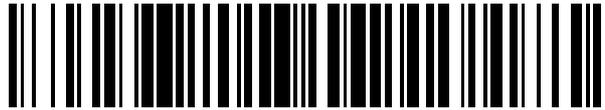


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 560 433**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.04.2005 E 10174146 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.12.2015 EP 2256218**

54 Título: **Cebadores para la detección del bacilo de la tuberculosis y procedimiento de detección del bacilo de la tuberculosis humana con los mismos**

30 Prioridad:

26.04.2004 JP 2004129272

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

19.02.2016

73 Titular/es:

**WAKO PURE CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.
(100.0%)**

**1-2, Doshomachi 3-chome, Chuo-ku
Osaka-shi, Osaka 540-8605, JP**

72 Inventor/es:

ISHIKAWA, TOMOKAZU

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 560 433 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

Cebadores para la detección del bacilo de la tuberculosis y procedimiento de detección del bacilo de la tuberculosis humana con los mismos

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para detectar el bacilo de la tuberculosis humana, es decir *Mycobacterium tuberculosis* (en lo sucesivo en el presente documento denominado *Mycobacterium tuberculosis*), en pruebas de laboratorio usando una amplificación del ácido nucleico.

Técnica anterior

10 *Mycobacterium tuberculosis* es un microbio patógeno que causa la tuberculosis en seres humanos y es un bacilo grampositivo que pertenece al género de *Mycobacterium* que tiene propiedades acidófilas. A pesar de la significativa disminución de la tuberculosis en los últimos años, recientemente se ha convertido en un problema grave debido al aumento de la tasa de incidencia en ancianos y el brote de infecciones del grupo en personas jóvenes que no han experimentado infección tuberculosa.

15 Por otro lado, también se sabe que además de *Mycobacterium tuberculosis*, micobacterias no tuberculosas tales como *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare* y *Mycobacterium kansasii* también exhiben patogeneidad para el ser humano. Adicionalmente, también se ha convertido en un gran problema las micobacterias no tuberculosas que desarrollan enfermedad en pacientes infectados por el virus del SIDA. Dado que la mayoría de estas micobacterias no tuberculosas exhiben resistencia contra agentes antituberculosos, el diagnóstico diferencial entre las micobacterias tuberculosas y no tuberculosas se hace importante para determinar la estrategia terapéutica. No obstante, dado que la diferenciación de la tuberculosis basada en los síntomas clínicos y la observación histopatológica es bastante difícil, el diagnóstico se debe determinar usando identificación de bacterias.

25 Cuando el diagnóstico diferencial se hace entre la tuberculosis y las micobacterias no tuberculosas, las muestras generalmente se cultivan por separado en el medio de Ogawa y después se someten a pruebas bioquímicas para la identificación de la especie. No obstante, dado que el crecimiento del género *Mycobacterium* generalmente es lento es necesario un tiempo considerable para el cultivo. Por este motivo, cuando se realizan pruebas fundamentales convencionales, tales como examen frotis y examen del cultivo, el aislamiento y el cultivo de las bacterias para obtener el resultado diagnóstico para determinar tuberculosis o no requiere al menos 3 o 4 semanas y, después, se requiere un periodo de tiempo de otras 2 o 3 semanas para varias pruebas de identificación de la especie.

30 Aunque se conoce otro procedimiento para detectar bacilos de la tuberculosis usando anticuerpos anti-antígeno del género *Mycobacterium*, la especificidad del bacilo de la tuberculosis es eficiente debido a la reacción cruzada entre especies del género *Mycobacterium* y, como resultado, la sensibilidad no es suficiente.

35 Recientemente se ha examinado una técnica diagnóstica aplicando técnicas de amplificación de ácido nucleico, tal como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), como medio útil, así como aplicación de las mismas al diagnóstico del bacilo de la tuberculosis. Se ha estudiado si se pueden usar varias regiones del genoma del ADN del bacilo de la tuberculosis como diana para detectar el bacilo de la tuberculosis usando PCR.

40 Por ejemplo, se ha publicado un procedimiento para detectar la región genética que codifica el antígeno de 65 kDa del género *Mycobacterium* (al que se hace referencia, por ejemplo, en el documento no de patente 1, documento no de patente 2, documento no de patente 3, documento no de patente 4 y documento no de patente 5). Sin embargo, se sabe que el mismo género, tal como *M. avium*, *M. fortuitum*, *M. paratuberculosis*, *M. kansasii*, *M. malmoense*, BCG y *M. marinum* así como *Mycobacterium tuberculosis* tiene el gen del antígeno de 65 kDa conocido. Especialmente, como el antígeno de 65 kDa tiene una alta reactividad cruzada con *M. avium* o *M. kansasii*, que son los microorganismos representativos causantes de la micobacteriosis no tuberculosa, el procedimiento para detectar el gen del antígeno de 65 kDa sigue presentando un problema como procedimiento para detectar específicamente *Mycobacterium tuberculosis*.

45 Además, se ha realizado un examen de prueba para identificar *M. tuberculosis* usando una secuencia genética que codifica la proteína MPB70, que se identificó mediante ADN de *Mycobacterium bovis* (al que se hace referencia, por ejemplo, en el Documento no de patente 6). Sin embargo, Kulski, et al. publicaron el resultado en FEMS Microbiol. Lett. 1997 Mar. 1; 148(1): 43 – 48 (Documento no de patente 7). Concretamente, como resultado de un examen por PCR, se encontró que se producía la reacción cruzada con la secuencia similar en ADN de *M. kansasii* al usar la proteína MPB70 como diana. Por consiguiente, este procedimiento continúa teniendo un problema como procedimiento para detectar específicamente *Mycobacterium tuberculosis*.

55 Como alternativa se ha publicado un procedimiento para detectar *M. tuberculosis* / *bovis* usando una secuencia de genes que codifica un antígeno proteico b (Pab) como marcador (al que se hace referencia, por ejemplo, en el Documento no de patente 8) y se ha confirmado la utilidad de este marcador para la detección de *M. tuberculosis/bovis*. Sin embargo, como, en el caso del gen Pab, solo puede existir una copia en el genoma de *M. tuberculosis*, no se considera tan preferible como material para dirigir la amplificación de ácidos nucleicos (por el contrario, en el caso de la secuencia de IS6110 descrita a continuación, existen diez copias en el genoma de *M.*

tuberculosis).

Además, se publicó que se puede utilizar RFLP (polimerización de longitudes de fragmentos de restricción) mediante el uso de IS6110 como sonda, para el diagnóstico de bacilos de la tuberculosis (a lo que se hace referencia en, por ejemplo, el Documento no de patente 9). Esta secuencia se ha usado ampliamente como importante herramienta para el estudio epidemiológico de la tuberculosis en muchos países del mundo. IS6110 es una secuencia de inserción específica del bacilo de la tuberculosis y existe de manera plural en el ADN cromosómico, con diferente número y ubicación en función de la cepa, y este carácter genético se hereda en cierto grado de manera estable. Por lo tanto, se muestran diferentes patrones de RFLP en función de la diferencia en la cepa, y puede ser posible el agrupamiento en base a sus orígenes. Existen muchos informes sobre el procedimiento de detección del bacilo de la tuberculosis usando IS6110 que indican una sensibilidad que supera el 75 %, así como una especificidad de casi el 100 %. Sin embargo, entretanto, también se ha publicado el resultado de un estudio que indica la posibilidad de que el procedimiento de detección genere falsos positivos con el uso de IS6110 (al que se hace referencia en el Documento no de patente 10). Aunque también se conoce un procedimiento de detección con PCR mediante el diseño de un cebador específico de IS6110 (al que se hace referencia en, por ejemplo, el documento de patente 1, el documento de patente 2, el documento de patente 3 y el documento de patente 4), este procedimiento plantea el problema de que también se amplifican las secuencias relacionadas con IS6110 derivadas del género *Mycobacterium* que no pertenecen a *M. tuberculosis*. Además, las secuencias de tipo IS6110 existen en otras especies de microorganismos distintas del bacilo de la tuberculosis y, como resultado, se ha sugerido que estos microorganismos podrían ser detectables mediante el procedimiento de detección dirigido a IS6110. Por consiguiente, todos los procedimientos convencionales para detectar IS6110 presentan el problema de ser insuficientes en la detección específica de *Mycobacterium tuberculosis*.

Por consiguiente, existe la necesidad de establecer un procedimiento nuevo para detectar específicamente *Mycobacterium tuberculosis*.

[Documento de patente 1]: JP-A-05-507617

[Documento de patente 2]: JP-A-11-514522

[Documento de patente 3]: JP N.º 2814422

[Documento de patente 4]: USP N.º 5370998

[Documento de patente 5]: JP-A-60-500717

[Documento de patente 6]: JP-A-60-281

[Documento de patente 7]: USP N.º 5.210.015

[Documento de patente 8]: USP N.º 5538848

[Documento de patente 9]: USP N.º 5.801.155

[Documento de patente 10]: USP N.º 5925517

[Documento de patente 11]: USP N.º 6.492.121

[Documento de patente 12]: JP N.º 2650159

[Documento de patente 13]: JP-B-07-114718

[Documento de patente 14]: JP-A-58-040099

[Documento de patente 15]: JP-A-62-265999

[Documento no de Patente 1]: Chia et al., J. Clin. Microbiol., 1990, 28(9), 1887 – 1880.

[Documento no de Patente 2]: Brisson-Noel et al., Lancet, 1989, 334, 1069 – 1071

[Documento no de Patente 3]: Hackel et al., Molecular and cellular Probes, 1990, 4, 205 – 210.

[Documento no de Patente 4]: Woods, Cole, FEMS Microbiology Letters, 1989, 65, 305 – 310.

[Documento no de Patente 5]: Hance et al., Molecular Microbiology, 1989, 3(7), 843 – 849.

[Documento no de Patente 6]: Kulski et al., J. Clin. Microbiol., 1995, 33, 668 – 674

[Documento no de Patente 7]: Kulski et al., FEMS Microbiol. Lett. Mar. 1, 1997, 148(1), 43 – 48.

[Documento no de Patente 8]: Sjobring et al., J. Clin. Microbiol., 1990, 28(10), 2200 – 2204.

[Documento no de Patente 9]: Hermans PWM et al., J. Clin. Microbiol., 1990, 28, 2051 – 2058.

[Documento no de Patente 10]: Lee et al., Neurological Sciences, 1994, 123, 173 – 179.

[Documento no de Patente 11]: Thierry et al., Nucleic acid Res., 1990, 18(1), 188.

5 [Documento no de Patente 12]: Nucleic acids Res., 1986, 14, 6115.

[Documento no de Patente 13]: Kent PT, Kubica GP, Public Health Mycobacteriology, A Guide for the Level III Laboratory, U.S.Department of Health and Human Services, Public Health Service, Center for Disease Control, Atlanta, EE.UU., 1985, p.31 – 55.

Divulgación de la invención

10 **Problemas que ha de resolver la invención**

La presente invención se ha realizado en las circunstancias anteriores y un objeto de la presente invención es proporcionar un nuevo cebador para detectar el bacilo de la tuberculosis sin dar un falso positivo en el diagnóstico, y un procedimiento fácil de usar, rápido y muy preciso para detectar *Mycobacterium tuberculosis* con el uso del mismo.

Medios para resolver los problemas

15 La presente invención se ha creado para resolver los problemas anteriores y está constituida por los siguientes elementos.

(1) Un par de cebadores para detectar *Mycobacterium tuberculosis* que consiste en un cebador que consiste en un oligonucleótido que consiste en una secuencia de ácido nucleico descrita en SEC ID N.º 2 y un cebador que consiste en un oligonucleótido que consiste en una secuencia de ácido nucleico descrita en SEC ID N.º 4.

20 (2) Un procedimiento para detectar *Mycobacterium tuberculosis* que comprende el uso de un par de cebadores que comprende un cebador que consiste en un oligonucleótido que consiste en una secuencia de ácido nucleico descrita en SEC ID N.º 2 y un cebador que consiste en un oligonucleótido que consiste en una secuencia de ácido nucleico descrita en SEC ID N.º 4.

25 (3) Un kit para detectar *Mycobacterium tuberculosis* que comprende un cebador que consiste en un oligonucleótido que consiste en la secuencia de ácido nucleico descrita en SEC ID N.º 2 y un cebador que consiste en un oligonucleótido que consiste en una secuencia de ácido nucleico descrita en SEC ID N.º 4.

El inventor de la presente invención ha continuado las verificaciones teóricas y experimentales sobre las homologías de las diversas secuencias génicas identificadas hasta la fecha entre las especies, incluyendo *Mycobacterium tuberculosis* y otros organismos, y ha descubierto la existencia de una secuencia de bases que tiene una propiedad de hibridarse específicamente con una región específica de la secuencia de IS6110, que es la secuencia de inserción y la secuencia repetida en *Mycobacterium tuberculosis*, y la secuencia de bases es útil en la detección de *Mycobacterium tuberculosis*.

30 Como resultado de amplios estudios basados en estos descubrimientos, el inventor ha desarrollado un oligonucleótido con especificidad por *Mycobacterium tuberculosis* y que es útil en su detección (secuencia de ácido nucleico descrita en la SEC ID N.º 1, la SEC ID N.º 4 y la SEC ID N.º 7) , un cebador de ácido nucleico y una sonda marcada para detectar *Mycobacterium tuberculosis* utilizando esta secuencia, y ha establecido un procedimiento para detectar *Mycobacterium tuberculosis* usando los mismos.

Efectos de la invención

40 De acuerdo con el procedimiento para detectar *Mycobacterium tuberculosis* de la presente invención, es posible excluir el diagnóstico falso positivo, y como consecuencia de ello, se puede efectuar una detección más específica y precisa de *Mycobacterium tuberculosis* en comparación con los procedimientos convencionales para detectar *Mycobacterium tuberculosis* dirigidos a IS6110.

Breve descripción de las figuras

Figura 1

45 La Fig.1 muestra los resultados de la electroforesis obtenida en el ejemplo 1.

En la Figura 1, el número de cada carril muestra los resultados obtenidos mediante el uso de las siguientes muestras, respectivamente.

