmonar como extra pulmonar. En la tuberculosis pulmonar la especificidad de las pruebas diagnósticas basadas en la identificación directa de *Mycobacterium tuberculosis* en el esputo utilizando PCR supera, generalmente, el 98% y la sensibilidad es alta también en pacientes cuyos frotis de esputo es positivo para bacilos ácidosresistentes en su examen al microscopio. Sin embargo, la sensibilidad de tales pruebas puede ser menor del 50% de pacientes con frotis de esputo negativo. (Drobniewski FA, et al., Piersimoni C y Scarparo C. J Clin Microbiol. 2003;41:5355-65; Sarmiento OL, et al. J Clin Microbiol. 2003;41:3233-40). La presencia de fragmentos de ADN derivados de *Mycobacterium tuberculosis* ha sido mostrada anteriormente, pero solo cuando el propio patógeno estaba presente en la orina. (Del Portillo et al. J. Clin.

Microbiol., 29(10):2163-2168 (1991); Kolk et al. J. Clin Microbiol., 30(10):2567-2575 (1992); Kox et al. Neurology, 45(12):2228-2232 (1995) y Zambardi et al. Mol. Cell. Probes, 9:91-99 (1995)).

La presente invención permite la detección de *Mycobacterium tuberculosis* a través de la identificación de su ADN transrenal en la orina de pacientes con tuberculosis pulmonar. Esta aproximación resulta más atractiva que las pruebas que utilizan muestras de esputo, ya que las muestras de orina son más fáciles y seguras de recoger que las de esputo, que puede generar aerosoles infecciosos y ha demostrado ser difícil de obtener, especialmente en niños.

A pesar de un estudio previo que sugiere la utilidad potencial de un test de orina para el ADN de *M. tuberculosis* por PCR en pacientes de VIH infectados con tuberculosis pulmonar (Aceti A, et al. Thorax. 1999;54:145-6), eventuales estudios posteriores llevados a cabo en pacientes de VIH infectados y no infectados con tuberculosis pulmonar, dieron como resultado únicamente un 40 a 60% de sensibilidad. Esta es una sensibilidad demasiado baja para apoyar el uso de una prueba diagnóstica en la práctica clínica. En estos y otros estudios, el ADN de orina diana fue de peso molecular relativamente alto, habiendo empleado tamaños de amplicón >500 pb en las reacciones de PCR. (Kafwabulula M, et al. Int J Tuberc Lung Dis. 2002;6:732-7; Torrea G, et al. J Med Microbiol. 2005;54:39-44).

Las pruebas basadas en PCR descritas previamente han sido utilizadas con éxito para detectar *M. tuberculosis* en la orina de pacientes con tuberculosis genitourinaria (van Vollenhoven P, et al. Urol Res. 1996; 24(2):107-11; Hemal AK, et al. Urology. 2000 Oct 1; 56(4):570-4; Moussa OM, et al. J Urol 2000;164:584-8), casos en los que las bacterias infecciosas están presentes en el tracto urinario. Entre estos pacientes, se ha logrado alta sensibilidad y especificidad amplificando grandes fragmentos (245 a 1000 pb) de ADN microbacteriano purificado a partir de sedimento de orina y los resultados de la prueba molecular están fuertemente correlacionados con la presencia de micobacterias viables que pueden ser cultivadas a partir de la orina. Por tanto, la presencia de fragmentos de ADN específicos en estos pacientes parecen reflejar la excreción urinaria de micobacterias que se están replicando activamente en el tracto urogenital.

En contraste, hemos descubierto que los fragmentos pequeños de ADN de *M. tuberculosis* libres de células que se originan provenientes de sitios de infección externos al tracto urogenital están presentes en la orina en este rango previamente no reconocido de tamaños moleculares de menos de aproximadamente 200 pb. Las secuencias de ADN específicas de *M. tuberculosis* pueden ser detectadas fácilmente como fragmentos cortos de menos de 200 pb en la fracción soluble de muestras de orina de pacientes con tuberculosis pulmonar. Estos fragmentos específicos de ADN desaparecen a continuación de un tratamiento de éxito de la tuberculosis. Esto se demuestra en mayor detalle en los Ejemplos más adelante.

Los datos de la desaparición de ADN-Tr de *M. tuberculosis* durante el transcurso del tratamiento apoyan la potencial utilidad de esta prueba en la monitorización del desarrollo clínico de la enfermedad. También queda claro que pueden obtenerse pequeñas muestras de orina sobre el terreno de forma más sencilla y segura, lo cual es importante cuando el amplio cribado de grandes poblaciones es de interés para la salud pública. También es probable que las pruebas de ADN-Tr para el diagnóstico de tuberculosis tuvieran un valor especial para clínicas situadas en regiones que tienen recursos limitados. Aunque la PCR es actualmente el método preferido para detectar secuencias de ácido nucleico específicas, se puede esperar que las nuevas tecnologías que están surgiendo proporcionarán, finalmente, las herramientas para realizar la relativamente simple prueba de ADN-Tr sobre el terreno (Storhoff J.J., et al. (2004) Biosensors & Bioelectronics 19:875-883; Nam J.M., et al. (2002) J. Am. Chem. Soc 124:3820-3821; Ho HA, et al. (2005) J Am Chem Soc. 127:12673-12676), ofreciendo ventajas prácticas sobre las de la PCR que pueden ser aplicadas fácilmente a la prueba de ADN-Tr. Todas las etapas de los procesos diagnósticos, desde la purificación del ADN-Tr hasta la detección del biomarcador, pueden ser automatizadas y llevadas al punto de atención en pequeños hospitales o incluso sobre el terreno con una mayor facilidad de la que puede realizarse con pruebas microbiológicas convencionales.

#### **Ácidos nucleicos urinarios en infecciones por patógenos no virales**

La presente invención describe un método para el diagnóstico de una infección por patógeno no viral mediante la detección y cuantificación de ácidos nucleicos del agente patógeno en la orina. Se ha descubierto que los ácidos nucleicos del agente patógeno se pueden detectar en la orina. Muchos de estos ácidos nucleicos específicos de patógenos cruzan la barrera transrenal (AN-Tr) y pueden ser detectados en la orina como fragmentos de bajo peso molecular (que tienden a ser menores de 1.000 pb de longitud, pero son preferiblemente menores de 500 pb de longitud, y más preferiblemente menores de 250-300 pb de longitud o menores de 250 pb de longitud), mediante métodos moleculares conocidos en el arte. Otros ácidos nucleicos específicos de patógenos pueden ser vertidos por células que se encuentran dentro del riñón, y por tanto no tienen que cruzar la barrera transrenal para ser detectados en la orina. Además, algunos ácidos nucleicos específicos de patógenos pueden ser encontrados en la orina a través de otros mecanismos además del cruce de la barrera transrenal o de ser generados por las células en el riñón.

La presencia de ácidos nucleicos transrenales en el caso de infecciones causadas por el agente patógeno de acuerdo con la presente invención hace referencia además a infecciones que no implican directamente el tracto

urinario, incluso en ausencia de hematuria o de patologías que conducen a la ruptura, o que alteran la integridad normal, de la barrera renal. Los ácidos nucleicos transrenales son ácidos nucleicos que han cruzado la barrera renal. En general, los ácidos nucleicos transrenales (AN-Tr) de acuerdo con la invención no están asociados con, y no se derivan de, células de ADN que se pierden o liberan en el tracto urinario. En lugar de ello, los ácidos nucleicos transrenales que se detectan en la presente invención han cruzado generalmente la barrera renal como un material libre de células. Por tanto, sus longitudes son menores de aproximadamente 1000 pares de bases, por ejemplo, menores que aproximadamente 500, menores que aproximadamente 300, menores que aproximadamente 250, o entre aproximadamente 100 y aproximadamente 200 bases o pares de bases, en oposición a otros casos en los que el ADN habitualmente tiene una longitud mayor, mayor que 1000 bases o pares de bases. En realizaciones, los fragmentos de AN-Tr y ADN.

El descubrimiento confirma la presencia de ácidos nucleicos urinarios o ácidos nucleicos transrenales derivados de bacterias patógenas y parásitos en la orina, y por lo tanto se puede aplicar al diagnóstico de todas las enfermedades infecciosas causadas por patógenos no virales.

En un modo de realización, la invención hace referencia a un método para el diagnóstico de una infección por patógeno no viral en un sujeto mediante la detección de ácidos nucleicos transrenales relacionados con patógenos en una muestra de orina de un sujeto. En algunos modos de realización, la invención además incluye la etapa de cuantificar los ácidos nucleicos transrenales relacionados con patógenos.

En un modo de realización, la invención hace referencia a un método para el diagnóstico de una infección en un sujeto, incluyendo la etapa de detección de la presencia de secuencias de ácido nucleico transrenal relacionado con patógenos en una muestra de orina del sujeto. En un modo de realización adicional, la invención hace referencia al método anterior en el que los ácidos nucleicos transrenales se aíslan a partir de la muestra de orina previamente a la detección de ácidos nucleicos.

En otro modo de realización, el método de acuerdo con la invención puede incluir un tratamiento inicial de la muestra de orina previamente a la detección. En un modo de realización específico, la invención incluye el tratamiento previo de la muestra de orina con agentes que inhiben la degradación de los ácidos nucleicos. Se encuentran incluidos los inhibidores enzimáticos, tales como agentes quelantes, detergentes, o agentes desnaturizantes, y preferiblemente inhibidores de ADNasa o ARNasa, que incluyen EDTA, HCl de guanidina, isotiocianato de guanidina, N-lauril sarcosina, y dodecilsulfato sódico.

De acuerdo a otro modo de realización, la muestra de orina puede ser centrifugada (a una velocidad entre 3000g y 5000g, tal como entre 3500g y 4500g), o filtrada para separar la fracción que consiste en células y sus fragmentos del sobrenadante que contiene el ADN o ARN soluble y sus complejos proteicos. Sin embargo, la muestra de orina puede además estar sujeta a procedimientos de detección de ácido nucleico sin fraccionamiento.

El aislamiento opcional o la purificación y cuantificación de los ácidos nucleicos transrenales se logran a través del uso de métodos químicos o físicos que ya se conocen en el arte. Incluye al menos una etapa de purificación, utilizando métodos seleccionados de entre extracción con disolventes orgánicos, filtración, precipitación, absorción en matrices sólidas (por ejemplo mediante intercambio iónico), cromatografía de afinidad o bien cromatografía de exclusión molecular o combinaciones de estos métodos.

Sin embargo, el método de purificación debe ser apropiado para el aislamiento de ADN (de hélice doble o única) que son menores de 1000 nucleótidos de longitud, con un peso molecular correspondiente, asumiendo, como peso molecular medio, el de un nucleótido que tiene un valor de 330 Daltons. En algunos modos de realización, la purificación es específica por fragmentos que son más pequeños que 500 nucleótidos (nt) de longitud, con un peso molecular correspondiente, tales como fragmentos cuyas longitudes son menores de 300 nt, fragmentos menores de 250 nt de longitud, o fragmentos cuyas longitudes están entre 100 y 200 pares de bases de ácidos nucleicos (nt).

En un modo de realización, el método de aislamiento de ADN se implementa tratando previamente la muestra de orina con un agente desnaturizante, tal como urea, HCl de guanidina, o isotiocianato de guanidina. La muestra se hace pasar a través de una fase sólida, tal como una matriz que consiste en una resina a base de sílice que, en presencia de sales caotrópicas, tales como isotiocianato de guanidina, se une a los ácidos nucleicos. Incluso más preferiblemente, se utiliza una resina tal como la Wizard Purification Resin® (Promega®). La muestra se recoge a continuación mediante elución en un tampón, tal como Tris-EDTA (Tris 1-10 mM, EDTA 1-10 mM), o en agua.

En un modo de realización preferido, la caracterización y determinación de la presencia de ADN del agente patógeno se realiza a través de una técnica seleccionada del grupo que consiste en: hibridación de ácidos nucleicos, una reacción de sonda cíclica (F. Bekkaoui et al., en *BioTechniques* 20:240-248 [1996]), reacción en cadena de la polimerasa (PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, by M. Innis et al.; Elsevier Publications, 1990), reacción en cadena de la polimerasa anidada, polimorfismo conformacional de cadena simple, o reacción en cadena de la ligasa (LCR) (F. Barany, in *PNAS USA*, 88:189-93 [1991]), por desplazamiento de cadena (SDA) (G.K.

Terrance Walker, et al., en *Nucleic Acid Res*, 22:2670-77 [1994], y polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es el método preferido para la detección o análisis de ácidos nucleicos. De mayor preferencia es la PCR de doble amplificación, con el uso de un cebador anidado en PCR anidada o semi-anidada (referencia: [bio.davidson.edu/courses/genomics/method/NestedPCR.html](http://bio.davidson.edu/courses/genomics/method/NestedPCR.html)).

## 5 Métodos para la amplificación y detección de ácidos nucleicos urinarios

El término ácido nucleico hace referencia a un oligonucleótido, nucleótido, polinucleótido, o fragmentos/parte del mismo y a ADN o ARN de origen natural (*por ejemplo*, genómico) o sintético. Puede tener una hélice doble o simple, y puede además representar la dirección sentido o antisentido de una secuencia. Hélice paralela (5'→3'); hélice antiparalela (3'→5'). Los términos oligonucleótido, polinucleótido y polímero de ácido nucleico son equivalentes, y se entiende que hacen referencia a una molécula que consiste en más de dos bases de ácido desoxirribonucleico o ribonucleico. El número de nucleótidos (bases) y la longitud del fragmento de oligonucleótidos pueden variar. Pueden estar sintetizados en diferentes formas. Las secuencias se definen tradicionalmente empezando en 5' y terminando en 3'. Estos números indican la dirección de la secuencia.

El ADN aislado de la orina de un sujeto puede entonces ser amplificado para ser detectado. Entre los métodos de amplificación se incluyen la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), PCR anidada, PCR semi-anidada, polimorfismo conformacional de cadena simple (SSCP), reacción en cadena de la ligasa (LCR) y amplificación por desplazamiento de cadena (SDA). La detección de ADN transrenal también se realiza a través de hibridación de al menos un cebador marcado.

La hibridación es un método que permite que dos secuencias de ácido nucleico se reconozcan una a otra como complementarias y se unan entre sí (apareamiento). Las secuencias de complementariedad / complementarias son secuencias de polinucleótidos que interactúan entre sí, dependiendo de la interacción entre las bases. Por ejemplo, la secuencia AGTC es complementaria a TCAG de acuerdo con el estándar de apareamiento de bases de Watson y Crick. Sin embargo, otras combinaciones tales como el apareamiento de bases de Hoogstein son bien conocidos por los expertos de práctica habitual en el arte. Es posible tener una secuencia total o parcialmente complementaria, y esto es lo que determina la eficacia o fuerza de atracción entre las dos secuencias. Una complementariedad media evitaría que una fuerte complementariedad hibridara, bajo condiciones que podrían permitir que permaneciera enlazada.

La habilidad de las secuencias nucleicas para hibridar es un fenómeno bien conocido. El primer método de hibridación fue descrito en Marmur & Lane, *PNAS USA*, 46:453 (1960) y 461 (1960), pero desde entonces ha sido perfeccionado como una técnica en biología molecular. Actualmente, el término "hibridación" incluye, entre otros, hibridación de transferencia en ranuras y puntual (slot blot y dot blot). Las condiciones que permiten a las secuencias de nucleótidos reconocerse entre sí (hibridación) pueden ser modificadas de manera que produzcan una hibridación completa (complementariedad con alta especificidad) o una hibridación parcial (complementariedad con una especificidad media). En la presente solicitud, cada vez que se utiliza el término "hibridación", debe entenderse que las condiciones hacen referencia a aquellas que permiten una complementariedad media o alta. El experto en el área puede calcular cuantas secuencias artificiales se necesitan para fomentar la hibridación entre dos secuencias complementarias en la dirección opuesta, conocida como asociación antiparalela.