M4: marcador del peso molecular (marcador 4)

- a: *Escherichia coli*
- b: *Mycobacterium tuberculosis*
- c: *Mycobacterium kansasii*
- d: *Mycobacterium marinum*
- 5 e: *Mycobacterium simiae*
- f: *Mycobacterium scrofulaceum*
- g: *Mycobacterium gordonae*
- h: *Mycobacterium szulgai*
- i: *Mycobacterium avium*
- 10 j: *Mycobacterium intracellulare*
- k: *Mycobacterium gastrii*
- l: *Mycobacterium xenopi*
- m: *Mycobacterium nonchromogenicum*
- n: *Mycobacterium terrae*
- 15 o: *Mycobacterium triviale*
- p: *Mycobacterium fortuitum*
- q: *Mycobacterium chelonae*
- r: *Mycobacterium abscessus*
- s: *Mycobacterium peregrinum*

20 Figura 2

La Figura 2 muestra los electroforetogramas obtenidos en el Ejemplo 2. En la Figura 2, el número de cada carril muestra los resultados obtenidos mediante el uso de las siguientes muestras, respectivamente.

- M1: marcador del peso molecular (marcador 1)
- M4: marcador del peso molecular (marcador 4)
- 25 a: *Escherichia coli*
- b: *Mycobacterium tuberculosis*
- c: *Mycobacterium kansasii*
- d: *Mycobacterium marinum*
- e: *Mycobacterium simiae*
- 30 f: *Mycobacterium scrofulaceum*
- g: *Mycobacterium gordonae*
- h: *Mycobacterium szulgai*
- i: *Mycobacterium avium*
- j: *Mycobacterium intracellulare*
- 35 k: *Mycobacterium gastrii*
- l: *Mycobacterium xenopi*
- m: *Mycobacterium nonchromogenicum*

- n: *Mycobacterium terrae*
- o: *Mycobacterium triviale*
- p: *Mycobacterium fortuitum*
- q: *Mycobacterium chelonae*
- 5 r: *Mycobacterium abscessus*
- s: *Mycobacterium peregrinum*

Figura 3–1

La Figura 3–1 muestra los electroforetogramas obtenidos en el Ejemplo comparativo 1.

10 En la 3–1, el número de cada carril muestra los resultados obtenidos mediante el uso de las siguientes muestras, respectivamente.

El círculo de puntos indica una banda (m) obtenida con la muestra de *Mycobacterium nonchromogenicum*. El círculo de puntos indica y una flecha una banda (o) obtenida con la muestra de *Mycobacterium triviale*.

- M1: marcador del peso molecular (marcador 1)
- M4: marcador del peso molecular (marcador 4)
- 15 a: *Escherichia coli*
- b: *Mycobacterium tuberculosis*
- c: *Mycobacterium kansasii*
- d: *Mycobacterium marinum*
- e: *Mycobacterium simiae*
- 20 f: *Mycobacterium scrofulaceum*
- g: *Mycobacterium gordonae*
- h: *Mycobacterium szulgai*
- i: *Mycobacterium avium*
- j: *Mycobacterium intracellulare*
- 25 k: *Mycobacterium gastris*
- l: *Mycobacterium xenopi*
- m: *Mycobacterium nonchromogenicum*
- n: *Mycobacterium terrae*
- o: *Mycobacterium triviale*
- 30 p: *Mycobacterium fortuitum*
- q: *Mycobacterium chelonae*
- r: *Mycobacterium abscessus*
- s: *Mycobacterium peregrinum*

Figura 3-2

35 La Figura 3–2 muestra el listado de secuencias de ácidos nucleicos obtenidas mediante la purificación y el análisis del producto de PCR de la fracción, que fue la fracción obtenida mediante la electroforesis anterior del producto PCR usando la muestra de *Mycobacterium triviale* (o), y se determinó que la fracción era muy similar en cuanto al tamaño de la fracción amplificada a la banda positiva de la muestra derivada de *Mycobacterium tuberculosis*. La secuencia del producto de la PCR derivado de *Mycobacterium tuberculosis* de la fracción (b) se designa como la 1ª secuencia de nucleótidos, que se muestra en la parte superior del listado de secuencias a

40

modo comparativo. Además, la secuencia del producto de la PCR derivado de *Mycobacterium triviale* obtenido de la fracción (o) se designa como la 2ª secuencia de nucleótidos, y se muestra en la parte inferior de este listado de secuencias.

Fig 4

5 La Figura 4 muestra el resultado de la detección por PCR en tiempo real realizada en el Ejemplo 3, que es una curva de calibración obtenida representando el valor de Ct (eje y) frente al número de copias del genoma de cada muestra de ADN para la PCR (eje x, valor logarítmico).

Figura 5

10 La Figura 5 muestra el resultado de la electroforesis obtenida en el Ejemplo 4. En la Figura 5, el número de cada carril muestra los resultados obtenidos mediante el uso de las siguientes muestras, respectivamente.

M: Marcador de peso molecular

(1) Sin muestra

(2) *Mycobacterium tuberculosis* + *M. avium* + *M. intracellulare*+ *M. kansasii*

(3) *Mycobacterium tuberculosis*

15 (4) *M. avium* + *M. intracellulare* + *M. kansasii*

(5) *Mycobacterium tuberculosis* (10 copias) + *M. avium* + *M. intracellulare*+ *M. kansasii*

(6) *M. avium*

(7) *Mycobacterium tuberculosis* + *M. avium* + *M. kansasii*

20 La dirección de la migración electroforética se indica a la izquierda del patrón electroforético, y se muestra el orden de aparición de la fracción de cada producto amplificado. "TB" indica *M. tuberculosis*; "avium" indica *M. avium*; "intra" indica *M. intracellulare*; y "kansasii" indica *M. kansasii*.

Figura 6

25 La Figura 6 muestra el resultado de la detección por PCR en tiempo real realizada en el Ejemplo 5, que es una curva de calibración obtenida representando el valor de Ct (eje y) frente al número de copias del genoma de cada muestra de ADN para la PCR (eje x, valor logarítmico).

Mejor modo de llevar a cabo la invención

El gen IS6110 de *Mycobacterium tuberculosis* de la presente invención consiste en una secuencia de bases con una longitud completa de 885 pares de bases, cuya secuencia total de bases se encuentra descrita, por ejemplo, en el artículo publicado por el Instituto Pasteur, "Nucleic acid Res. 1990, 18(1): p.188" (documento no de patente 11).

30 El oligonucleótido de la presente invención incluye un oligonucleótido que comprende una parte o una secuencia completa de la secuencia de ácido nucleico descrita en la SEC ID N.º 2, la SEC ID N.º 4 o la SEC ID N.º 7, o una parte o una secuencia completa de la secuencia complementaria de la misma, en el que el oligonucleótido tiene una propiedad de hibridarse con la secuencia de ácido nucleico del gen IS6110 de *Mycobacterium tuberculosis* (denominado en lo sucesivo en el presente documento un oligonucleótido de la presente invención).

35 El oligonucleótido que comprende una parte o una secuencia completa de la secuencia de ácido nucleico descrita en la SEC ID N.º. 2, SEC ID N.º. 4 o SEC ID N.º. 7 de la presente invención incluye, por ejemplo, un oligonucleótido que comprende una secuencia de bases que comparte aproximadamente un 70 % o más, preferentemente aproximadamente un 80 % o más, más preferentemente aproximadamente un 90 % o más, y adicionalmente preferentemente aproximadamente un 95 % o más de homología con la secuencia de ácido nucleico descrita en la SEC ID N.º. 2, SEC ID N.º. 4 o SEC ID N.º. 7, o un oligonucleótido que comprende una parte o una secuencia completa de la secuencia de ácido nucleico descrita en la SEC ID N.º. 2, SEC ID N.º. 4 o SEC ID N.º. 7 del listado de secuencias, y que consiste en 10 o más bases, preferentemente 20 o más bases.

45 El oligonucleótido que comprende una parte o la secuencia completa de la secuencia complementaria de una parte o la secuencia completa de la secuencia de ácido nucleico descrita en la SEC ID N.º 1, SEC ID N.º 4 o SEC ID N.º 7 de la presente invención incluye, por ejemplo, un oligonucleótido que comprende una parte o una secuencia completa de la secuencia de ácido nucleico que tiene una propiedad de hibridarse con el oligonucleótido que comprende una parte o una secuencia completa de la secuencia de ácido nucleico descrita en la SEC ID N.º 1, SEC ID N.º 4 o SEC ID N.º 7 de la presente invención.

El oligonucleótido descrito anteriormente que comprende una parte o una secuencia completa de la secuencia de

ácido nucleico que tiene una propiedad de hibridarse con el oligonucleótido que comprende una parte o una secuencia completa de la secuencia de ácido nucleico descrita en la SEC ID N.º 1, SEC ID N.º 4 o SEC ID N.º 7 de la presente invención incluye, específicamente, un oligonucleótido que comprende una parte o una secuencia completa de la secuencia de ácido nucleico que tiene la propiedad de hibridarse en condiciones muy restrictivas o en condiciones restrictivas con el oligonucleótido que comprende una parte o una secuencia completa de la secuencia de ácido nucleico descrita en la SEC ID N.º 1, SEC ID N.º 4 o SEC ID N.º 7 de la presente invención.

A este respecto, las “condiciones muy restrictivas” significa una condición de la hibridación en formamida al 50 % a de 42 a 70 °C, preferentemente a de 60 a 70 °C, seguido de lavado con dodecilsulfato sódico al 0,1 % (SDS) a 25 a 70 °C en de 0,2 a 2 x SSC.

Además, “condiciones restrictivas” significa, específicamente, por ejemplo, una condición en la que la hibridación se realiza a de 50 a 70 °C durante 16 horas en la solución de hibridación de 6 x SSC o una concentración equivalente de una sal del mismo y el producto hibridado se lava con 1 x SSC o una concentración equivalente de una sal del mismo, si es necesario después del lavado preliminar con la solución de 6 x SSC o una concentración equivalente de una sal del mismo.

El oligonucleótido que tiene una propiedad de hibridar con la secuencia de ácido nucleico del gen IS6110 de *Mycobacterium tuberculosis* de la presente invención incluye un oligonucleótido que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene la propiedad de hibridarse en condiciones muy restrictivas o en condiciones restrictivas con la secuencia de ácido nucleico del gen IS6110 de *Mycobacterium tuberculosis* descrita anteriormente en el presente documento. Las condiciones muy restrictivas o las condiciones restrictivas son las descritas anteriormente en el presente documento.

El oligonucleótido de la presente invención puede ser ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN). En el ácido ribonucleico, el residuo de timidina (T) ha de estar sustituido de manera natural para que se lea como un residuo de uridina (U). El ADN puede ser ADN que contenga un residuo de uridina en el que la T de cualquier posición sea sustituida por U en la síntesis. El ARN puede ser ARN que contenga un residuo de timidina en el que la U de cualquier posición sea sustituida por T en la síntesis, también. Además, se pueden eliminar, insertar o sustituir uno o varios nucleótidos, o puede haber un nucleótido modificado, tal como inosina (I).

Para obtener el oligonucleótido de la presente invención, se puede usar el oligonucleótido preparado según la síntesis química conocida hecha pública. Por consiguiente, se puede obtener fácilmente el oligonucleótido de la misma calidad, en gran cantidad y a un bajo precio, en comparación con el procedimiento de clonación para obtener un oligonucleótido o un polinucleótido.

Por ejemplo, el oligonucleótido objetivo de la presente invención se puede obtener usando un sintetizador de ADN elaborado convencionalmente en la síntesis de ADN, sintetizando el oligonucleótido mediante el procedimiento convencional de la fosfoamidita y purificando mediante cromatografía en columna de intercambio aniónico.

El cebador para detectar *Mycobacterium tuberculosis* de la presente invención (denominado en lo sucesivo en el presente documento el cebador de la presente invención) incluye un cebador para detectar *Mycobacterium tuberculosis* que comprende el oligonucleótido que comprende una parte o una secuencia completa de la secuencia de ácido nucleico descrita en la SEC ID N.º 2 o I SEC ID N.º 4, o una parte o una secuencia completa de la secuencia complementaria de la misma, en el que el oligonucleótido que tiene la propiedad de hibridarse con la secuencia de ácido nucleico del gen IS6110 de *Mycobacterium tuberculosis*.

El ejemplo específico del oligonucleótido que comprende una parte o una secuencia completa de la secuencia de ácido nucleico descrita en la SEC ID N.º 1 o la SEC ID N.º 4, o una parte o una secuencia completa de la secuencia complementaria a la misma, en el que el oligonucleótido tiene la propiedad de hibridarse con la secuencia de ácido nucleico del gen IS6110 de *Mycobacterium tuberculosis* usado como el cebador de la presente invención es como se describe en la explicación del oligonucleótido de la presente invención descrito anteriormente en el presente documento.

Adicionalmente, el cebador de la presente invención se puede usar en una región apropiada y una longitud apropiada seleccionada entre el oligonucleótido que comprende una parte o una secuencia completa de la secuencia de ácido nucleico descrito en la SEC ID N.º 1 o la SEC ID N.º 4 o el oligonucleótido que comprende una parte o una secuencia completa de la secuencia complementaria a la misma, de acuerdo con las condiciones objetivo de hibridación del ácido nucleico y teniendo en cuenta la temperatura de disociación (valor de T_m). Preferentemente es una longitud de 10 o más bases, más preferentemente 20 o más bases, que se piensa que es un número de bases necesario para mantener la especificidad como la secuencia del cebador.

En un ejemplo de cebador de la presente invención para su uso en la PCR, por ejemplo, el cebador directo es, preferentemente, un oligonucleótido que comprende una parte o una secuencia completa de la secuencia de ácido nucleico descrita en la SEC ID N.º 2 o una parte o una secuencia completa de la secuencia complementaria de la misma; y el cebador inverso es preferentemente un oligonucleótido que comprende una parte o una secuencia completa de la secuencia de ácido nucleico descrita en SEC ID N.º. 4, o una parte o una secuencia completa de la secuencia complementaria a la misma.

Entre ellos, el cebador directo es, preferentemente, un oligonucleótido cuya secuencia de ácido nucleico se describe en SEC ID N.º 2, y el cebador inverso es, preferentemente, un oligonucleótido cuya secuencia de ácido nucleico se describe en SEC ID N.º 4.

5 Un procedimiento para obtener el cebador de la presente invención es como el que se ha descrito en el procedimiento para obtener el nucleótido de la presente invención.

El cebador de la presente invención puede estar marcado con una sustancia de marcaje.

Los ejemplos de la sustancia de marcaje usada para marcar el cebador de la presente invención con la sustancia de marcaje pueden ser cualquier sustancia de marcaje, tal como un radioisótopo, una enzima, una sustancia fluorescente, una sustancia luminiscente y una biotina.