Una sonda es un oligonucleótido que puede ser producido de forma artificial o natural, y que forma una combinación con otra secuencia de ácido nucleico. Las sondas son útiles a la hora de descubrir secuencias específicas en una muestra que contiene ADN desconocido. En la presente patente, todas las sondas pueden enlazarse a una molécula de señalización (o indicador). La molécula indicadora hace posible detectar la sonda (por ejemplo, a través de reacciones enzimáticas (por ejemplo, ELISA (Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas)), radioactividad, fluorescencia, u otros sistemas.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un método de amplificación de una secuencia de ADN que utiliza cebadores complementarios y una polimerasa sensible al calor. Una clase de enzimas utilizada en la amplificación de ácidos nucleicos específicos son las polimerasas de ADN denominadas polimerasas Taq (*Thermus aquaticus*). Los cebadores son oligonucleótidos a partir de los cuales, bajo condiciones adecuadas, la síntesis de una secuencia de polinucleótidos puede ser iniciada. Un cebador puede existir naturalmente (por ejemplo, en la digestión enzimática de un polinucleótido), o puede ser obtenido a través de síntesis química. El producto amplificado en PCR se denomina a menudo como amplicón.

La PCR anidada es una segunda PCR que se realiza en el producto de una PCR anterior utilizando un segundo conjunto de cebadores que son internos al primer conjunto de cebadores, denominados como cebadores anidados. Esto mejora de forma significativa la sensibilidad y especificidad de la PCR. Los cebadores anidados son cebadores internos a un amplicón obtenido con un primer ciclo de PCR. El proceso de amplificación que utiliza al menos un cebador anidado mejora la especificidad, porque los productos no específicos del primer ciclo no están amplificados en el segundo ciclo, porque carecen de la secuencia que corresponde al cebador anidado. La PCR semi-anidada es

una segunda PCR que utiliza un nuevo cebador y uno de los cebadores originales. Este proceso también mejora la especificidad.

La reacción en cadena de la ligasa (LCR) es un método de amplificación del ADN similar a la PCR. La LCR difiere de la PCR porque amplifica la molécula de la sonda en lugar de producir un amplicón mediante de la polimerización de nucleótidos. Dos sondas se utilizan para cada cadena de ADN y están ligadas entre sí para formar una única sonda. La LCR utiliza tanto una enzima de polimerasa del ADN como una enzima de ligasa del ADN para activar la reacción. Al igual que la PCR, la LCR requiere un termociclador para activar la reacción y cada ciclo da como resultado el duplicado de la molécula del ácido nucleico diana. La LCR puede tener mayor especificidad que la PCR.

En el análisis de polimorfismo conformacional de cadena simple (SSCP), un producto de PCR pequeño (amplicón) es desnaturizado y sometido a electroforesis mediante un gel de poliacrilamida no desnaturizante. Por tanto, como el producto de la PCR se desplaza hacia el interior y a través del gel (y lejos del desnaturizante), recuperará la estructura secundaria que es dependiente de la secuencia (similar a la estructura secundaria del ARN). La movilidad de los productos de la PCR de cadena simple dependerá de la estructura secundaria. Por lo tanto, los productos de la PCR que contienen diferencias de sustituciones de la secuencia, además de inserciones y deleciones, tendrán diferentes movilidades.

La amplificación por desplazamiento de cadena (SDA) es un método de amplificación de ácido nucleico isotérmico basado en la actividad de tipo "nicking" dirigida por cebador de una enzima de restricción, y en la actividad de una polimerasa con falta de exonucleasa.

Los términos purificación o aislamiento hacen referencia a un proceso para eliminar contaminantes de una muestra, donde el resultado es una muestra que contiene un 50%, 60%, 75%, 90% o por encima del 90% del material hacia el que se dirige el procedimiento de purificación.

Para condiciones de temperatura rigurosas en el caso de la hibridación de ácido nucleico, estos términos hacen referencia habitualmente a una temperatura variable entre un máximo, para un ácido nucleico, representado por  $T_m$  menos 5 °C, y un mínimo representado por  $T_m$  menos 25 °C. La técnica usada en el ámbito utiliza condiciones rigurosas de temperatura, en combinación con otros parámetros (por ejemplo, concentración de suero salino), para distinguir secuencias con una homología casi exacta.

Las condiciones rigurosas son conocidas para los expertos en el arte y pueden encontrarse en Ausubel, et al., (eds.), CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. Preferiblemente, las condiciones son tales que las secuencias, homólogas entre sí en al menos aproximadamente un 65%, 70%, 75%, 85%, 90%, 95%, 98%, o 99%, permanecen hibridadas unas con otras. Un ejemplo no limitativo de condiciones de hibridación rigurosas son la hibridación en un tampón de alto contenido en sal que comprende 6X SSC, 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA, 0,02% PVP, 0,02% Ficoll, 0,02% BSA, y 500 mg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturizado a 65 °C, seguido de uno o más lavados en 0,2X SSC, 0,01% BSA a 50°C.

En un segundo modo de realización, una secuencia de ácido nucleico que se puede hibridar con la molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótido, o fragmentos, análogos o derivados de la misma, bajo condiciones de rigurosidad moderada. Un ejemplo no limitativo de hibridación de rigor moderada son la hibridación en 6X SSC, 5X solución Reinhardt's solution, 0,5% SDS y 100 mg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturizado, a 55 °C, seguido de uno o más lavados en 1X SSC, 0,1% SDS a 37 °C. Otras condiciones de rigor moderadas que se pueden utilizar son bien conocidas en el arte. Ver, por ejemplo, Ausubel, et al. (eds.), 1993, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, NY, y Krieger, 1990; GENE TRANSFER AND EXPRESSION, A LABORATORY MANUAL, Stockton Press, NY.

En un tercer modo de realización, se utiliza un ácido nucleico que se puede hibridar con la molécula de ácido nucleico, o fragmentos, análogos o derivados de la misma, bajo condiciones de bajo rigor. Un ejemplo no limitativo de condiciones de hibridación de bajo rigor es la hibridación en formamida al 35%, formamida, 5X SSC, 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 5 mM EDTA, 0,02% PVP, 0,02% Ficoll, 0,2% BSA, 100 mg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturizado, sulfato de dextrano al 10% (peso/volumen) a 40 °C, seguido de uno o más lavados en 2X SSC, 25 mM Tris-HCl (pH 7,4), mM EDTA, y 0,1% SDS a 50 °C. Otras condiciones de bajo rigor que pueden ser utilizadas se conocen bien en el arte (por ejemplo, como las empleadas para hibridaciones con cruces de especies). Ver, por ejemplo, Ausubel, et al. (eds.), 1993, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, NY, y Krieger, 1990, GENE TRANSFER AND EXPRESSION, A LABORATORY MANUAL, Stockton Press, NY; Shilo y Weinberg, 1981. Proc Natl Acad Sci USA 78: 6789-6792.

Se describe en la presente patente un kit para la detección y/o el genotipado de *Mycobacterium tuberculosis* en una muestra de orina de un sujeto en necesidad de ello, que comprende al menos un cebador directo seleccionado de SEQ ID NOs: 34 y 39, y al menos un cebador inverso seleccionado de SEQ ID NOs: 35, 36 y 40, en el mismo o bien en un envase separado, y las instrucciones para su uso.

La invención será además descrita en los siguientes ejemplos, que no limitan el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones.

### Ejemplos

5 Toda la metodología descrita en la presente patente puede ser modificada por el técnico en el área sin cambio alguno de la idea principal básica.

#### Ejemplo 1. Estabilización y preparación de las muestras.

10 Todas las etapas de la preparación de las muestras de orina y de los análisis del ADN transrenal se realizaron a temperatura ambiente. Brevemente, se recogieron aproximadamente 50-60 ml de muestras de orina de cada paciente que participa en el estudio. En los 30 minutos siguientes a la recogida, se añadió una solución que consiste en 0,5M EDTA y 0,5M Tris-HCl, a un pH que se encuentra en un rango de 8,0 a 8,5, a una concentración de 10 mM para inhibir las nucleasas que podrían estar presentes las muestra de orina. Al menos tres enzimas nucleolíticas se indentificaron en la orina, ADNasa I, ADNasa II y fosfodiesterasa. EDTA inhibe la actividad de la ADNasa I y la fosfodiesterasa mediante quelación de metales divalentes tales como  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  y/u otros que se requieren para su actividad. La ADNasa II es sumamente activa en un entorno ácido. La complementación de la orina con el tampón de Tris-HCl a un pH 8,0 incrementa el pH de la orina, inhibiendo de ese modo la actividad de la ADNasa II.

15 Las muestras de orina estabilizadas pueden ser almacenadas, en alícuotas de 5 ml, a -80 °C. De manera opcional, se congelan 25 mL de solución salina para actuar como control.

Otros métodos para la preparación de muestras de orina y para la extracción del ADN se describen en la patente PCT N° WO 98/54364, que se incorpora a modo de referencia en su totalidad.

#### 20 Ejemplo 2. Fraccionamiento de la orina.

25 Para aplicaciones basadas en ADN-Tr, que implican un análisis cuantitativo de ADN-Tr, se requiere a menudo fraccionamiento de la orina. Reduce el impacto de las nucleoproteínas procedentes de células presentes en la orina en una cuantificación precisa del complejo ADN-Tr/proteína, ADN-Tr total, o marcadores genéticos específicos. En nuestros experimentos hemos empleado dos procedimientos para el fraccionamiento de la orina, la centrifugación y la filtración. Ambas se realizaron inmediatamente después de la recogida de la orina y, antes de complementar la muestra con una mezcla estabilizante de EDTA-Tris. La orina puede mantenerse en esta condición siempre que las células de la orina estén intactas y sus constituyentes no se filtren a la orina y contaminen el ADN-Tr con ADN celular.

30 Para la filtración pueden utilizarse filtros con un tamaño de poro que se encuentre en un rango de 0,1 a 5  $\mu m$  con una capacidad de unión de ácidos nucleicos y proteínas reducida. La elección del filtro depende de la diana bajo análisis. Para patógenos bacterianos se requieren poros más pequeños. En nuestros experimentos se utilizaron unidades de filtro luer-lock de 0,45  $\mu m$  (Cat. No. SLHV033RS) o unidad de filtro STERICAP (Cat. No. SCHVU01RE) de 0,45  $\mu m$  150 ml, ambos de Millipore. Después de la filtración las muestras se complementaron con una solución de conservación de EDTA-Tris y se llevan a procesos aguas debajo de la extracción de ADN, o se alícuotan y almacenan congeladas a -80 °C. La fracción celular de orina puede cosecharse extrayéndola del filtro mediante la aplicación de una solución (altas concentraciones de sales o agentes caotrópicos) que se sabe disuelven las células.

35 El fraccionamiento de la orina mediante centrifugación en nuestros experimentos se realizó inmediatamente después de la recogida de la muestra, antes de la adición de la mezcla de conservación. La centrifugación se realizó a temperatura ambiente a una RCF en un rango entre 3500 y 4000xg durante aproximadamente 15 min. El sobrenadante se recogió y manipuló cuidadosamente por el procedimiento descrito anteriormente para la filtración de la orina. El granulado que consistía principalmente en células y detritus celular se resuspendió en una solución fisiológica y se almacenó a -80 °C.

#### Ejemplo 3. Extracción y purificación de los ácidos nucleicos de la orina.

45 En nuestro experimento se utilizó un protocolo de extracción de ADN basado en sílice en dos formatos diferentes. Uno fue activado al vacío y el segundo con centrifugación.

##### *Procedimiento basado en vacío*

50 A la muestra de orina se añadió 6 M de tiocianato de guanidina (GITC) (AMRESCO, Cat. No.0380), a una concentración final no menor de 3 M. Esta solución se mezcló enérgicamente y se complementó con 0,25 ml de suspensión de sílice Wizard (PROMEGA, Cat. No. A7141) por 10 ml de volumen inicial de orina. Para capturar el ADN la mezcla se hizo girar durante 1 hora a temperatura ambiente. La resina con el ADN capturado se recogió

5 cargando la mezcla en un ensamblaje de jeringa con minicolumna (PROMEGA, Cat. No. A7211) acoplado a un conducto de vacío. La resina se recogió aplicando vacío, se lavó dos veces con 5 ml de solución de 3M GITC. La resina se lavó adicionalmente dos veces mediante una solución que consiste en etanol al 80% y 50 mM NaCl. A continuación la minicolumna se separó y la resina se lavó adicionalmente dos veces con etanol al 96% mediante centrifugación en una microcentrifugadora de sobremesa en tubos de 1,5 ml. El ADN se eluyó mediante una breve centrifugación con agua caliente en un volumen de no más de 1/20 de volumen inicial de orina.

#### **Procedimiento basado en la centrifugación**

10 A la muestra de orina se añadió 6 M de tiocianato de guanidina (GITC) (AMRESCO, Cat. No.0380), a una concentración final no menor de 3 M. Esta solución se mezcló enérgicamente y se complementó con 0,25 ml de suspensión de sílice Wizard (PROMEGA, Cat. No. A7141) por 10 ml de volumen inicial de orina. Para capturar el ADN la mezcla se giró continuamente durante 1 hora a temperatura ambiente. La resina con el ADN capturado se recogió mediante centrifugación a aproximadamente 4000xg durante aproximadamente 5 min a temperatura ambiente. La resina granulada se lavó una vez con solución de GITC y una vez con tampón de lavado, y a continuación se transfirió a una mini-columna y se lavó en una ocasión más con etanol al 96%. El ADN se eluyó con agua caliente en un tubo de microcentrifugación mediante centrifugación breve. El ADN se eluyó mediante una breve centrifugación con agua caliente en un volumen de no más de 1/20 de volumen inicial de orina.

#### **Ejemplo 4. Monitorización de la integridad del procedimiento de extracción de ADN.**

20 El procedimiento de extracción de ADN se monitorizó de manera habitual sometiendo a prueba el ADN purificado por la presencia de secuencias de ADN de control. Para los propósitos de detección del ADN-Tr del agente infeccioso, se monitorizó la integridad del procedimiento de purificación de ADN utilizando beta-actina y beta-globina como marcadores para orina humana y de conejo, respectivamente. La amplificación por PCR de las dianas anteriores es un sustituto para el cálculo de la producción y calidad del ADN. Las parejas de cebadores utilizadas en estos estudios se presentan en la Tabla 1.

**Tabla 1.**

ID	Secuencia	Longitud Ceb. (nt)	Tm	Tamaño Amp. (pb)	SEQ ID NO:
ES0007	AAGACAGTGTGTGGGTGTAGG	22	59,0	77	1
ES0008	TCCAAGGCCGCTTTACAC	18	59,8		2
LEBG_F	GGCACAGTTTCATCCATTC	20	54,1	70	3
LEBG_R	GATAGGTCTCTTTATGTCTTCAG	25	54,4		4

25 Las condiciones de PCR para ambas dianas fueron idénticas. La amplificación del ADN aislado equivalente a 300 µl de orina se realizó en 25 µl de mezcla que contiene 0,2 µmol/litro de los cebadores ES0007 y ES0008 o LEBG\_F y LEBG\_R para b-actina humana o b-globina de conejo, respectivamente, 200 µmol/litro dNTP cada uno, y 1 U GoTaq Polimerasa (Promega). El perfil térmico para ambos tipos de reacciones fue: 94 °C durante 5 minutos seguido de 35 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 60 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 1 minuto, y 1 ciclo de 72 °C durante 5 minutos. Diez µl de los productos se resolvieron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 7%, y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio. La Figura 1 y Figura 2 representan los resultados de la PCR del ADN purificado de orina humana y orina de conejo, respectivamente.

35 La Figura 1 muestra los resultados de la PCR realizada para controlar la integridad de la extracción de ADN de orina humana. Las muestras de orina proceden de pacientes que asisten a la consulta del médico para endoscopia para una prueba de *Helicobacter pylori*. Estándares de peso molecular de ADN –M, escalera de 50 pb; NTC – sin control de plantilla; 1 – 13 orina procedente de pacientes.

40 La Figura 2 muestra los resultados de la PCR realizada para controlar la integridad de la extracción de ADN de orina de conejo. Las muestras de orina se cosecharon a partir de conejos infectados con esporas de *Bacillus anthracis* spores. Estándares de peso molecular de ADN – M, escalera de 50 pb, NTC – sin control de plantilla; 1 – ADN procedente de orina de conejo no infectado; 2 y 3 – orina de conejo infectado recogido 6 y 14 horas después de la infección, respectivamente; +c – ADN genómico de conejo.

#### **Ejemplo 5. Diseño de los cebadores de PCR.**

45 Como regla general, los cebadores para el análisis basado en PCR del ADN-Tr fueron diseñados para amplicones diana de no más de 200 pb de longitud.