10 Por ejemplo, el radioisótopo incluye ^{32}P , ^{33}P y ^{35}S ; la enzima incluye una fosfatasa alcalina, una peroxidasa de rábano picante, etc.; la sustancia fluorescente incluye una serie de colorantes de cianina, tales como Cy3 y Cy5 (Amersham Bioscience Inc.), una fluoresceína; y la sustancia luminiscente incluye reactivos quimioluminiscentes que incluyen un éster de acridinio.

15 Un procedimiento para marcar el cebador de la presente invención con el radioisótopo incluye un procedimiento para marcar el cebador mediante la incorporación de un nucleótido marcado con un radioisótopo en la síntesis del cebador, o un procedimiento para marcar con el radioisótopo después de la síntesis del cebador. Específicamente, el procedimiento incluye el procedimiento de uso habitual de cebador aleatorio, el procedimiento de traducción de muescas, un procedimiento de marcaje del extremo 5' usando la polinucleótido quinasa de T4, un procedimiento de marcaje del extremo 3' usando una desoxinucleotidil transferasa terminal y un procedimiento de marcaje de ARN.

20 En caso de marcar el cebador de la presente invención con una enzima, se puede usar un procedimiento de marcaje directo que es convencional en este campo, y el procedimiento incluye, por ejemplo, un procedimiento para unir una molécula enzimática, tal como fosfatasa alcalina y peroxidasa de rábano picante, con el cebador que se va a marcar directamente mediante enlace covalente.

25 En el caso de marcar el cebador con una sustancia fluorescente, por ejemplo, se puede incorporar en el cebador un nucleótido marcado con fluoresceína mediante el procedimiento de marcaje convencional en este campo. Se puede marcar el nucleótido con la sustancia fluorescente mediante un procedimiento para sustituir el nucleótido que tiene un brazo ligador como miembro en la secuencia del oligonucleótido (al que se hace referencia, por ejemplo, en el Documento no de patente 12). En este caso, también se puede usar un procedimiento en el que se sintetice químicamente uridina que tenga un brazo ligador en la posición 5 a partir de desoxiuridina mediante el procedimiento sintético revelado en el documento JP-A-60-500717 (Documento de patente 5) para introducir la sustancia de fluorescente en la cadena de oligonucleótido anteriormente descrita.

30 Un procedimiento para marcar el cebador con la sustancia luminiscente y un procedimiento para marcar el cebador con una biotina se pueden llevar a cabo mediante un procedimiento convencional para el marcaje de nucleótidos con una sustancia luminiscente o una biotina.

35 La sonda para detectar *Mycobacterium tuberculosis* de la presente invención (denominado en lo sucesivo en el presente documento la sonda de la presente invención) incluye una sonda que comprende un oligonucleótido que comprende una parte o una secuencia completa de la secuencia de ácido nucleico descrita en la SEC ID N.º 2, la SEC ID N.º 4 o la SEC ID N.º 7, o una parte o una secuencia completa de la secuencia complementaria de la misma, en el que el oligonucleótido que tiene la propiedad de hibridarse con la secuencia de ácido nucleico del gen IS6110 de *Mycobacterium tuberculosis* (el oligonucleótido de la presente invención).

40 El ejemplo específico de oligonucleótido de la presente invención usado en la sonda de la presente invención es como se ha descrito en la explicación del oligonucleótido de la presente invención descrito en lo que antecede en el presente documento.

45 La sonda de la presente invención se puede usar en una región apropiada y una longitud apropiada seleccionada entre el oligonucleótido que comprende una parte o una secuencia completa de la secuencia de ácido nucleico descrito en la SEC ID N.º 1 o la SEC ID N.º 4 y la SEC ID N.º 7 o el oligonucleótido que comprende una parte o una secuencia completa de la secuencia complementaria a la misma, de acuerdo con las condiciones objetivo de hibridación del ácido nucleico y calculando la temperatura de disociación (valor de T_m). No obstante, se hay suficiente especificidad para dar la sonda, preferentemente tiene una longitud de 10 o más bases, más preferentemente 20 o más bases, que se piensa que es un número necesario de bases para mantener la especificidad como la secuencia de la sonda.

50 Además, la secuencia de ácido nucleico descrita en SEC ID N.º 7 es una secuencia de ácido nucleico amplificada mediante PCR con el uso del cebador de la presente invención. Por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico descrita en la SEC ID N.º 7 es una secuencia amplificada mediante PCR con el uso del oligonucleótido de la secuencia de ácido nucleico descrita en SEC ID N.º 2 como cebador directo y el oligonucleótido de la secuencia de ácido nucleico descrita en SEC ID N.º 4 como cebador inverso.

55

Un procedimiento para obtener la sonda de la presente invención es como el que se ha descrito en el procedimiento para obtener el nucleótido de la presente invención.

La sonda de la presente invención puede estar marcada con una sustancia de marcaje.

5 Los ejemplos de la sustancia de marcaje usada para marcar la sonda de la presente invención con la sustancia de marcaje pueden ser cualquier sustancia de marcaje, tal como un radioisótopo, una enzima, una sustancia fluorescente, una sustancia luminiscente y una biotina.

Los ejemplos específicos de la sustancia de marcaje para marcar la sonda de la presente invención y un procedimiento para marcar la sonda son los mismos que se han descrito en la explicación del procedimiento para marcar el cebador de la presente invención.

10 Además, la sonda marcada usada en el procedimiento de detección por PCR en tiempo real descrita en el presente documento incluye la sonda de la presente invención marcada con una sustancia de marcaje usada convencionalmente en el procedimiento de detección en tiempo real. Por ejemplo, el oligonucleótido de la presente invención, en el que el extremo 5' está marcado con una sustancia fluorescente indicadora (carboxifluoresceína (FAM) , hexaclorofluoresceína (HEX), tetraclorofluoresceína (TET)) y el extremo 3' está marcado con un colorante inactivador (por ejemplo, una sustancia fluorescente, tal como carboxitetrametil-rodamina (TAMRA) , una sustancia no fluorescente, tal como pigmento inactivador Black Hole (BHQ) y ácido 4- ((4- (dimetilamino) fenil) azo) benzoico (DABCYL)).

20 Las muestras usadas para detectar *Mycobacterium tuberculosis* de la presente invención son diversas muestras clínicas, tales como esputo, sangre y aspirado transbronquial humanos. Además, como espécimen (muestra) se pueden usar células bacterianas aisladas y cultivadas, un ácido nucleico aislado y purificado de las mismas o un ácido nucleico amplificado mediante amplificación de ácidos nucleicos y un sistema de detección.

La extracción y purificación del ADN de las muestras anteriores se pueden realizar mediante el procedimiento convencional usado en la extracción de ADN de bacterias ácidas (bacilos de la tuberculosis).

25 Por ejemplo, cuando se usa una muestra de células bacterianas, se puede usar, por ejemplo, un procedimiento en el que las células bacterianas se tratan con un agente tensoactivo tal como SDS o una proteína desnaturizante, tal como tiocianato de guanidina (GTC), para descomponer la estructura de la membrana del bacilo de la tuberculosis, o un procedimiento de rotura física de las células bacterianas mediante el uso de perlas de vidrio.

30 Cuando se usa esputo como muestra, se puede realizar preferentemente la homogenización de la muestra por medio del procedimiento con (N-acetil-L-cisteína) -NaOH (NALC) (Documento no de patente 13) como tratamiento preliminar recomendado por los centros estadounidenses de control y prevención de enfermedades (abreviados como CDC).

35 Después se puede realizar la extracción y purificación del ADN usando el procedimiento de preparación habitual de ADN (extracción en fenol-cloroformo, procedimiento de precipitación en etanol, "Rapid and simple method for purification of nucleic acids", J. Clin. Microbiol., 1990, Mar:28(3), 495 - 503, Boom R., Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noordaa J).

40 A modo de ejemplo se explica un caso en el que, como muestra para detectar *Mycobacterium tuberculosis*, se usan células bacterianas cultivadas aisladas de la muestra y cultivadas. Tras recoger las colonias del medio de Ogawa, suspender la colonia en agua destilada esterilizada y luego recoger las células bacterianas mediante centrifugación. Las células bacterianas se vuelven a suspender en el agua destilada y se tratan en un autoclave. Las células bacterianas se rompen (por ejemplo, mediante rotura física usando perlas de vidrio) y se centrifugan para recoger el sobrenadante. El ADN se puede extraer del sobrenadante obtenido mediante purificación. Dado que diversos kits para la extracción y purificación de ADN se encuentran comercialmente disponibles, dichos kits se pueden usar o, como alternativa, se pueden aplicar los procedimientos convencionales (por ejemplo, procedimiento de extracción en fenol-cloroformo, procedimiento de precipitación con etanol, isopropanol, etc.). Por ejemplo, se puede usar el kit Genomic-tip (un kit para la extracción y purificación de ADN, tipo de resina de intercambio iónico, QIAGEN Inc.) para la extracción y purificación de ADN.

50 El procedimiento para detectar *Mycobacterium tuberculosis* de la presente invención incluye un procedimiento para detectar *Mycobacterium tuberculosis* que comprende usar un oligonucleótido que comprende una parte o una secuencia completa de la secuencia de ácido nucleico descrita en la SEC ID N.º 2 o I SEC ID N.º 4, o una parte o una secuencia completa de la secuencia complementaria de la misma, en el que el oligonucleótido que tiene la propiedad de hibridarse con la secuencia de ácido nucleico del gen IS6110 de *Mycobacterium tuberculosis*, como cebador o/y una sonda (un procedimiento que usa cebador y/o sonda de la presente invención).

55 Como es posible amplificar la secuencia de la región específica de la secuencia de ácido nucleico de IS6110 de *Mycobacterium tuberculosis* mediante la hibridación del ácido nucleico de la muestra con el cebador de la presente invención, y luego realizar la prolongación del cebador llevando a cabo la amplificación del ácido nucleico con ADN polimerasa (por ejemplo, PCR; Documento de patente 6), es posible detectar *Mycobacterium tuberculosis* midiendo

el producto de la extensión del cebador.

El ejemplo específico del procedimiento para detectar *Mycobacterium tuberculosis* de la presente invención usando el cebador de la presente invención incluye:

“Un procedimiento para detectar *Mycobacterium tuberculosis* caracterizado por comprender las siguientes etapas:

- 5 (1) realizar la PCR usando como cebador un oligonucleótido que comprende una parte o una secuencia completa de la secuencia de ácido nucleico descrita en la SEC ID N.º 2 o la SEC ID N.º 4, o una parte o una secuencia completa de la secuencia complementaria a la misma, en el que el oligonucleótido tiene la propiedad de hibridarse con la secuencia de ácido nucleico del gen IS6110 de *Mycobacterium tuberculosis*, y un ácido nucleico de una muestra como molde; y
- 10 (2) realizar la electroforesis del producto de extensión del cebador obtenido en el apartado (1) anterior y determinar la existencia de *Mycobacterium tuberculosis* según el resultado obtenido”.

El ejemplo específico del cebador de la presente invención usado en el procedimiento anterior es como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

- 15 Un ejemplo preferible de cebador directo es un oligonucleótido que comprende una parte o una secuencia completa de la secuencia de ácido nucleico descrita en la SEC ID N.º 2, o una parte o una secuencia completa de la secuencia complementaria a la misma, en el que el oligonucleótido tiene la propiedad de hibridarse con la secuencia de ácido nucleico del gen IS6110 de *Mycobacterium tuberculosis*, y el cebador inverso es un oligonucleótido que comprende una parte o una secuencia completa de la secuencia de ácido nucleico descrita en SEC ID N.º 4, o una parte o una secuencia completa de la secuencia complementaria a la misma, en el que el oligonucleótido tiene la propiedad de
- 20 hibridarse con la secuencia de ácido nucleico del gen IS6110 de *Mycobacterium tuberculosis*.

Las condiciones y los procedimientos operativos de la PCR en la que se usa el cebador anteriormente descrito y, la electroforesis realizada después pueden ser aquéllos conforme al procedimiento convencional en este campo.

- 25 El procedimiento para determinar la existencia de *Mycobacterium tuberculosis* a partir del resultado obtenido mediante la electroforesis incluye, por ejemplo, (a) un procedimiento para la detección mediante la confirmación de una fracción del producto de extensión del cebador que tiene el número de pares de bases deseado, (b) un procedimiento para la detección mediante hibridación usando la sonda marcada.

- 30 El procedimiento para realizar la detección mediante la confirmación de una fracción del producto de extensión del cebador que tiene el número de pares de bases deseado del apartado (a) anterior incluye, por ejemplo, un procedimiento de detección que comprende, tras realizar la PCR usando el oligonucleótido descrito en SEC ID N.º 2 como cebador directo y usando el oligonucleótido descrito en SEC ID N.º 4 como cebador inverso, realizar la electroforesis del cebador obtenido y determinar si la muestra es positiva mediante la confirmación de que contiene una fracción de 182 pares de bases.

- 35 El procedimiento de detección mediante hibridación con la sonda marcada del apartado (b) anterior incluye un procedimiento de detección que comprende, tras realizar la electroforesis, hibridar la fracción electroforética obtenida con la sonda marcada que es el oligonucleótido de la presente invención marcado con la sustancia de marcaje, detectar la sustancia de marcaje de la sonda marcada y determinar si la muestra es positiva mediante la confirmación de la existencia de una fracción hibridada con la sonda marcada.

- 40 Por ejemplo, cuando se realiza la PCR usando el oligonucleótido descrito en la SEC ID N.º 2 como cebador directo y el oligonucleótido descrito en SEC ID N.º 4 como cebador inverso, se puede realizar un procedimiento de detección que comprende, tras realizar la PCR, realizar una electroforesis, hibridar la fracción electroforética obtenida con la sonda marcada que es el oligonucleótido que comprende la secuencia de ácido nucleico descrita en SEC ID N.º 7 y que está marcado con una sustancia de marcaje, detectar la sustancia de marcaje de la sonda marcada y determinar si la muestra es positiva mediante la confirmación de la existencia de una fracción hibridada con la sonda marcada.

- 45 Una realización del procedimiento para detectar *Mycobacterium tuberculosis* de la presente invención se explicará con detalle a continuación en el presente documento. Este es un caso de detectar mediante la confirmación de una fracción del producto de extensión del cebador que tiene un número de pares de bases objetivo en la fracción electroforética obtenida después de realizar la PCR usando el oligonucleótido descrito en la SEC ID N.º 2 como cebador directo y el oligonucleótido descrito en la SEC ID N.º 4 como cebador inverso y electroforesis.