Todos los cebadores fueron cribados contra la secuencia completa del genoma humano.

Para el diseño de cebadores se utilizó el software FastPCR ([http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/bare-1\\_html/oligos.htm](http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/bare-1_html/oligos.htm)). Los parámetros críticos para el diseño de cebadores fueron tal como sigue a continuación:

- Permitir a 1 que no coincida en 5 nucleótidos en el extremo 3'.
- 5 • Al menos 2 residuos G o C en el extremo 3'.
- Únicamente un residuo A o T en el extremo 3'.
- Máxima Tm de 23 °C para 6 nucleótidos en el extremo 3'.

10 Los cebadores anidados fueron designados utilizando el Primer 3 package [ver Steve Rozen y Helen J. Skaletsky (2000) Primer3 en la WWW para usuarios generales y para programadores biológicos. In: Krawetz S, Misener S (eds) Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386] y se encuentra disponible online ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)). El único parámetro especificado para los cebadores anidados fue la Tm para tener cebadores con temperatura de apareamiento no menor que los cebadores externos.

#### **Ejemplo 6. Selección de PCR. Conjuntos de cebadores para la detección de *Mycobacterium tuberculosis*.**

15 Los cebadores de PCR para la detección del ADN de la especie del complejo *M. tuberculosis* se seleccionaron para la región IS6110, que se ha mostrado que es sumamente específica (Hellyer). Los cebadores utilizados en el presente estudio se representan en la Tabla 2.

**Tabla 2.**

ID	Secuencia	Tamaño del producto, pb
F-785	ACCAGCACCTAACCGGCTGTGG (SEQ ID NO: 34)	129
R-913	CATCGTGGAAGCGACCCGCCAG (SEQ ID NO: 35)	
Rn-851	GTAGGCGAACCCCTGCCAGGTC (SEQ ID NO: 36)	67
F-489	GCCCCATCGACCTACTACTACG (SEQ ID NO: 37)	330
R-819	TGAGGTCTGCTACCCACAGC (SEQ ID NO: 38)	
Fn-627	CCCTGAACCGTGAGGGCATGG (SEQ ID NO: 39)	69
Rn-690	ACAGGCCGAGTTTGGTCATCAGC (SEQ ID NO :40)	

#### **20 Ejemplo 7. Detección de secuencias de ADN de bacterias *Mycobacterium tuberculosis* en orina**

Todos los participantes del estudio se inscribieron en el Instituto Nacional para Enfermedades Infecciosas (INMI) "L. Spallanzani" en Roma, Italia. En este estudio se incluyeron pacientes que habían sido clínicamente diagnosticados con tuberculosis pulmonar tal como se confirmó por aislamiento de *M. tuberculosis* a partir de cultivo de esputo. Diecinueve de veinte pacientes tuvieron un frotis de esputo positivo para bacilos ácido-resistentes, mientras que, sólo uno fue positivo en VIH. Ningún paciente mostró evidencia clínica de implicación extra pulmonar, y todos los cultivos de orina para *M. tuberculosis* realizados fueron negativos. Las muestras de orina se obtuvieron bien antes o dentro de una semana de la iniciación de la terapia anti-tuberculosis. Se recogió la información referente a la edad, sexo, etnia, vacuna *M. bovis* BCG, y los resultados de los exámenes de laboratorio para la tuberculosis. Para determinar si la terapia posterior había influenciado en la habilidad para detectar ADN de *M. tuberculosis*, se pidió a 8 de los pacientes con tuberculosis pulmonar que regresaran a donar muestras de orina dos meses después de iniciar la terapia anti-tuberculosis. Además, diez individuos saludables fueron incluidos como control en el estudio.

Las muestras de orina fueron procesadas tal como se describe en los Ejemplos 1-3 anteriores.

Se realizaron veinte ciclos de amplificación por PCR de la siguiente manera: se añadió ADN aislado equivalente al contenido en 300 µl de orina a una mezcla de 25 µl que contiene 0,2 µmol/litro de los cebadores externos F-785 y R-913, tampón de 5 µl 5X PCR (Promega), 200 µmol/litro dNTP cada uno, y 1 U GoTaq Polimerasa (Promega), desnaturalizada a 94 °C durante 5 minutos seguido de 20 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 62 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 1 minuto, y 1 ciclo de 72 °C durante 5 minutos. Se diluyó 1 µl de producto de esta amplificación 1:10 y 1 µl de la dilución se re-amplificó 25 ciclos utilizando los cebadores F-785 y Rn-851 bajo las mismas condiciones que en la primera reacción. Se utilizó una configuración idéntica para la amplificación de un fragmento grande de 300 pb. Los productos de la segunda amplificación se resolvieron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 7%, y se visualizaron con tinción de bromuro de etidio.

Los resultados de la amplificación semi-anidada se muestran en el panel de la derecha de la Figura 2. El producto específico de *M. tuberculosis* de 67 pb fue encontrado en muestras de orina de todos los 20 pacientes analizados. Ocho individuos sanos utilizados como control dieron negativo para presencia de secuencias específicas de *M. tuberculosis*. El último carril en los geles es el ADN genómico de la cepa H37RV de *Mycobacterium tuberculosis*, como control positivo.

#### 15 **Ejemplo 8. Demostración de que las secuencias de ADN específicas a TB encontradas en orina están libres de células.**

Los informes previos sobre la detección de ADN de *M. tuberculosis* en orina empleaban métodos de aislamiento diseñados para extraer ADN de alto peso molecular de la totalidad de sedimentos urinarios o de la orina. Además, en estos informes se utilizaron tamaños más grandes de amplicón (>200 pb) (Torrea G. J., et al. *Med Microbiol.* 2005;54:39-44; Piersimoni C. J., et al. *Clin. Microbiol.* 40:4138-4142 (2002) Kafwabulula M., et al. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2002;6:732-7; Marei A.M., et al. *J Med Microbiol.* 2003 Apr;52(Pt 4):331-5. Del Portillo P. et al. *J Clin Microbiol.* 1991 Oct;29(10):2163-8). Por lo tanto, era importante caracterizar la naturaleza del ADN-Tr de *M. tuberculosis* que se encuentra en la orina. Para abordar esta cuestión, se emplearon dos diseños experimentales. En el primero, las muestras se fraccionaron mediante centrifugación y el ADN se aisló por separado del sedimento y el sobrenadante de la orina (ver Ejemplos 2 y 3).

Se utilizaron las parejas de cebadores F-785/R-913 y los cebadores semi-anidados F-785/Rn-851 específicos para amplicones pequeños (Ver la Tabla 2). Tal como se muestra en la Figura 4, 6 de 8 de las muestras de sobrenadantes muestran la presencia de ADN de *M. tuberculosis*, mientras que solo 2 de 8 de las muestras de granulados fueron positivas.

El segundo experimento estaba dirigido a la comparación de productos de PCR obtenidos con cebadores diseñados para un tamaño mayor de amplicón, en el rango utilizado por diversos otros investigadores. Los resultados que se muestran en la Figura 5 demuestran que las secuencias de ADN de MTB nuevamente fueron detectadas en todas las 7 muestras de ADN que habían sido aisladas de la orina de pacientes con TB pulmonar cuando se utilizaron cebadores para 129/67 amplicones. Sin embargo, ningún producto de PCR fue detectado con cebadores para 330/69 amplicones. En el panel A PCR semi-anidada para el amplicón pequeño (diana 129 pb). En el panel B PCR semi-anidada para el amplicón grande con los cebadores F489/R819 (diana 330 pb). Los productos respectivos finales de la PCR semi-anidada para amplicones grandes y pequeños son 67 pb y 69 pb. Los carriles 3-9 representan productos de amplificación por PCR de ADN purificado procedente de la orina de los pacientes. Los carriles 1 en ambos geles muestran los estándares de ADN, los carriles 2 en ambos geles son controles negativos, y los carriles 10 en ambos geles son controles de ADN genómico positivos. Estos datos confirmaron que los fragmentos de ADN bacteriano extraídos de la orina son fragmentos relativamente pequeños. Además, estos resultados sugieren con fuerza que es poco probable que el ADN de MTB puede ser detectado de forma reproducible en muestras de orina de pacientes con TB pulmonar cuando se utiliza análisis con PCR en sedimentos de orina combinado con tamaños grandes de amplicón.

#### 45 **Ejemplo 9. Análisis de pacientes con TB antes y después del tratamiento.**

Uno de los problemas críticos con los que nos enfrentamos en el manejo y erradicación de la tuberculosis pulmonar a nivel mundial es la detección precisa y temprana de la eficacia del tratamiento terapéutico de los pacientes. Actualmente, la práctica general de la monitorización del éxito del tratamiento está basada en los síntomas clínicos, que son indicadores relativamente tardíos y por lo tanto no proporcionan información para un ajuste de la pauta terapéutica "en tiempo real".

A este respecto, el impacto de la plataforma tecnológica del ADN-Tr es doble. En primer lugar, ofrece un medio seguro, fácil y no costoso para la detección de mutaciones que se conoce están asociadas con el aumento a la resistencia a fármacos, y en segundo lugar, se ajusta de manera ideal a tareas de monitorización temprana debido a sus inherentes capacidades de detección y cuantificación de marcadores genéticos de un origen no huésped en la orina.

5 Para determinar si las secuencias de ADN específicas a MTB en la orina pueden ser utilizadas para la evaluación del tratamiento terapéutico, se pidió a 8 de los pacientes con TB que se había encontrado que eran positivos en MTB ADN-Tr en el momento de la inscripción, que regresaran a donar muestras de orina aproximadamente dos meses después de la iniciación de quimioterapia. En el momento del segundo test los síntomas clínicos han resuelto en estos pacientes y todos resultaron negativos en el frotis de esputo. El ADN-Tr extraído a partir de estas muestras se analizó y no se observó ningún producto correspondiente a la secuencia de TB específica de 67 pb, tal como se muestra en la Figura 6.

LISTADO DE SECUENCIAS

10 <110> Instituto Nazionale per le Malattie Infettive IRCCS Lazzaro Spallanzani Melkonyan, Hovsep Cannas, Angela Tomei, Louis David Umansky, Samuil R.

<120> COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA DETECTAR ÁCIDOS NUCLEICOS ESPECÍFICOS DE PATÓGENOS EN LA ORINA

<130> 29480-503-061

15

<140> PCT/US2006/005225

<141> 2006-02-14

<150> RM2005A000068

20 <151> 2005-02-17

<150> US 11/137,934

<151> 2005-05-25

25 <150> 60/691,186

<151> 2005-06-16

<160> 51

30 <170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 22

<212> DNA

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador sintetizado químicamente

5 <400> 1

aagacagtgt tgtgggtgta gg 22

<210> 2

<211> 18

10 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador sintetizado químicamente

15

<400> 2

tccaaggccg ctttacac 18

<210> 3

20 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Cebador sintetizado químicamente

<400> 3

ggcacaggtt tcatccattc 20

30 <210> 4

<211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Cebador sintetizado químicamente

<400> 4

gataggtctc tctttatgtc ttcag 25

10 <210> 5

<211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Cebador sintetizado químicamente

<400> 5

tcrghaaattt gggrmtcagc gttac 25

20

<210> 6

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Cebador sintetizado químicamente

<400> 6

30 tccataaaaat ttyggatbbd tygggtgttg 30

<210> 7

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Cebador sintetizado químicamente

<400> 7

acggatcdtt ttgawgggac ac 22

10

<210> 8

<211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Cebador sintetizado químicamente

<400> 8

20 agcdycayac crcaavaaag tcatgcygc 29

<210> 9

<211> 19

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador sintetizado químicamente

30 <400> 9

ctgadaccgt tctacagc 19

<210> 10

<211> 24

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador sintetizado químicamente

10 <400> 10

ytyacracc gtgatyattc cagc 24

<210> 11

<211> 28

15 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador sintetizado químicamente

20

<400> 11

ckcceaayga tcccatcac agcgagag 28

<210> 12

25 <211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> Cebador sintetizado químicamente

<400> 12

tgatgggacy aaactcgtaa ccg 23

<210> 13

5 <211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Cebador sintetizado químicamente

<400> 13

cttcattttt taagaacaac tcaccagga 29

15 <210> 14

<211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Cebador sintetizado químicamente

<400> 14

accattrgcc tcaatagggg tatgc 25

25

<210> 15

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> Cebador sintetizado químicamente

<400> 15

cactgggcgt aaagagygcg tag 23

5

<210> 16

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Cebador sintetizado químicamente

<400> 16

15 ccacctrct ctcccayact c 21

<210> 17

<211> 28

<212> ADN

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador sintetizado químicamente

25 <400> 17

ggtaagcca taggatttca cayctgac 28

<210> 18

<211> 26

30 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador sintetizado químicamente

5 <400> 18

gggtattggc ctaacatggc tatgac 26

<210> 19

<211> 20

10 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador sintetizado químicamente

15

<400> 19

aggctccctc tccggaatcg 20

<210> 20

20 <211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Cebador sintetizado químicamente

<400> 20

agaattgggt aatttagcgc cct 23

30 <210> 21

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Cebador sintetizado químicamente

<400> 21

cttgattct tggatggtga tgc 23

10 <210> 22

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Cebador sintetizado químicamente

<400> 22

ggtaagatc tcgttcgta tcgg 24

20

<210> 23

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Cebador sintetizado químicamente

<400> 23

30 cggcttaatt tgactcaaca cg 22

<210> 24

<211> 17

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Cebador sintetizado químicamente

<400> 24

10 agtttyccgc cccggag 17

<210> 25

<211> 19

<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador sintetizado químicamente

20 <400> 25

cccagtttbc cgccycgga 19

<210> 26

<211> 24

25 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador sintetizado químicamente

30

<400> 26

ctattggaga ttatggagct gtgc 24

<210> 27

<211> 21

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador sintetizado químicamente

10

<400> 27

cacacaccga accgargtg c 21

<210> 28

15 <211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Cebador sintetizado químicamente

<400> 28

gggagaacgt actggggcgt c 21

25 <210> 29

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Cebador sintetizado químicamente

<400> 29

tcgctgtagt tcgtcttggg g 21

5 <210> 30

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Cebador sintetizado químicamente

<400> 30

ctgttgctgt taaagggtc gtag 24

15

<210> 31

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Cebador sintetizado químicamente

<400> 31

25 tccgacatgg acgggacgac c 21

<210> 32

<211> 18

<212> ADN

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador sintetizado químicamente

<300>

- 5 <301> A Belli et al.<302> Detección de reacción en cadena de la polimerasa simplificada de Lishmania del nuevo mundo en muestras de leishmaniasis cutánea en muestras clínicas <303> Am. J. Trop. Med. Hyg.<304> 58<305> 1<306> 102-109<307> 1998

<400> 32

- 10 gtgggggagg ggcgttct 18

<210> 33

<211> 21

<212> ADN

- 15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador sintetizado químicamente

- 20 <300>

<301> A Belli et al.<302> Detección de reacción en cadena de la polimerasa simplificada de Lishmania del nuevo mundo en muestras de leishmaniasis cutánea en muestras clínicas <303> Am. J. Trop. Med. Hyg.<304> 58<305> 1<306> 102-109<307> 1998

- 25 <400> 33

attttacacc aacccccagt t 21

<210> 34

<211> 22

- 30 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador sintetizado químicamente

<400> 34

accagcacct aaccggctgt gg 22

5

<210> 35

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Cebador sintetizado químicamente

<400> 35

15 catcgtggaa gcgaccgcc ag 22

<210> 36

<211> 22

<212> ADN

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador sintetizado químicamente

25 <400> 36

gtaggcgaac cctgcccagg tc 22

<210> 37

<211> 19

30 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador sintetizado químicamente

5 <400> 37

gccccatcga cctactacg 19

<210> 38

<211> 20

10 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador sintetizado químicamente

15

<400> 38

tgaggtctgc tacccacagc 20

<210> 39

20 <211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Cebador sintetizado químicamente

<400> 39

ccctgaaccg tgaggcatc g 21

30 <210> 40

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Cebador sintetizado químicamente

<400> 40

acaggccgag ttggtcatc agc 23

10 <210> 41

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Cebador sintetizado químicamente

<400> 41

ggttatatgt tccagaatcc 20

20

<210> 42

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Cebador sintetizado químicamente