- 50 En primer lugar, según el procedimiento descrito anteriormente en el presente documento, se obtiene una muestra de ADN purificado de la muestra en la que se va a detectar *Mycobacterium tuberculosis*. Por separado, se sintetizan un oligonucleótido que tenga la secuencia descrita en SEC ID N.º 2 (denominado en lo sucesivo en el presente documento IS_F6) y un oligonucleótido que tenga la secuencia descrita en SEC ID N.º 4 (denominado en lo sucesivo en el presente documento IS_R6) que se seleccionan del nucleótido de la presente invención mediante el
- 55 procedimiento de fosfoamidita usando un sintetizador de ADN según el procedimiento descrito anteriormente en el

presente documento.

Como solución de reacción para la PCR, se preparan 10 mM de solución de tampón Tris-HCl (pH 8,9) que contiene de 0,2 a 2,0 μ M cada uno de IS_F6 e IS_R6, de 1,0 a 4,0 mM de $MgCl_2$, 80 mM de KCl, 500 μ g/ml de BSA, 0,1 % de colato de sodio, de 0,005 a 0,2 % de Triton X-100 (polioxietilenoetilfeniléter, nombre comercial, Rohm and Haas Co.), de 0,1 a 0,6 mM de cada uno de dATP, dCTP, dGTP y dTTP, y de 10 a 80 unidades/ml de Taq ADN polimerasa.

Se usa una solución obtenida añadiendo 1 ng de la muestra de ADN purificada a la solución de reacción para la PCR como muestra para la PCR y se realizan de 20 a 40 ciclos de PCR con termociclador de ADN. Los 5 μ l de la solución de reacción obtenida mediante PCR se someten a electroforesis usando gel de agarosa al 1,5 %. Posteriormente, tras el tratamiento con tinción de bromuro de etidio, se detecta la fluorescencia inducida por radiación ultravioleta. Simultáneamente, se somete a electroforesis el marcador del peso molecular junto con la solución de reacción, y se calcula la longitud del fragmento de ADN detectado comparando con la velocidad de migración relativa. Se predice el fragmento de ADN de 182 pares de bases (SEC ID N.º 7) de la secuencia de ácido nucleico de IS6110 para su amplificación como resultado de la PCR usando IS_F6 como cebador directo e IS_R6 como cebador inverso. Por consiguiente, se puede determinar como positiva una muestra en la que se confirma la banda fluorescente correspondiente a 182 pares de bases.

Otra realización del procedimiento de detección de *Mycobacterium tuberculosis* que usa el oligonucleótido de la presente invención como cebador se muestra a continuación. Es decir, la PCR se realiza usando el cebador marcado que es el oligonucleótido marcado de la presente invención mediante el procedimiento de marcaje descrito anteriormente en el presente documento, y usando el ácido nucleico de la muestra como molde, y se mide la cantidad de sustancia de marcaje del producto obtenido de la extensión del cebador. Cuando se puede detectar la sustancia de marcaje, se determina la muestra como positiva en *Mycobacterium tuberculosis*.

En el procedimiento anterior, tras realizar la PCR, se retira el cebador marcado libre y se mide la cantidad de sustancia de marcaje del producto de extensión del cebador. Cuando se puede detectar la sustancia de marcaje, se determina la muestra como positiva en *Mycobacterium tuberculosis*.

Un procedimiento para retirar el cebador marcado libre incluye, por ejemplo, el siguiente procedimiento: es decir, se hace precipitar el producto de extensión del cebador en la mezcla de reacción obtenido mediante la reacción PCR con el procedimiento convencional para precipitar ácido nucleico (procedimiento de precipitación con etanol, procedimiento de precipitación usando isopropanol, etc.) y luego se retira el sobrenadante que contiene el cebador marcado libre no precipitado.

Adicionalmente, cabe mencionar un procedimiento para la separación del producto de extensión del cebador y el cebador marcado libre tratando el producto de reacción obtenido mediante la reacción PCR con una cromatografía sobre gel en condiciones apropiadas, y también un procedimiento de separación mediante electroforesis.

En el procedimiento para detectar *Mycobacterium tuberculosis* de la presente invención, también se puede realizar un sistema de detección mediante amplificación en tiempo real (al que se hace referencia en la descripción de, por ejemplo, el documento de patente 7 y el documento de patente 8).

Como ejemplo del sistema de detección por medio del sistema de detección mediante amplificación en tiempo real, cabe mencionar, por ejemplo, el sistema de detección por PCR en tiempo real.

Se pueden usar diversos procedimientos de detección por PCR en tiempo real para el procedimiento de detección de *Mycobacterium tuberculosis* de la presente invención, por ejemplo el procedimiento de PCR en tiempo real TaqMan™ (al que se hace referencia, por ejemplo, en la descripción del documento de patente 8), el procedimiento de sistema de sondas MGB Eclipse (al que se hace referencia, por ejemplo, en la descripción del Documento de patente 9), el procedimiento de tecnología de sondas de Molecular Beacons (al que se hace referencia, por ejemplo, en la descripción del documento de patente 10), el procedimiento de cebadores fluorogénicos LUX (Invitrogen Corporation) y el procedimiento de PCR mediante sonda de inactivación (QP) (al que se hace referencia, por ejemplo, en la descripción del documento de patente 11)

Más específicamente, la cantidad de restos de ADN deseada se puede detectar cuantitativamente y con alta sensibilidad por medio del procedimiento de PCR en tiempo real TagMan™ usando la sonda marcada con FAM en el extremo 5' y TAMRA en el extremo 3' (al que se hace referencia por ejemplo, en la descripción del documento de patente

A saber, el procedimiento comprende realizar la PCR usando el ácido nucleico en la muestra como molde y usando un oligonucleótido que comprende una parte o una secuencia completa de la secuencia de ácido nucleico descrita en la SEC ID N.º 2 o la SEC ID N.º 4 o una parte o una secuencia completa de la secuencia complementaria de la misma, en el que el oligonucleótido tiene una propiedad de hibridar con la secuencia de ácido nucleico de IS6110 en *Mycobacterium tuberculosis* como cebador (el cebador de la presente invención), y usado un oligonucleótido que comprende una parte o una secuencia completa de la secuencia de ácido nucleico descrita en la SEC ID N.º 2, o la SEC ID N.º 4, la SEC ID N.º 7, una parte o una secuencia completa de la secuencia complementaria de la misma, en

el que el oligonucleótido tiene una propiedad de hibridar con la secuencia de ácido nucleico del gen IS6110 en *Mycobacterium tuberculosis* (el oligonucleótido de la presente invención), en el que el extremo 5' está marcado con un colorante fluorescente indicador y el extremo 3' está marcado con un colorante inactivador como la sonda marcada, de modo que se detecta la sustancia de marcaje liberada de la sonda marcada.

5 El principio del procedimiento anterior de PCR en tiempo real TagMan™ es el siguiente. Se usa una sonda oligonucleotídica marcada con colorante fluorescente (indicador) en el extremo 5' y colorante inactivador en el extremo 3' y que tiene la propiedad de hibridar con una región específica del gen objetivo. En la sonda, el colorante indicador suprime la fluorescencia emitida desde el indicador en las condiciones habituales. La PCR se realiza usando la ADN polimerasa de Taq del exterior con la condición de que la sonda marcada fluorescentemente esté completamente hibridada con el gen objetivo. Como resultado de la progresión de la reacción de extensión mediante la acción de la ADN polimerasa de Taq, se hidroliza la sonda marcada fluorescentemente desde el extremo 5' mediante la acción de la actividad exonucleasa, y luego se libera el colorante indicador para generar fluorescencia. En el procedimiento de PCR en tiempo real, se puede cuantificar con exactitud la cantidad inicial de molde de ADN mediante el control de la intensidad de la fluorescencia en tiempo real.

15 La sonda marcada con colorante fluorescente (indicador) en el extremo 5' y colorante inactivador en el extremo 3' usada en el sistema de detección mediante PCR en tiempo real de la presente invención puede ser la sonda de la presente invención descrita anteriormente en el presente documento, o se puede diseñar una sonda según la secuencia de tal sonda. Por ejemplo, se puede usar la secuencia descrita en la SEC ID N.º 11 diseñada según la secuencia de SEC ID N.º 6. La sustancia fluorescente indicadora que se usa para marcar el extremo 5' incluye FAM, HEX, TET, y, entre ellos, se prefiere FAM. El colorante inactivador que se usa para marcar el extremo 3' incluye una sustancia fluorescente tal como TAMRA y una sustancia no fluorescente, tal como BHQ y DAVCYL, y entre ellas, se prefiere TAMPA.

25 El ejemplo preferible del cebador directo usado en el sistema de detección de PCR en tiempo real de la presente invención incluye un oligonucleótido que comprende una parte o una secuencia completa de la secuencia de ácido nucleico descrita en la SEC ID N.º 2, o parte o una secuencia completa de la secuencia complementaria a la misma, en el que el oligonucleótido tiene la propiedad de hibridar con la secuencia de ácido nucleico del gen IS6110 de *Mycobacterium tuberculosis*. El ejemplo preferible del cebador inverso incluye un oligonucleótido que comprende una parte o una secuencia completa de la secuencia de ácido nucleico descrita en la SEC ID N.º 4, o parte o una secuencia completa de la secuencia complementaria a la misma, en el que el oligonucleótido tiene la propiedad de hibridar con la secuencia de ácido nucleico del gen IS6110 de *Mycobacterium tuberculosis*.

Otros reactivos usados en el sistema de detección de PCR en tiempo real, tales como desoxirribonucleósido trifosfato (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) y ADN polimerasa, pueden ser uno convencionalmente usado en la PCR en tiempo real y es posible realizar un procedimiento de PCR en tiempo real según el protocolo común de PCR en tiempo real, con la excepción de usar el cebador y la sonda de la presente invención.

35 A continuación se explicará un ejemplo ilustrativo del procedimiento para detectar *Mycobacterium tuberculosis* conforme al sistema de detección de PCR en tiempo real (procedimiento PCR en tiempo real TagMan™) de la presente invención.

De acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente en el presente documento, se obtiene una muestra de ADN purificado de la muestra en la que se va a detectar *Mycobacterium tuberculosis*.

40 La secuencia que se utiliza como sonda (SEC ID N.º 11) se diseña a partir de la secuencia oligonucleotídica de SEC ID N.º 6, que se amplificará mediante PCR usando IS_F5 e IS_R5 como cebador, y se sintetiza el oligonucleótido que tenga esta secuencia. Tras ello, se une el colorante indicador FAM al extremo 5' del oligonucleótido y el inactivador indicador TAMRA se une al extremo 3' del oligonucleótido mediante procedimientos convencionales para obtener la sonda marcada fluorescentemente.

45 La PCR en tiempo real se realiza usando, por ejemplo, IS_F5 preparado anteriormente en el presente documento como cebador directo e IS_R5 como cebador inverso de la siguiente manera.

50 Concretamente, se prepara como solución de reacción 10mM de solución tamponadora Tris-HCl (pH 8,9) que contiene 1 µM de cada cebador IS_F5 e IS_R5; de 100 a 1000 nM de sonda marcada fluorescentemente, de 1,0 a 4,0 mM de MgCl₂; 80mM de KCl; 500 µg/ml de BSA; 0,1% de colato de sodio, de 0,005 A 0,2 % de Triton X-100; 0,2 mM de cada uno de dATP, dCTP, dGTP y dTTP, y de 10 a 80 unidades/ml de ADN polimerasa de Taq. Una solución obtenida mediante la adición de 1 ng de la muestra de ADN purificada a 20 µl de la solución de reacción se usa como muestra para la PCR. La muestra para la PCR se añade a la placa de reacción de 96 pocillos y se realiza la PCR en tiempo real usando el detector de PCR en tiempo real especificado en la PCR TagMan™. Se repite la reacción durante de 30 a 50 ciclos y se mide la fluorescencia generada por el colorante indicador en cada ciclo.

55 En la determinación de *Mycobacterium tuberculosis*, cuando se mide la fluorescencia generada por el colorante indicador, es posible determinar la muestra como positiva en *Mycobacterium tuberculosis*.

Dado que es posible preparar una curva de calibración en el procedimiento de PCR en tiempo real, se puede

obtener un número de ADN genómico de *Mycobacterium tuberculosis* de la muestra (número de copias). Adicionalmente, dado que el número es proporcional a un número de *Mycobacterium tuberculosis*, se puede obtener un número de *Mycobacterium tuberculosis* en la muestra. La curva de calibración se puede preparar conforme al procedimiento convencional en el procedimiento de PCR en tiempo real. Por ejemplo, con la muestra de ADN genómico de *Mycobacterium tuberculosis* que tiene un número de copias conocido, se prepara como patrón una muestra de ADN para la PCR con la concentración (número de copias) de las series de dilución. Posteriormente, se realiza la PCR en tiempo real conforme al procedimiento descrito anteriormente usando la muestra de ADN para PCR en cada serie de dilución, y se mide el valor de fluorescencia generada por el colorante indicador. Para preparar una curva de amplificación se representa el valor medido de fluorescencia (Rn, eje y) frente a cada número de ciclo de la PCR (eje x) en cada muestra de ADN para la PCR de cada serie de dilución. Posteriormente, se selecciona la región Rn en la que el valor de la fluorescencia se amplifica exponencialmente y se traza una línea umbral (Th). Se establece como ciclo umbral (Ct) el punto de cruce de Th con cada curva de amplificación de cada muestra de ADN para la PCR. Posteriormente, se representa el valor de Ct (eje y) frente al logaritmo del número de copias de cada muestra de ADN usada para la PCR (eje x) y se puede usar la curva aproximada obtenida a cada Ct como curva de calibración.

Para determinar cuantitativamente el número de ADN genómico (número de copias) de *Mycobacterium tuberculosis* en el espécimen (muestra), en primer lugar se aísla el ADN y se purifica del espécimen en el que se va a detectar *Mycobacterium tuberculosis*, y después se realiza PCR en tiempo real sobre la muestra de ADN obtenida, y se prepara una curva de amplificación mediante el mismo procedimiento como se ha mostrado anteriormente en el presente documento. Se obtiene el valor de Ct que cruza el Th obtenido a partir de la curva de calibración con la curva de amplificación obtenida anteriormente. Se aplica tal valor de Ct a la curva de calibración para obtener una cantidad de ADN genómico de *Mycobacterium tuberculosis* en el espécimen (número de copias de la muestra).

Adicionalmente, se puede aplicar el procedimiento de detección utilizando el producto de la transcripción del ARN al procedimiento de amplificación de ácido nucleico de la presente invención. Por ejemplo, se pueden usar el procedimiento NASBA (amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos) (documento de patente 12) y el procedimiento 3SR (replicación de secuencia autosostenida) (documento de patente 13). Entre ellos, la amplificación de ácidos nucleicos a temperatura constante que utiliza la reacción concertada de la transcriptasa inversa y la ARN polimerasa es adecuada para el sistema de medición automático (la reacción se realiza en condiciones de reacción concertada con transcriptasa inversa y ARN polimerasa).

Adicionalmente, el procedimiento para detectar *Mycobacterium tuberculosis* de la presente invención incluye un procedimiento que comprende usar un oligonucleótido marcado con una sustancia de marcaje que comprende una parte o una secuencia completa de la secuencia de ácido nucleico descrita en la SEC ID N.º 2, la SEC ID N.º 4 o la SEC ID N.º 7, o una parte o una secuencia completa de la secuencia complementaria a la misma, en el que oligonucleótido tiene la propiedad de hibridar con la secuencia de ácido nucleico del gen IS6110 de *Mycobacterium tuberculosis* (el oligonucleótido de la presente invención) como sonda marcada, hibridar la sonda marcada con el ácido nucleico de la muestra, retirar la sonda marcada libre y detectar la sustancia de marcaje del complejo hibridado.

Específicamente, por ejemplo, cabe mencionar (a) un procedimiento de detección en el que el oligonucleótido de la presente invención se une a un vehículo sólido para usarlo como sonda de captura, que hibrida con el ácido nucleico de la muestra, de modo que el ácido nucleico derivado de *Mycobacterium tuberculosis* en la muestra se inmoviliza sobre la fase sólida (por ejemplo, consúltese la descripción del documento de patente 15); y (b) un procedimiento para realizar un análisis de tipo sándwich en el que con el uso de la sonda de captura del apartado (a) anterior y la sonda marcada de la presente invención, el ácido nucleico de la muestra se hibrida con la misma para formar un complejo de sonda de captura, el ácido nucleico derivado de *Mycobacterium tuberculosis* y la sonda marcada sobre el vehículo sólido, para medir el marcaje de la sonda marcada (por ejemplo, consúltese la descripción del Documento de patente 14). Además, también se puede usar (c), un procedimiento en el que tras la hibridación del ácido nucleico de la muestra con la sonda marcada de la presente invención marcada con una biotina, se captura el ácido nucleico de la muestra mediante un vehículo unido a avidina.

Como reactivos usados para el procedimiento para detectar *Mycobacterium tuberculosis* de la presente invención, se pueden usar los reactivos usados convencionalmente en este campo, por ejemplo agentes estabilizadores, tales como agentes de tamponamiento y conservantes que no inhiban la estabilidad de los reactivos coexistentes y que no inhiben la reacción de PCR ni de hibridación. Adicionalmente, su concentración se puede seleccionar preferentemente del intervalo de concentraciones usado convencionalmente en este campo.

El ejemplo específico de solución tamponadora incluye todas las soluciones tamponadoras usadas en la realización de la reacción PCR y de hibridación convencionales, y son, por ejemplo, tampón Tris, tampón fosfato, tampón de veronal, tampón borato y tampón de Good, y su pH no está particularmente limitado y está, preferentemente en un intervalo de pH de 5 a 9 en general.

Además, si es necesario, se pueden usar polimerasa de ácido nucleico (ADN polimerasa, ARN polimerasa, transcriptasa inversa), sustratos de las correspondientes a enzimas (dNTP, rNTP), agentes de intercalación en la doble cadena (bromuro de etidio, verde SYBR™) o sustancias de detección mediante marcaje, tales como FAM y

TAMRA.

5 El ejemplo de un kit para detectar *Mycobacterium tuberculosis* de la presente invención incluye “un kit para detectar *Mycobacterium tuberculosis* que comprende usar un oligonucleótido que comprende una parte o una secuencia completa de la secuencia de ácido nucleico descrita en la SEC ID N.º 2 o la SEC ID N.º 4, o una parte o una secuencia completa de la secuencia complementaria de la misma, en el que el oligonucleótido que tiene la propiedad de hibridar con la secuencia de ácido nucleico del gen IS6110 de *Mycobacterium tuberculosis*, como cebador o (el cebador de la presente invención)”. El cebador se puede marcar con una sustancia de marcaje.

El kit anteriormente mencionado puede comprender el oligonucleótido de la presente invención marcado con una sustancia de marcaje como una sonda marcada.

10 Además, el kit mencionado en lo que antecede incluye “un kit que comprende como reactivos constituyentes: (1) un cebador directo que es un oligonucleótido que comprende una parte o una secuencia completa de la secuencia de ácido nucleico descrita en la SEC ID N.º 2, o una parte o una secuencia completa de la secuencia complementaria a la misma, en el que el oligonucleótido tiene la propiedad de hibridarse con la secuencia de ácido nucleico del gen IS6110 de *Mycobacterium tuberculosis*, y (2) un cebador inverso que es un oligonucleótido que comprende una parte o una secuencia completa de la secuencia de ácido nucleico descrita en la SEC ID N.º 3, o la SEC ID N.º 4, o una parte o una secuencia completa de la secuencia complementaria a la misma, en el que el oligonucleótido tiene la propiedad de hibridarse con la secuencia de ácido nucleico del gen IS6110 de *Mycobacterium tuberculosis*.”

El kit anterior puede comprender adicionalmente el oligonucleótido de la presente invención marcado con una sustancia de marcaje como una sonda marcada.

20 Además, el kit anterior incluye “un kit para detectar *Mycobacterium tuberculosis* que comprende el oligonucleótido de la presente invención como sonda”. La sonda se puede marcar con una sustancia de marcaje.

Las realizaciones preferibles y los ejemplos específicos de los reactivos que constituyen estos kits son como se han descrito anteriormente en el presente documento.

25 Además, el kit de reactivos para detectar *Mycobacterium tuberculosis* de la presente invención puede contener, por ejemplo, agentes estabilizadores, tales como agentes de tamponamiento y conservantes que no inhiban la estabilidad de los reactivos coexistentes y que no inhiban la reacción PCR ni la hibridación. Su concentración se puede seleccionar preferentemente del intervalo de concentraciones usado convencionalmente en este campo.

30 El ejemplo específico de solución tamponadora incluye todas las soluciones tamponadoras usadas en la realización de la reacción PCR y de hibridación convencionales, y son, por ejemplo, tampón Tris, tampón fosfato, tampón de veronal, tampón borato y tampón de Good, y su pH no está particularmente limitado y está, preferentemente en un intervalo de pH de 5 a 9 en general.

35 Además, si es necesario, puede contener polimerasa de ácido nucleico (ADN polimerasa, ARN polimerasa, transcriptasa inversa), sustratos de las correspondientes a enzimas (dNTP, rNTP), agentes de intercalación en la doble cadena (bromuro de etidio, verde SYBR™) o sustancias de detección mediante marcaje, tales como FAM y TAMRA.

A continuación, la presente invención se explica más detalladamente.

Los ejemplos no cubiertos por el alcance de las reivindicaciones son para fines ilustrativos.

Ejemplos

Ejemplo 1

40 (1) Síntesis del cebador para PCR para detectar *Mycobacterium tuberculosis*

Se sintetizaron un oligonucleótido que tenía una secuencia descrita en la SEC ID N.º 2 (ACCTCACCTATGTGTCGACC, denominada en lo sucesivo en el presente documento IS_F6) y un oligonucleótido que tenía una secuencia descrita en la SEC ID N.º 4 (AACGTCTTTCAGGTCGAGTACG, denominada en lo sucesivo en el presente documento IS_R6) conforme al procedimiento de la fosfoamidita usando el sintetizador de ADN de ABI Tipo 392. La síntesis se realizó conforme al procedimiento descrito en el manual de ABI Inc. y se realizó la desprotección de cada tipo de oligonucleótido mediante el procedimiento de calentamiento de una solución de amoniaco del oligonucleótido a 55 °C durante la noche. Posteriormente, se purificaron los oligonucleótidos sintetizados usando cromatografía en columna de intercambio aniónico con HFPLC de Pharmacia Corp.

(2) Preparación de muestras

50 Con las bacterias mostradas a continuación en el presente documento, se extrajo el ADN y se purificó mediante los siguientes procedimientos para obtener muestras de ADN. Todas las bacterias eran aislados clínicos y sus especies ya se habían diferenciado tras su cultivo en forma de colonias, las pruebas bioquímicas convencionales, etc.

Respecto a las bacterias pertenecientes al género *Mycobacterium*, las colonias en medio de Ogawa se suspendieron en agua purificada, se introdujeron en un autoclave (a 120 °C durante 20 minutos a 2 presiones atmosféricas) , después, se rompieron las células bacterianas (mediante rotura física con perlas de vidrio de 2 mm de diámetro) y se centrifugaron para obtener un sobrenadante. La extracción y purificación del ADN del sobrenadante obtenido se realizaron usando Genomic-tip (un kit para la extracción y purificación de ADN, tipo de resina de intercambio iónico, QIAGEN Inc.). Con respecto a *Escherichia coli*, el ADN se extrajo y se purificó conforme al procedimiento de extracción de ADN convencional para *Escherichia coli*.

El ADN purificado obtenido de este modo se preparó de modo que se obtuviera una concentración final de 1 ng/μl (tampón Tris-HCl 10mM, pH 8,9) y se usó como muestra de ADN.

- 10 a: *Escherichia coli*
- b: *Mycobacterium tuberculosis*
- c: *Mycobacterium kansasii*
- d: *Mycobacterium marinum*
- e: *Mycobacterium simiae*
- 15 f: *Mycobacterium scrofulaceum*
- g: *Mycobacterium gordonae*
- h: *Mycobacterium szulgai*
- i: *Mycobacterium avium*
- j: *Mycobacterium intracellulare*
- 20 k: *Mycobacterium gastri*
- l: *Mycobacterium xenopi*
- m: *Mycobacterium nonchromogenicum*
- n: *Mycobacterium terrae*
- o: *Mycobacterium triviale*
- 25 p: *Mycobacterium fortuitum*
- q: *Mycobacterium chelonae*
- r: *Mycobacterium abscessus*
- s: *Mycobacterium peregrinum*

(3) PCR

30 Se usó el IS_F6 preparado en el apartado (1) anterior como cebador directo y el IS_R6 preparado en el apartado (1) anterior se usó como cebador inverso, y la PCR se realizó de la siguiente manera.

En primer lugar se preparó como solución de reacción para la PCR 10 mM de Tris-HCl (pH 8,9) que contiene 1 μM de cada uno del cebador IS_F6 y del cebador IS_R6, 1,5 mM de MgCl₂, 80 mM de KCl, 500 μg/ml de BSA, 0,1 % de colato de sodio, 0,1 % de Triton X-100 (polioxietilenoetilfeniléter, nombre comercial, Rohm and Haas Co.), 0,2 de cada uno de dATP, dCTP, dGTP y dTTP, y 40 unidades/ml de Taq ADN polimerasa (Nippon Gene Co. Ltd.).

35 Como muestra para la PCR se usó una solución obtenida añadiendo 1 ng de la muestra de ADN a 20 μl de la solución de reacción para PCR y se realizaron 30 ciclos de PCR con el termociclador de ADN (DNA Engine PTC200) de M.J. Research en las siguientes condiciones de reacción.

Condiciones de la reacción de PCR:

- 40 Desnaturalización térmica: 94 °C, 0,5 minutos
- Hibridación: 55 °C, 1 minuto
- Reacción de polimerización: 75 °C, 0,5 minutos

(4) Detección

Los 5 µl de la solución de reacción obtenida mediante PCR en el apartado (3) anterior se sometieron a electroforesis usando gel de agarosa al 1,5%. Las condiciones eléctricas de la electroforesis fueron de un voltaje constante de 100 V durante 30 minutos. El procedimiento operativo y otras condiciones se realizaron conforme al procedimiento de uso general descrito en "Bio-Experiments Illustrated", Vol. 2, p. 53-63 (de Nakayama Hiroki, Shujunsha Co. Ltd.). Posteriormente, después del tratamiento con tinción de bromuro de etidio se detectó la fluorescencia inducida por radiación ultravioleta usando el dispositivo de obtención de imágenes de muestras por UV, el sistema FAS-III (Toyobo Co. Ltd.). Simultáneamente, se sometió a electroforesis el marcador del peso molecular junto con la solución de reacción, y se calcula la longitud de la fracción de ADN detectado comparando estas velocidades de migración relativas. La fracción digerida con X 174/HaeIII (marcador 4, Nippon Gene Co. Ltd) se usó como marcador del peso molecular.

(5) Resultados

Los resultados obtenidos de este modo mediante electroforesis se muestran en la Figura 1.

En la Figura 1, el número de cada carril muestra los resultados obtenidos mediante el uso de las siguientes muestras, respectivamente.

M4: marcador del peso molecular (marcador 4)

a: *Escherichia coli*

b: *Mycobacterium tuberculosis*

c: *Mycobacterium kansasii*

20 d: *Mycobacterium marinum*

e: *Mycobacterium simiae*

f: *Mycobacterium scrofulaceum*

g: *Mycobacterium gordonae*

h: *Mycobacterium szulgai*

25 i: *Mycobacterium avium*

j: *Mycobacterium intracellulare*

k: *Mycobacterium gastris*

l: *Mycobacterium xenopi*

m: *Mycobacterium nonchromogenicum*

30 n: *Mycobacterium terrae*

o: *Mycobacterium triviale*

p: *Mycobacterium fortuitum*

q: *Mycobacterium chelonae*

r: *Mycobacterium abscessus*

35 s: *Mycobacterium peregrinum*

Se predijo el fragmento de ADN de 182 pares de bases (SEC ID N.º 7) de la secuencia de ácido nucleico de IS6110 para su amplificación como el resultado de la PCR usando IS_F6 como cebador directo e IS_R6 como cebador inverso. Por consiguiente, se determinó como positiva una muestra en la que se confirmó la banda fluorescente correspondiente a 182 pares de bases.

40 Como resulta evidente a partir de los resultados de la Figura 1, como resultado de realizar la PCR usando el cebador IS_F6 y el cebador IS_R6 de la presente invención, solo cuando se usó *Mycobacterium tuberculosis* como la muestra (b) se pudo confirmar una banda fluorescente de 182 pares de bases y se determinó que la muestra era positiva. Por el contrario, cuando se usaron otras especies bacterianas del género *Mycobacterium* y una bacteria de otro género, *Escherichia coli*, como las muestras (a y c a s), no se pudo confirmar la correspondiente banda fluorescente, y, por consiguiente, se determinó que estas muestras determinadas eran negativas.