<400> 42

30 atatccagca taatcatcca 20

<210> 43

<211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Cebador sintetizado químicamente

<400> 43

10 aaggtgtaga attaaggaat gatagtgag 29

<210> 44

<211> 23

<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador sintetizado químicamente

20 <400> 44

tccagcataa tcatccacag cat 23

<210> 45

<211> 23

25 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador sintetizado químicamente

30

<400> 45

aacaacgaag tacaatacaa gac 23

<210> 46

<211> 19

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador sintetizado químicamente

10

<400> 46

gctgtaacg gcttcaaga 19

<210> 47

15 <211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Cebador sintetizado químicamente

<400> 47

aattggagaa atatagaagt gatg 24

25 <210> 48

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Cebador sintetizado químicamente

<400> 48

aagtacaagt gctggaccta c 21

5 <210> 49

<211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Cebador sintetizado químicamente

<400> 49

caaccgtata tccttctacc tctaa 25

15

<210> 50

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Cebador sintetizado químicamente

<400> 50

25 ttccagaccg tgacaatgat g 21

<210> 51

<211> 17

<212> ADN

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador sintetizado químicamente

<400> 51

5 rggtaggggc gttctgc 17

**REIVINDICACIONES**

1. Método para diagnosticar una infección por *Mycobacterium tuberculosis* en un sujeto, que comprende detectar la presencia de un ácido nucleico de *Mycobacterium tuberculosis* libre de células en una fracción soluble de una muestra de orina del sujeto, diagnosticando de ese modo la infección por *Mycobacterium tuberculosis*.
- 5 2. Método según la reivindicación 1, que además comprende la etapa de cuantificar el ácido nucleico.
3. Método según la reivindicación 2, en donde dicha detección se realiza mediante un método seleccionado del grupo que consiste en PCR, PCR anidada, PCR semi-anidada, hibridación, SSCP, LCR, SDA, y apareamiento con sondas moleculares que son específicas para el patógeno no viral.
- 10 4. Método según la reivindicación 3, en donde se utiliza un conjunto de cebadores para dicho método, en donde el conjunto de cebadores comprende un cebador directo y un cebador inverso.
5. Método según la reivindicación 4, en donde el cebador directo se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 34 y 39.
6. Método según la reivindicación 4, en donde el cebador inverso se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 35, 36, y 40.
- 15 7. Método según la reivindicación 1, en donde el sujeto es un mamífero.
8. Método según la reivindicación 7, en donde el mamífero es un humano.
9. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde el ácido nucleico detectado es uno o más fragmentos de ADN de menos de 300 pb.
- 20 10. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde el ácido nucleico detectado es uno o más fragmentos de ADN de 200 pb o menos.