5 A partir de los resultados anteriores, se entiende que es posible detectar específicamente *Mycobacterium tuberculosis* mediante el uso del oligonucleótido de la presente invención como cebador en la PCR. Además, dado que se puede esperar una detección de alta sensibilidad mediante el procedimiento de amplificación de ácidos nucleicos, tal como la PCR, no es necesario realizar un procedimiento de aislamiento de las bacterias y se pueden usar especímenes clínicos directamente para la detección. Por consiguiente, la detección de *Mycobacterium tuberculosis*, que requiere varias semanas de cultivo en el procedimiento de detección convencional tras el cultivo de las bacterias, se puede completar en un día como máximo.

Ejemplo 2

(1) Síntesis del cebador para PCR para detectar *Mycobacterium tuberculosis*

10 Un oligonucleótido que tenía la secuencia descrita en la SEC ID N.º 1 (TGGGTAGCAGACCTCACCTAT, en lo sucesivo en el presente documento, denominado IS_F5) y un oligonucleótido que tenía la secuencia descrita en la SEC ID N.º 3 (CGAGTACGCTTTCTTGTTGG, en lo sucesivo en el presente documento, denominado IS_R5) se sintetizaron mediante el mismo procedimiento del Ejemplo 1 usando el mismo equipo del Ejemplo 1.

(2) Preparación de muestras

15 Se usaron las muestras de ADN obtenidas en el Ejemplo 1 (2).

(3) PCR

Se usó el IS_F5 preparado en el apartado (1) anterior como cebador directo y el IS_R5 preparado en el apartado (1) anterior se usó como cebador inverso, y la PCR se realizó como se describe a continuación en el presente documento.

20 En primer lugar se preparó como solución de reacción 10 mM de Tris-HCl (pH 8,9) que contiene 1 µM de cada uno del cebador IS_F5 y del cebador IS_R5, 1,5 mM de MgCl₂, 80 mM de KCl, 500 µg/ml de BSA, 0,1 % de colato de sodio, 0,1 % de Triton X-100, 0,2 de cada uno de dATP, dCTP, dGTP y dTTP, y 40 unidades/ml de Taq ADN polimerasa (Nippon Gene Co. Ltd.).

25 Como muestra para la PCR se usó una solución obtenida mediante la adición de 1 ng de muestra de ADN a 20 µl de la solución de reacción para PCR, y se realizó la PCR mediante el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1 (3), usando el mismo equipo del Ejemplo 1 (3) en las mismas condiciones de reacción.

(4) Detección

La detección se realizó mediante el mismo procedimiento del Ejemplo 1 (4), es decir, electroforesis con agarosa al 1,5 %, tinción con bromuro de etidio y detección de fluorescencia inducida por ultravioleta.

30 (5) Resultados

Los resultados obtenidos de este modo mediante electroforesis se muestran en la Figura 2.

En la Figura 2, el número de cada carril muestra los resultados obtenidos mediante el uso de las siguientes muestras, respectivamente.

M4: marcador del peso molecular (marcador 4)

35 a: *Escherichia coli*

b: *Mycobacterium tuberculosis*

c: *Mycobacterium kansasii*

d: *Mycobacterium marinum*

e: *Mycobacterium simiae*

40 f: *Mycobacterium scrofulaceum*

g: *Mycobacterium gordonae*

h: *Mycobacterium szulgai*

i: *Mycobacterium avium*

j: *Mycobacterium intracellulare*

45 k: *Mycobacterium gastris*

l: *Mycobacterium xenopi*

m: *Mycobacterium nonchromogenicum*

n: *Mycobacterium terrae*

o: *Mycobacterium triviale*

5 p: *Mycobacterium fortuitum*

q: *Mycobacterium chelonae*

r: *Mycobacterium abscessus*

s: *Mycobacterium peregrinum*

10 Según los resultados de la PCR usando el cebador directo IS_F5 y el cebador inverso IS_R5, se puede predecir que hay un fragmento de ADN amplificado de 178 pares de bases (SEC ID N.º 6) en la secuencia de ácido nucleico de IS6110. Por consiguiente, se determinó como positiva una muestra en la que se confirmó una banda fluorescente correspondiente a 178 pares de bases.

Ejemplo comparativo 1

15 La detección de *Mycobacterium tuberculosis* se realizó mediante un procedimiento de detección usando una secuencia de cebador preparada según la secuencia de IS6110 conocida públicamente (JP-A-11-514522, Documento de patente 11).

(1) Síntesis del cebador para PCR para detectar *Mycobacterium tuberculosis*

20 Entre las secuencias de cebador reveladas en el documento JP-A-11-514522, se sintetizaron un oligonucleótido que tenía la secuencia de "TTCGGACCACCAGCACCTAACC" (SEC ID N.º 9, denominado en lo sucesivo en el presente documento IS_F2) y un oligonucleótido que tenía la secuencia de "CCTTCTTGTTGGCGGGTCCAG" (SEC ID N.º 10denominado en lo sucesivo en el presente documento IS_R2).

La síntesis se realizó mediante el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1 (1).

(2) Preparación de muestras

Se usaron las muestras de ADN obtenidas en el Ejemplo 1 (2).

25 (3) PCR

Se usó el IS_F2 preparado en el apartado (1) anterior como cebador directo y el IS_R2 preparado en el apartado (1) anterior se usó como cebador inverso, y la PCR se realizó como se describe a continuación en el presente documento.

30 En primer lugar se preparó como solución de reacción 10 mM de Tris-HCl (pH 8,9) que contiene 1 µM de cada uno del cebador IS_F2 y del cebador IS_R2, 1,5 mM de MgCl₂, 80 mM de KCl, 500 µg/ml de BSA, 0,1 % de colato de sodio, 0,1 % de Triton X-100, 0,2 de cada uno de dATP, dCTP, dGTP y dTTP, y 40 unidades/ml de Taq ADN polimerasa (Nippon Gene Co. Ltd.).

35 Como muestra para la PCR se usó una solución obtenida mediante la adición de 1 ng de muestra de ADN a 20 µl de la solución de reacción para PCR, y se realizó la PCR mediante el mismo equipo que se usó en el Ejemplo 1 (3), en las mismas condiciones de reacción.

(4) Detección

40 La detección se realizó mediante el mismo procedimiento del Ejemplo 1 (4), es decir, electroforesis con agarosa al 1,5 %, tinción con bromuro de etidio y detección de fluorescencia inducida por ultravioleta. Se usaron la fracción digerida con λ/Hind III (marcador 1) (carril M1) y la fracción digerida X174/Hae III (marcador 4) (Nippon gene Co. Ltd.) como marcador del peso molecular.

(5) Resultados

Los resultados obtenidos de este modo mediante electroforesis se muestran en la Figura 3-1.

En la 3-1, el número de cada carril muestra los resultados obtenidos mediante el uso de las siguientes muestras, respectivamente.

45 M1: marcador del peso molecular (marcador 1)

M4: marcador del peso molecular (marcador 4)

a: *Escherichia coli*

b: *Mycobacterium tuberculosis*

c: *Mycobacterium kansasii*

5 d: *Mycobacterium marinum*

e: *Mycobacterium simiae*

f: *Mycobacterium scrofulaceum*

g: *Mycobacterium gordonae*

h: *Mycobacterium szulgai*

10 i: *Mycobacterium avium*

j: *Mycobacterium intracellulare*

k: *Mycobacterium gastris*

l: *Mycobacterium xenopi*

m: *Mycobacterium nonchromogenicum*

15 n: *Mycobacterium terrae*

o: *Mycobacterium triviale*

p: *Mycobacterium fortuitum*

q: *Mycobacterium chelonae*

r: *Mycobacterium abscessus*

20 s: *Mycobacterium peregrinum*

Según los resultados de la PCR duplicada usando el cebador directo IS_F2 y el cebador inverso IS_R2, se predijo que hay un fragmento de ADN amplificado de 197 pares de bases (SEC ID N.º 6) en la secuencia de ácido nucleico de IS6110. Por consiguiente, se determinó como positiva una muestra en la que se confirmó una banda fluorescente correspondiente a 197 pares de bases.

25 Como resulta evidente a partir de los resultados de la Figura 2 obtenidos en el ejemplo 2, como resultado de realizar la PCR usando el cebador IS_F5 y el cebador IS_R5 de la presente invención, solo cuando se usó *Mycobacterium tuberculosis* como la muestra (b) se pudo confirmar una banda fluorescente de 178 pares de bases y se determinó que la muestra era positiva. Por el contrario, cuando se usaron otras especies bacterianas del género *Mycobacterium* y una bacteria de otro género, *Escherichia coli*, como las muestras (a y c a s), no se pudo confirmar la correspondiente banda fluorescente, y, por consiguiente, se determinó que todas las muestras determinadas eran negativas.

35 Por el contrario, como queda claro a partir de los resultados de la Figura 3–1 obtenidos en el ejemplo comparativo 1, como resultado de realizar la PCR usando el cebador IS_F2 y el cebador IS_R2, que son cebadores conocidos públicamente, se pudo determinar que la muestra era positiva cuando se usó *Mycobacterium tuberculosis* como la muestra. Sin embargo, en otros casos, por ejemplo, cuando se usó *Mycobacterium nonchromogenicum* como muestra (m) y cuando se usó *Mycobacterium triviale* como muestra (o), se observaron bandas evidentes y se determinó que estas muestras también eran falsos positivos. En la Figura 3–1, la banda obtenida mediante el uso de la muestra de *Mycobacterium nonchromogenicum* (m) en el se muestra con un círculo de puntos. La banda obtenida usando la muestra de *Mycobacterium triviale* (o) se muestra con el círculo de puntos indicado con la flecha.

40 Concretamente, se entiende que la detección específica de *Mycobacterium tuberculosis* es difícil mediante el procedimiento del Ejemplo comparativo 1.

45 A partir de los resultados obtenidos mediante electroforesis en el Ejemplo comparativo 1, en particular, se advirtió el resultado obtenido usando la muestra de *Mycobacterium triviale* (o), que se determinó que era muy similar en cuanto a tamaño del fragmento amplificado a la banda positiva de *Mycobacterium tuberculosis*. En la Figura 3–1, la banda se muestra especialmente con la flecha. Para el análisis posterior de este producto de la PCR, se cortó el producto de la PCR de la fracción sometida a electroforesis y se purificó el ADN. Se analizó su secuencia mediante el

procedimiento de secuenciación directa de PCR usando el kit Sequence de ABI Inc.

En la Figura 3–2, se muestra la secuencia obtenida. Entre las secuencias mostradas en la Figura 3–2, la secuencia del producto de la PCR derivada de la muestra de *Mycobacterium tuberculosis* de la fracción (b) se designa como la 1ª secuencia de nucleótidos, que se muestra en la parte superior del listado de secuencias (SEC ID N.º 12).

5 Además, la secuencia del producto de la PCR derivado de la muestra de *Mycobacterium triviale* obtenido de la fracción (o) se designa como la 2ª secuencia de nucleótidos, y se muestra en la parte inferior de este listado de secuencias (SEC ID N.º 13).

10 Como resultado del análisis de la secuencia del fragmento de ADN, se confirma que esta secuencia es la secuencia de ácido nucleico derivada de *Mycobacterium triviale* y se confirma que es idéntica a la secuencia de ácido nucleico de IS6110 específica de *Mycobacterium tuberculosis* solo en la región de la secuencia del cebador IS_F2 y del cebador IS_R2 usados en el Ejemplo comparativo 1. Por consiguiente, se entiende que cuando se realiza la PCR usando los cebadores públicamente conocidos IS_F2 e IS_R2, también se amplifica una secuencia de ácido nucleico distinta de *Mycobacterium tuberculosis* y que, por tanto, el cebador tiene un defecto obvio en su diseño.

15 Teniendo en cuenta lo anterior, se entiende que se puede excluir la consideración de falso positivo y que es posible detectar *Mycobacterium tuberculosis* de manera específica y precisa en comparación con los cebadores convencionales y el procedimiento de detección de *Mycobacterium tuberculosis* usando los cebadores, cuando la detección de *Mycobacterium tuberculosis* se realiza mediante PCR con el oligonucleótido de la presente invención como cebador. En este aspecto, el procedimiento de la presente invención es extremadamente superior en comparación con el procedimiento de detección de *Mycobacterium tuberculosis* que usa los cebadores convencionales.

20 Ejemplo 3

25 **Detección de *Mycobacterium tuberculosis* mediante un sistema de amplificación de PCR en tiempo real**

(1) Síntesis del cebador para PCR para detectar *Mycobacterium tuberculosis*

Se sintetizaron los oligonucleótidos de IS_F5 e IS_R5 mediante el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1, usando el mismo equipo que en el Ejemplo 1 (1).

(2) Preparación de la sonda para detectar *Mycobacterium tuberculosis*

30 Se diseñó una secuencia "ACCGACGCCTACGCTCGCAG" para utilizar como la sonda a partir de la secuencia oligonucleotídica de SEC ID N.º 6, que se amplificará mediante PCR usando IS_F5 e IS_R5 como cebador, y después se sintetizó el oligonucleótido que tenga esta secuencia (denominado en lo sucesivo en el presente documento IS_F5R5_FANTAM, SEC ID N.º 11). El colorante indicador FAM se ligó al extremo 5' de este oligonucleótido y el indicador atenuador TAMRA se eligió al extremo 3' para obtener una sonda oligonucleotídica marcada (sonda marcada fluorescente TaqMan™, Applied Biosystems Japan Inc.).

(3) Preparación de la muestra de ADN para PCR

35 Con respecto a la muestra de ADN obtenida de *Mycobacterium tuberculosis*, preparada en el Ejemplo 1(2), se midió una cantidad de ADN de la muestra midiendo la absorbancia. Se determinó la cantidad de ADN genómico (número de copias del genoma) comparando la cantidad de ADN obtenido con la cantidad conocida del ADN genómico de *Mycobacterium tuberculosis*. Se obtuvo ADN genómico que tenía 10^6 copias/μl.

Posteriormente, se diluyó la muestra de ADN para dar series de dilución de 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10, 5 y 2 copias/μl usando 10mM de tampón Tris–HCl, pH 8,9 para preparar las muestras de ADN para la PCR.

40 (4) PCR en tiempo real

La PCR en tiempo real se realizó usando IS_F5 preparado en (1) anteriormente en el presente documento como cebador directo e IS_R5 preparado en (1) anteriormente como cebador inverso de la siguiente manera.

45 En concreto, se preparó como solución de reacción 10 mM de Tris–HCl (pH 8,9) que contiene 1 μM de cada uno del cebador IS_F5 y del cebador IS_R5, 195 nM de la sonda marcada con fluorescencia IS_F5R5FAMTAM preparada en el apartado (1) anterior, 1,5 mM de $MgCl_2$, 80 mM de KCl, 500 μg/ml de BSA, 0,1 % de colato de sodio, 0,1 % de Triton X–100, 0,2 de cada uno de dATP, dCTP, dGTP y dTTP, y 40 unidades/ml de Taq ADN polimerasa (Nippon Gene Co. Ltd.).

50 Una solución preparada mediante la adición de 1 ng de la muestra de ADN de cada serie de dilución a 20 μl de la solución de reacción se usó como muestra para la PCR. Se añadió la muestra para PCR al pocillo de una placa de reacción de 96 pocillos (placa de reacción de 96 pocillos MicroAmp Optical, Applied Biosystems Japan, Inc.) y se realizó la PCR en tiempo real usando el termociclador -sistema de detección de secuencias especificado para la PCR TagMan™ (ABI7000, Applied Biosystems Japan, Inc.). Las condiciones de los ciclos de la PCR fueron 95 °C durante 10 minutos para mantener el calor, seguidos de 50 ciclos de reacción a 95 °C durante 15 segundos y a 60

°C durante 1 minuto, con la medición del valor de fluorescencia generado por el colorante indicador en cada ciclo. El valor de fluorescencia se midió en cada uno de los pocillos de la placa de reacción de 96 pocillos usando la función del termociclador usado en la medición para digitalizar la proporción relativa de la intensidad de fluorescencia.

(5) Resultados y análisis

- 5 La curva de calibración se preparó de acuerdo con el procedimiento convencional usado en la PCR en tiempo real. Concretamente, para preparar una curva de amplificación se representa el valor de la fluorescencia generada por el colorante indicador (Rn, eje y) frente a cada número de ciclo de la PCR (eje x) en cada muestra de ADN para PCR. Posteriormente, se seleccionó la región Rn en la que el valor de la fluorescencia se amplificó exponencialmente y se trazó una línea umbral (Th). Se estableció como ciclo umbral (Ct) un punto de cruce de Th y el valor de fluorescencia de cada muestra de ADN para la PCR. Se representó el valor Ct (eje y) frente al número de copias del genoma de cada muestra de ADN para la PCR usado (eje x, valor logarítmico) y como curva de calibración se usó la curva aproximada obtenida con respecto a cada valor Ct. La curva de calibración obtenida se muestra en la Figura 4.

$$Y = -3,555 x + 39,13$$

$$R^2 = 0,996$$

- 15 A partir de los resultados anteriores, dado que se detectó fluorescencia en la PCR en tiempo real, se entiende que se puede detectar *Mycobacterium tuberculosis* mediante el uso del oligonucleótido de la presente invención como cebador en la PCR y diseñando la sonda marcada de la secuencia de la región de amplificación y realizando la PCR en tiempo real.

- 20 Además, como se pudo preparar la curva de calibración, se entiende que es posible determinar cuantitativamente *Mycobacterium tuberculosis* aplicando la PCR en tiempo real usando el cebador y la sonda de la presente invención. Adicionalmente, a partir de la Figura 4 se entiende que es posible detectar *Mycobacterium tuberculosis* mediante la PCR en tiempo real usando el cebador y la sonda de la presente invención, incluso en caso de que solo existan dos copias de ADN genómico de *Mycobacterium tuberculosis* como nivel inicial.

- 25 Adicionalmente, cuando se utiliza la PCR en tiempo real, es posible determinar cuantitativamente un nivel inicial de un molde de ADN con exactitud mediante la monitorización de la intensidad de la fluorescencia en tiempo real y, por tanto, el procedimiento es eficaz para detectar *Mycobacterium tuberculosis*.

Ejemplo 4

- 30 Se intentó realizar un diagnóstico simultáneo (diagnóstico selectivo) entre micobacteriosis tuberculosas y no tuberculosas (MNT) utilizando *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium avium* (*M. avium*), *Mycobacterium intracellulare* (*M. intracellulare*) o *Mycobacterium kansasii* (*M. kansasii*) mediante PCR multiplex, que fue un procedimiento que amplificó simultáneamente múltiples fragmentos en un solo tubo usando varios pares del cebador.

(1) Síntesis del cebador

(i) Síntesis del cebador para PCR para detectar *Mycobacterium tuberculosis*

- 35 Se prepararon IS_F5 (SEC ID N.º 1) e IS_R6 (SEC ID N.º 4) mediante el mismo procedimiento del Ejemplo 1 (1) y se usaron como cebador directo y cebador inverso.

(i) Síntesis del cebador para PCR para detectar *M avium*

- 40 Se prepararon MAV19K F1 (CGGCTGTTCGAGTGGCAACAAGTC mostrado como la SEC ID N.º 15 en el presente documento, en lo sucesivo en el presente documento designado como "cebador directo para detectar *M. avium*") y MAV19K R1 (CCGTCGATGATGACCTTGGTCCC mostrado como la SEC ID N.º 16, en lo sucesivo en el presente documento designado como "cebador inverso para detectar *M. avium*"), que fueron "los cebadores oligonucleotídicos específicos de la región genética de la proteína de 19 kDa de *avium*" descritos en la reivindicación 5 del documento JP-A-11-69999, mediante el mismo procedimiento del ejemplo 1 (1) y se usaron como el cebador directo y el cebador inverso.

- 45 (iii) Síntesis del cebador para PCR para detectar *M. intracellulare*

- 50 Se prepararon la secuencia rps1 F1 (CGGGACAAGGTCGCCAAGGTCAAGA mostrada como la SEC ID N.º 17 en el presente documento, en lo sucesivo en el presente documento designado como "cebador directo para detectar *M. intracellulare*") y la secuencia rps1 R1 (GGGATGTAGGCCGTACCTCAAC mostrada como la SEC ID N.º 18, en lo sucesivo en el presente documento designado como "cebador inverso para detectar *M. intracellulare*"), que fueron "los cebadores oligonucleotídicos específicos de la región genética de la proteína del ribosoma s1 de *intracellulare*" descritos en la reivindicación 6 del documento JP-A-11-69999, mediante el mismo procedimiento del ejemplo 1 (1) y se usaron como el cebador directo y el cebador inverso.

(iv) Síntesis del cebador para PCR para detectar *M. kansasii*

Se prepararon la secuencia (GTCCCTGGCTGCTCTTGA mostrada como SEC ID N.º 19 en la presente memoria, denominada en lo sucesivo en el presente documento "cebador directo para detectar *M. kansasii*") , que era la secuencia en la que se desplazó una base en sentido 5' en el cebador 15 que se designa por la secuencia KATS2 de *M. kansasii* descrita en la Figura 1 del documento JP-A-11-155589, y cebador E3 (GCTGGTGGAGATGGAGATGTT mostrada como SEC ID N.º 20 de la presente memoria, denominado en lo sucesivo "cebador inverso para detectar *M. kansasii*") , mediante el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1 (1) y se usaron como cebador directo y cebador inverso.

(2) Preparación de muestras

Se usaron las muestras de ADN de *Mycobacterium tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare* y *M. kansasii* obtenidas en el Ejemplo 1 (2).

(3) PCR

Se preparó una solución que contenía 1 µM de cada concentración final del cebador directo y el cebador inverso sintetizados anteriormente en el presente documento (1) , 10mM de Tris-HCl (pH 8,9), 1,5mM de MgCl₂, 80mM de KCl, 500 µg/ml de BSA, 0,1 % de colato de sodio, 0,1 % de Triton X-100, 0,2mM de cada de dATP, dCTP, dGTP, dTTP y 40 unidades/ml de polimerasa de Taq (Nippon Gene Co. Ltd.) y se usó como solución de reacción para la PCR.

Las muestras para PCR (1) a (7) se prepararon añadiendo 1 µl (de 0 a 1.000 copias) de cada una de las muestras de ADN a 20 µl de la solución de reacción para PCR como se muestra en la Tabla 1 que figura a continuación, y se realizó la PCR para cada muestra usando el mismo equipo usado en el Ejemplo 1 (3) en las mismas condiciones de reacción. A este respecto, en la Tabla 1, cada uno de los términos avium, intracellulare y kansasii indican *M. avium*, *M. intracellulare* y *M. kansasii*, respectivamente. Del mismo modo, X indica sin adición de muestra de ADN; o indica con adición de muestra de ADN; y el número entre paréntesis de debajo de la marca o indica la concentración de la muestra de ADN añadida (número de copias).

(Tabla 1)

ADN de la muestra	Adición de la muestra de ADN						
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)
kansasii	x	o (1.000 copias)	x	o (1.000 copias)	o (1.000 copias)	x	o (1.000 copias)
M. tuberculosis	x	o (1.000 copias)	o (1.000 copias)	x	o (10 copias)	x	o (1.000 copias)
intracellulare	x	o (1.000 copias)	x	o (1.000 copias)	o (1.000 copias)	x	o (1.000 copias)
avium	x	o (1.000 copias)	x	o (1.000 copias)	o (1.000 copias)	o (1.000 copias)	x

(4) Detección

La detección se realizó mediante el mismo procedimiento del Ejemplo 1 (4), es decir, electroforesis con agarosa al 1,5 %, tinción con bromuro de etidio y detección de fluorescencia inducida por ultravioleta.

(5) Resultados

Los resultados obtenidos de este modo mediante electroforesis se muestran en la Figura 5.

En la Figura 5, el número de cada carril muestra los resultados obtenidos usando cada uno de los 7 tipos de muestra de ADN (1) a (7) de la Tabla 1 expuesta anteriormente.

Adicionalmente, cuando está presente la muestra de ADN obtenida de *Mycobacterium tuberculosis* en la muestra de ADN, se predice la obtención del producto de amplificación de 193 pb en la PCR usando los cebadores IS_F5 e IS_R6. Cuando está presente la muestra de ADN derivada de *M. avium* en la muestra de ADN, se predice la obtención de un producto de amplificación de 106 pb en la PCR usando el cebador directo para detectar *M. avium* y el cebador inverso para detectar *M. avium*. Cuando está presente la muestra de ADN derivada de *M. intracellulare* en la muestra de ADN, se predice la obtención de un producto de amplificación de 160 pb en la PCR usando el cebador directo para detectar *M. intracellulare* y el cebador inverso para detectar *M. intracellulare*. Cuando está presente la muestra de ADN de *M. kansasii* en la muestra de ADN, se predice la obtención de un producto de amplificación de 235 pb en la PCR usando el cebador directo para detectar *M. intracellulare* y el cebador inverso para detectar *M. intracellulare*. Por lo tanto, en el lado de los patrones electroforéticos de la Figura 5, se muestra un orden de aparición de cada fracción del producto de amplificación, junto con el sentido de la migración electroforética. Cada uno de los términos, "kansasii", "TB", "intra" y "avium" indica *M. kansasii*, *M. tuberculosis*, *M. intracellulare* y *M. avium*, respectivamente.

Como resulta evidente a partir de la Figura 5, cuando se realizó la PCR añadiendo al mismo tiempo todas las muestras de ADN obtenidas de *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare* y *M. kansasii* en un solo tubo, se pudieron confirmar las cuatro bandas fluorescentes correspondientes a los productos amplificados, cuya amplificación se predijo cuando las correspondientes células bacterianas estaban presentes (carriles (2) y (5)). Como la banda de *Mycobacterium tuberculosis* se confirmó en el carril (5), se descubrió que incluso cuando la concentración de muestra de ADN era de 1/100 de la del carril (2), se pudo detectar *Mycobacterium tuberculosis* con una alta sensibilidad.

Cuando se realizó la PCR usando solo la muestra de ADN derivada de *Mycobacterium tuberculosis*, incluso estando presentes los cebadores para detectar *M. avium*, *M. intracellulare* y *M. kansasii*, solo se confirmó la banda fluorescente correspondiente a 193 pb que es un producto de la reacción PCR usando IS_F5 e IS_R6, que son los cebadores para detectar *Mycobacterium tuberculosis* de la presente invención (carril (3)).

Al contrario, cuando la PCR se realizó usando muestras que no contenían la muestra de ADN derivada de *Mycobacterium tuberculosis* (carriles (4) y (6)), la banda fluorescente correspondiente a 106 pb derivada de la PCR usando los cebadores Directo/Inverso para detectar *M. avium*, la banda fluorescente correspondiente a 160 pb derivada de la PCR usando los cebadores Directo/Inverso para detectar *M. intracellulare*, y la banda fluorescente correspondiente a 235 pb derivada de la PCR usando los cebadores Directo/Inverso para detectar *M. kansasii* pudieron observarse en el caso en el que se realizó la PCR usando cada una de las correspondientes muestras de ADN, respectivamente, no obstante, no se pudo detectar la banda fluorescente correspondiente a 193 pb, que debía observarse en el caso de haber presente *Mycobacterium tuberculosis*.

Como resulta evidente a partir de lo anterior, se entiende que es posible la detección específica de *Mycobacterium tuberculosis* mediante el uso del cebador de la presente invención, incluso aún estando presentes las muestras de ADN derivadas de varias clases de bacterias en un único tubo. Adicionalmente, al realizar la PCR con un solo tubo se pudo detectar simultáneamente el ADN genómico obtenido de cada una de las cuatro bacterias causantes, es decir *Mycobacterium tuberculosis*, el grupo MAC (*M. avium* y *M. intracellulare*), que son las bacterias causantes de micobacteriosis no tuberculosas y *M. kansasii*.

Ejemplo 5

Se intentó realizar un diagnóstico simultáneo (diagnóstico selectivo) entre la tuberculosis y la micobacteriosis no tuberculosa (MNT) realizando PCR multiplex mediante el uso de la sonda marcada fluorescente en la amplificación por PCR en tiempo real. El objeto del diagnóstico son *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium* (*M. avium*), *Mycobacterium intracellulare* (*M. intracellulare*) y *Mycobacterium kansasii* (*M. kansasii*).

(1) Cebador para PCR

(i) Cebador para PCR para detectar *Mycobacterium tuberculosis*

Se prepararon IS_F5 (SEC ID N.º 1) e IS_R5 (SEC ID N.º 3) mediante el mismo procedimiento del Ejemplo 1 (1) y se usaron como cebador directo y cebador inverso.