Figura 1

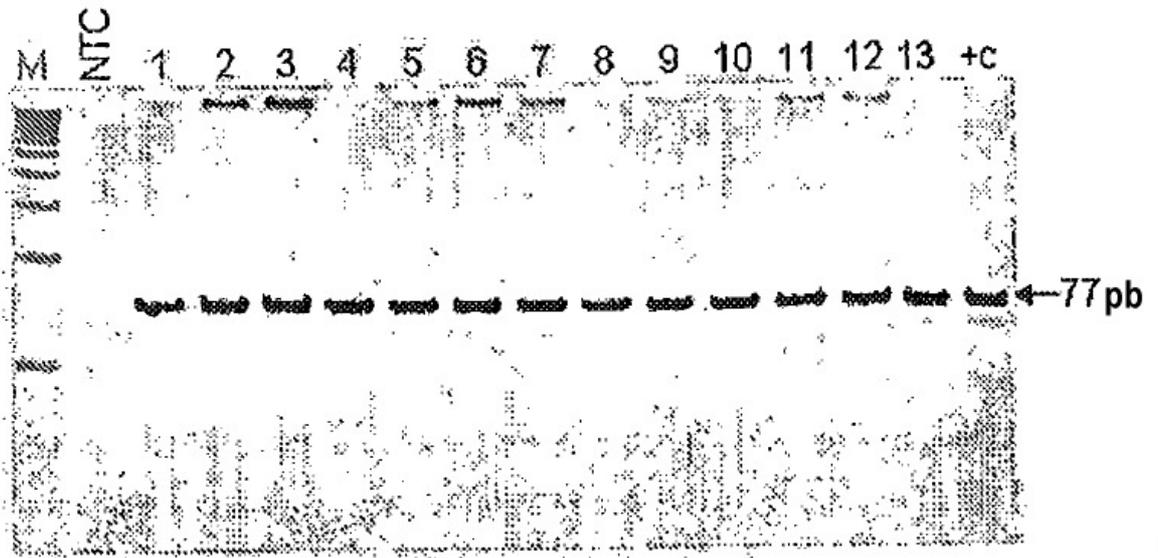


Figura 2

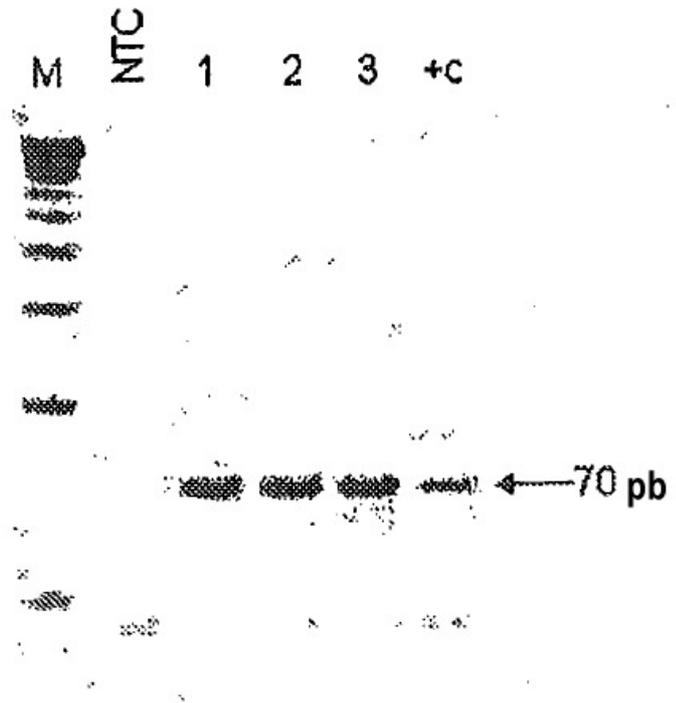


Figura 3

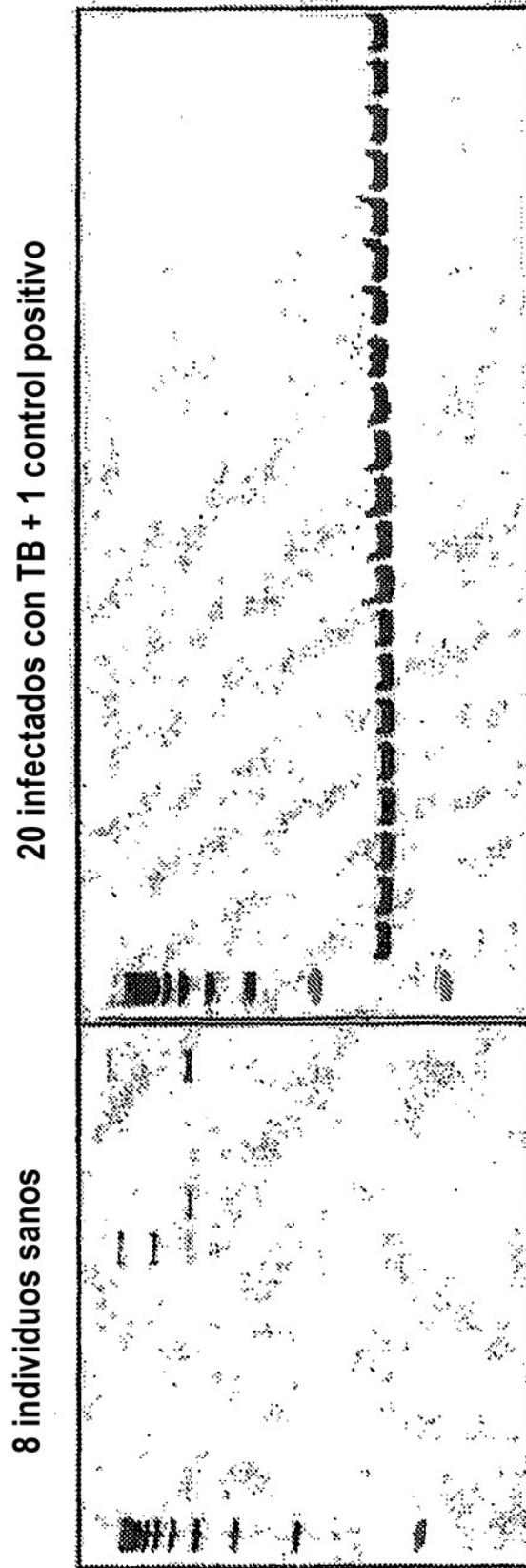
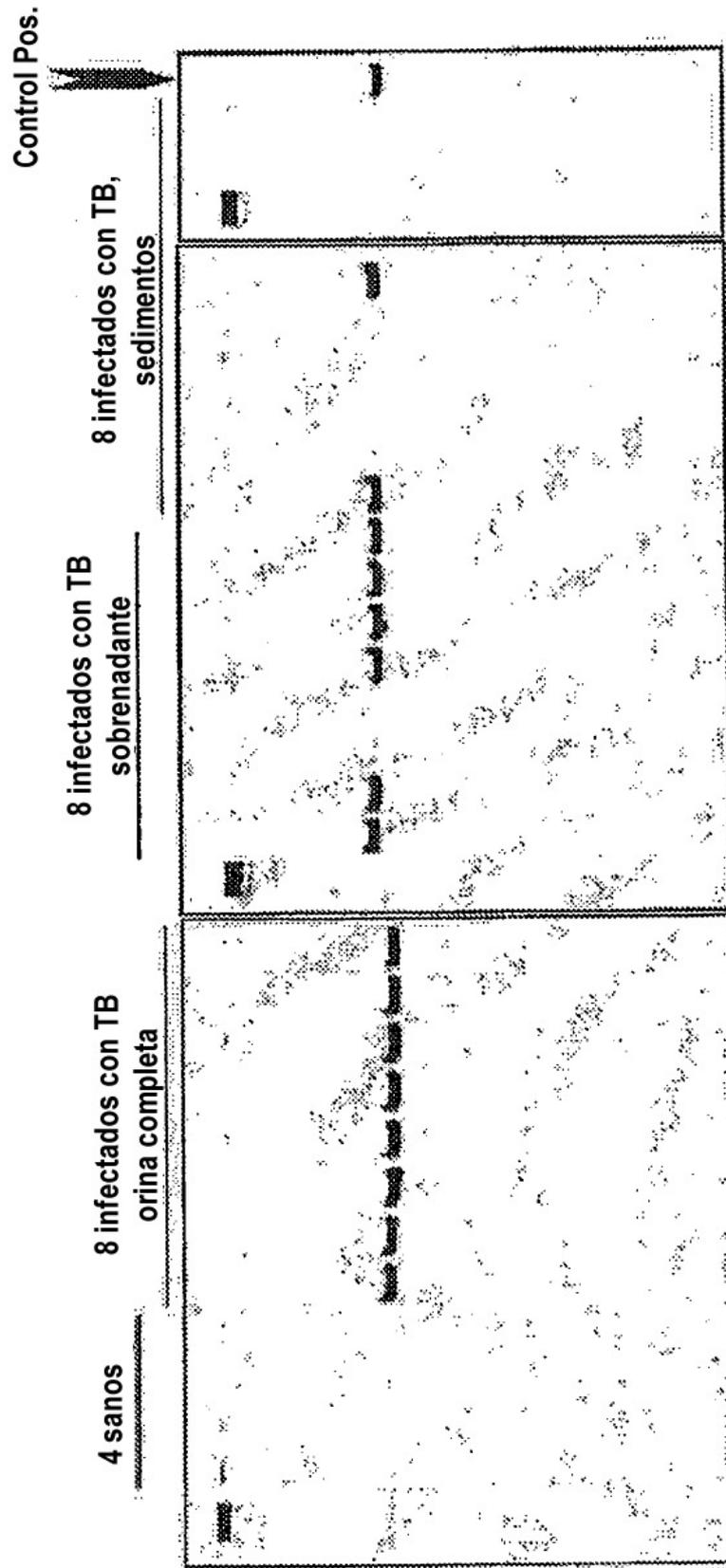


Figura 4



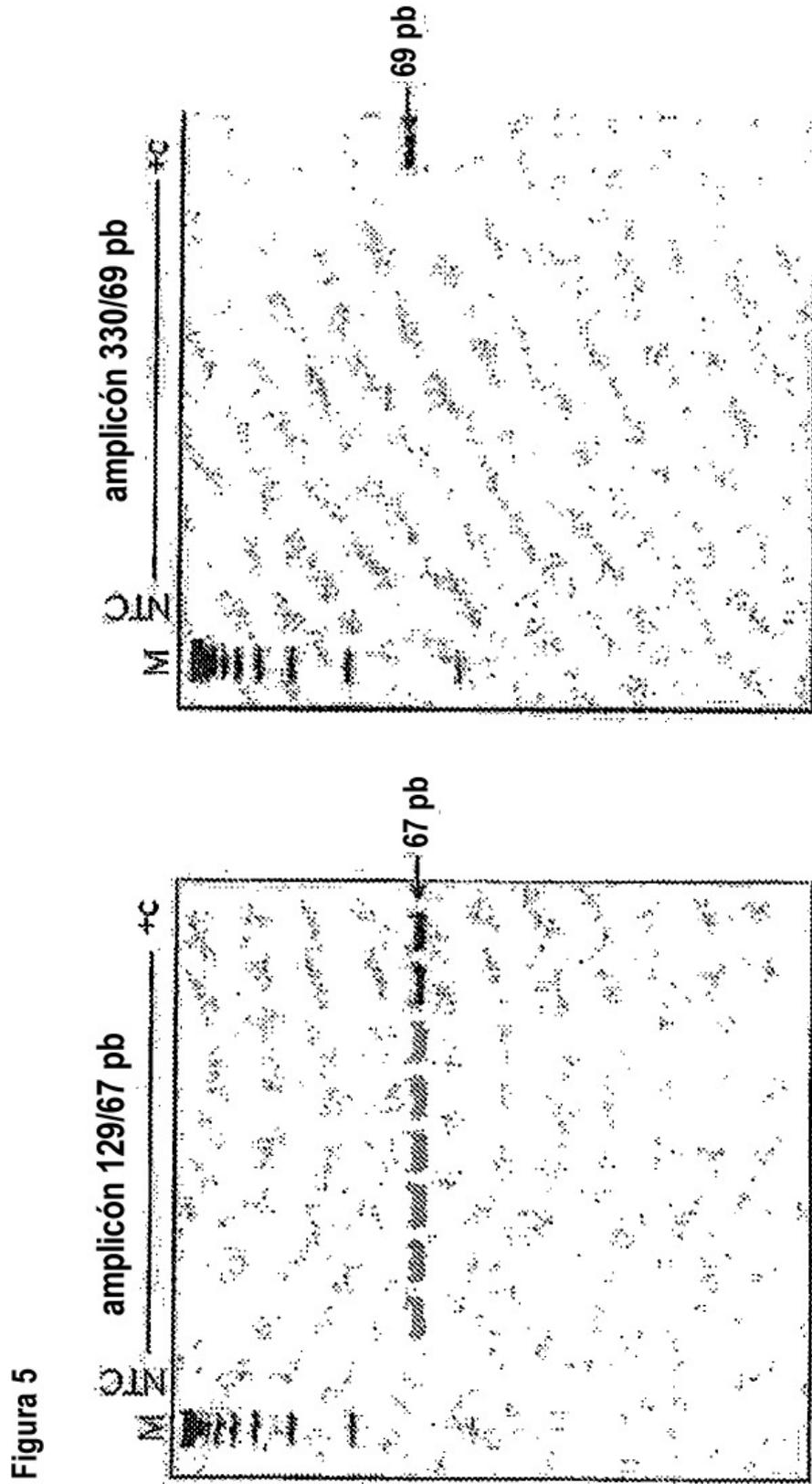


Figura 5

Figura 6