(ii) Cebador para PCR para detectar *M. avium*

Se usó el mismo cebador que en el Ejemplo 4 (1) (ii).

(iii) Cebador para PCR para detectar *M. intracellulare*

Se usó el mismo cebador que en el Ejemplo 4 (1) (iii).

(iv) Cebador para PCR para detectar *M. kansasii*

Se usó el mismo cebador que en el Ejemplo 4 (1) (iv).

(2) Preparación de sonda

(i) Preparación de la sonda para detectar *Mycobacterium tuberculosis*

5 Se diseñó la secuencia "ACCGACGCCTACGCTCGCAG" para utilizar como la sonda a partir de la secuencia oligonucleotídica de SEC ID N.º 6, que se amplificará mediante PCR usando IS_F5 e IS_R5 como cebador, y se sintetizó el oligonucleótido que tenga esta secuencia (denominado en lo sucesivo en el presente documento IS_F5R5_FANTAM, SEC ID N.º 11). Un colorante indicador FAM se ligó al extremo 5' de este oligonucleótido y el indicador atenuador TAMRA se eligió al extremo 3' para obtener una sonda oligonucleotídica marcada (sonda marcada fluorescente TaqMan™, Applied Biosystems Japan Inc.).

10 (ii) Preparación de la sonda para detectar *Mycobacterium avium*

Se diseñó la secuencia "CAGCTCGAGCACCAGTGCCTCGG" para utilizarla como sonda, a partir de la secuencia oligonucleotídica que sería amplificada mediante PCR usando el cebador directo para detectar *M. avium* y el cebador inverso para detectar *M. avium* como cebadores, y se sintetizó el oligonucleótido que tenía esta secuencia (denominado en lo sucesivo en el presente documento, Mab_F1R1m2_Cy5BHQ, SEC ID N.º 21). El colorante indicador Cy5 se ligó al extremo 5' de este oligonucleótido y el indicador atenuador BHQ2 se eligió al extremo 3' para obtener una sonda oligonucleotídica marcada (sonda marcada terminalmente dual para la PCR en tiempo real SIGMA GENOSYSInc.).

(iii) Preparación de la sonda para detectar *M. intracellulare*

20 Se diseñó la secuencia "CCTGGCTCGTCAGCTTCACGCG" para utilizarla como sonda, a partir de la secuencia oligonucleotídica que sería amplificada mediante PCR usando el cebador directo para detectar *M. intracellulare* y el cebador inverso para detectar *MM. intracellulare* como cebadores, y se sintetizó el oligonucleótido que tenía esta secuencia (denominado en lo sucesivo en el presente documento, Int_F1R1m_VICMGB, SEC ID N.º 22). El colorante indicador VIC se ligó al extremo 5' de este oligonucleótido y el indicador atenuador MGB se eligió al extremo 3' para obtener una sonda oligonucleotídica marcada (sonda marcada fluorescente TaqMan™, Applied Biosystems Japan Inc.).

(iv) Preparación de la sonda para detectar *M. kansasii*

30 Se diseñó la secuencia "ATCGTATCCACCATCCTCGACAGCGT" para utilizarla como sonda, a partir de la secuencia oligonucleotídica que sería amplificada mediante PCR usando el cebador directo para detectar *M. kansasii* y el cebador inverso para detectar *M. kansasii* como cebadores, y se sintetizó el oligonucleótido que tenía esta secuencia (denominado en lo sucesivo en el presente documento, KATS2_TAMBHQ2, SEC ID N.º 23). El colorante indicador TAMRA se ligó al extremo 5' de este oligonucleótido y el indicador atenuador BHQ2 se eligió al extremo 3' para obtener una sonda oligonucleotídica marcada (sonda marcada terminalmente dual para la PCR en tiempo real SIGMA GENOSYSInc.).

(3) Preparación de muestras

35 Con respecto a las muestras de ADN obtenidas de *Mycobacterium tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare* y *M. kansasii* preparadas en el Ejemplo 1(2), se midió una cantidad de ADN de cada muestra midiendo la absorbancia. Se determinó la cantidad de ADN genómico (número de copias del genoma) comparando la cantidad de ADN obtenido con la cantidad conocida del ADN genómico de *Mycobacterium tuberculosis*. Se obtuvo ADN genómico que tenía 10^8 copias/μl.

40 Posteriormente, se diluyó la muestra de ADN para dar series de dilución de 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10, 5 y 2 copias/μl usando 10mM de tampón Tris-HCl, pH 8,9 para preparar la muestra de ADN para la PCR.

(4) Detección mediante PCR en tiempo real

45 Se preparó una solución que contenía 1 μM de cada concentración final del cebador directo y el cebador inverso sintetizados anteriormente en el presente documento (1), 195 nM de cada uno en una concentración final de la sonda marcada con fluorescencia, 10 mM de Tris-HCl (pH 8,9), 1,5 mM de MgCl₂, 80 mM de KCl, 500 μg/ml de BSA, 0,1 % de colato de sodio, 0,1 % de Triton X-100, 0,2m M de cada uno de dATP, dCTP, dGTP, dTTP y 40 unidades/ml de polimerasa de Taq (Nippon Gene Co. Ltd.) y se usó como solución de reacción para la PCR.

50 Una solución preparada mediante la adición de 1 μl de la muestra de ADN de cada serie de dilución a 20 μl de la solución de reacción se usó como muestra para la PCR. Se añadió la muestra para PCR al pocillo de una placa de reacción de 96 pocillos (placa de reacción de 96 pocillos MicroAmp Optical, Applied Biosystems Japan, Inc.) y se realizó la PCR en tiempo real usando el termociclador -sistema de detección de secuencias especificado para la PCR TagMan™ (ABI7000, Applied Biosystems Japan, Inc.). Las condiciones de los ciclos de la PCR fueron 95 °C durante 10 minutos para mantener el calor, seguidos de 50 ciclos de reacción a 95 °C durante 15 segundos y a 60 °C durante 1 minuto, con medición del valor de fluorescencia generado por el colorante indicador en cada ciclo.

El valor de fluorescencia se midió en cada uno de los pocillos de la placa de reacción de 96 pocillos usando la función del termociclador para digitalizar la proporción relativa de la intensidad de fluorescencia usada en la medición.

(5) Resultados y análisis

- 5 Dado que los colorantes indicadores del cebador para detectar cada célula bacteriana son diferentes entre sí, cuando se monitoriza el valor de fluorescencia de cuatro longitudes de onda diferentes derivado cada colorante indicador en cada ciclo, se puede confirmar la amplificación del fragmento de ADN dirigido a la secuencia genómica obtenida de *Mycobacterium tuberculosis* y la amplificación del ADN genómico derivado cuatro bacterias causantes que incluían micobacteriosis no tuberculosas, el grupo MAC (*M. avium* y *M. intracellulare*) y *M. kansasii*.
- 10 Por lo tanto, se midió el valor de fluorescencia generado por cada colorante indicador. Y después, se preparó una curva de amplificación que indicaba la relación ente la serie de dilución del ADN genómico derivado de cada bacteria y el valor de fluorescencia generado de cada colorante indicador mediante el mismo procedimiento que en el Ejemplo 3 (5). Como curva de calibración se representó el valor de Ct (eje y) frente al número de copias del genoma (eje x, expresión logarítmica) mediante el mismo procedimiento que en el Ejemplo 3 (5) a partir de la curva de amplificación obtenida y la curva aproximada obtenida a cada valor de Ct.
- 15

Los resultados se muestran en la figura 6.

- Como es evidente a partir de los resultados (curva de calibración) sobre el ADN de *M. tuberculosis* de la Figura 6, se entiende que como se podía detectar la fluorescencia del colorante indicador del cebador para detectar *Mycobacterium tuberculosis* incluso aún estando presentes ADN derivados de varios tipos de células bacterianas distintas de *Mycobacterium tuberculosis* en un solo tubo, se puede detectar *Mycobacterium tuberculosis* con el uso del oligonucleótido de la presente invención como cebador, el diseño de la sonda marcada a partir de la secuencia que será la región de amplificación de la misma y la realización de la PCR en tiempo real.
- 20

- Además, como se pudo preparar la curva de calibración, se entiende que es posible determinar cuantitativamente *Mycobacterium tuberculosis* aplicando la PCR en tiempo real usando el cebador y la sonda de la presente invención. Adicionalmente, a partir de la Figura 6 se puede entender que es posible detectar *Mycobacterium tuberculosis* mediante la PCR en tiempo real usando el cebador y la sonda de la presente invención, incluso en caso de que solo existan dos copias de ADN genómico de *Mycobacterium tuberculosis* como nivel inicial (2 copias/reacción).
- 25

- Adicionalmente, cuando se utiliza la PCR en tiempo real, dado que es posible determinar cuantitativamente un nivel inicial de un molde de ADN con exactitud mediante la monitorización de la intensidad de la fluorescencia en tiempo real, por tanto, el procedimiento es eficaz para detectar *Mycobacterium tuberculosis*.
- 30

- Es más, incluso cuando se mezclan los ADN genómicos derivados de cada uno del grupo MAC (*M. avium* y *M. intracellulare*), que son bacterias causantes de micobacteriosis no tuberculosas, y *M. kansasii* (infección concurrente), se mantiene la linealidad de cada curva de calibración sin interferir en la reacción de amplificación de cada una, y, como resultado, se puede controlar el ADN genómico obtenido de cada una de las cuatro bacterias causantes en la reacción en un solo tubo. En este caso, se puede presentar una sensibilidad de detección con dos copias/reacción en cualquier especie bacteriana. Concretamente, se puede entender que se pueden llevar a cabo simultáneamente la detección de *Mycobacterium tuberculosis* y la identificación de micobacterias no tuberculosas realizando una PCR en tiempo real en un espécimen en el que haya mezclados varios números de células bacterianas.
- 35

40 **Aplicabilidad industrial**

- De acuerdo con el procedimiento para detectar *Mycobacterium tuberculosis* de la presente invención, se pueden excluir los falsos positivos del diagnóstico, y, como resultado, se hace posible la detección de *Mycobacterium tuberculosis* con una especificidad y una exactitud mayores a las del procedimiento convencional de bacilos de la tuberculosis dirigidos a IS6110.

- 45 Adicionalmente, dado que el procedimiento de detección de la presente invención es específico de *Mycobacterium tuberculosis*, se puede realizar la detección de *Mycobacterium tuberculosis* y el diagnóstico simultáneo (diagnóstico selectivo) de micobacterias no tuberculosas usando una muestra mediante la realización de la detección de *Mycobacterium tuberculosis* con el cebador y la sonda de la presente invención mediante PCR en tiempo real.

Listado de secuencias

<110> WAKO PURE CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.

<120> Procedimiento para determinar *Mycobacterium tuberculosis*

5

<130> 101583ep

<150> EP05734679,3

<151> 2005-04-22

10

<150> JP2004-129272

<151> 2004-04-26

<160> 23

15

<170> Patent In versión 3,1

<210> 1

<211> 21

20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador oligonucleotídico

25

<400> 1

tggtagcag acctcaccta t 21

30

<210> 2

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> cebador oligonucleotídico

<400> 2

acctcaccta tgtgtcgacc 20

5 <210> 3

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> cebador oligonucleotídico

<400> 3

15 cgagtagcgt ttctgttg 20

<210> 4

<211> 22

<212> ADN

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador oligonucleotídico

25 <400> 4

aacgtcttc aggtcgagta cg 22

<210> 5

<211> 19

30 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador oligonucleotídico

35

<400> 5

ES 2 560 433 T3

tggcgttgag cgtagtagg 19

<210> 6

<211> 178

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> oligonucleótido

10

<400> 6

```
tgggtagcag acctcaccta tgtgtcgacc tgggcagggt tcgcctacgt ggcctttgtc 60
accgacgcct acgctcgag gatcctgggc tggcgggtcg cttccacgat ggccacctcc 120
atggtcctcg acgcgatcga gcaagccatc tggacccgcc aacaagaaag cgtactcg 178
```

15 <210> 7

<211> 182

<212> ADNA

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> oligonucleótido

<400> 7

```
acctcaccta tgtgtcgacc tgggcagggt tcgcctacgt ggcctttgtc accgacgcct 60
acgctcgag gatcctgggc tggcgggtcg cttccacgat ggccacctcc atggtcctcg 120
acgcgatcga gcaagccatc tggacccgcc aacaagaaag cgtactcgac ctgaaagacg 180
```

25 tt 182

<210> 8

<211> 324

<212> ADN

30 <213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 560 433 T3

<223> oligonucleótido

<400> 8

5 cgtactcgac ctgaaagacg ttatccacca tacggatagg ggatctcagt acacatcgat 60
 ccggttcagc gagcggctcg ccgaggcagg catccaaccg tcggtcggag cggtcggaag 120
 ctcctatgac aatgcactag ccgagacgat caacggccta tacaagaccg agctgatcaa 180
 acccggaag ccctggcggc ccatcgagga tgtcgagttg gccaccgcgc gctgggtcga 240
 ctggttcaac catcgccgcc tctaccagta ctgcccgcgc gtcccgccgg tcgaactcga 300
 ggctgcctac tacgctcaac gccca 324

<210> 9

<211> 22

10 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador oligonucleotídico

15

<400> 9

ttcggaccac cagcacctaa cc 22

20 <210> 10

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> cebador oligonucleotídico

<400> 10

30 ccttctgtt ggcgggtcca g 21

<210> 11

ES 2 560 433 T3

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> sonda oligonucleotídica

<400> 11

10 accgacgcct acgctcgag 20

<210> 12

<211> 195

<212>ADN

15 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 12

```
cggaccacca gcacctaacc ggctgtgggt agcagacctc acctatgtgt cgacctgggc 60
agggttcgcc tacgtggcct ttgtcaccga cgcctacgct cgcaggatcc tgggctggcg 120
ggtcgcttcc acgatggcca cctccatggt cctcgacgcg atcgagcaag ccatctggac 180
ccgccaacaa gaagg 195
```

20

<210> 13

<211> 195

<212> ADN

<213> Mycobacterium triviale

25

<400> 13

```
cggaccacca gcacctaacc gcttgtgggt ggcgacctc acgtatgtgt ccacatggtc 60
gggctgggtc tacaccgct tcgtcatcga cgcctacgcc cgccgcatcc tgggctggtc 120
ggtggcgacc accatgacca gccaaactggt cgtcgacgcc gtcgaccagg cgatctggac 180
ccgccaacaa gaagg 195
```

30 <210> 14

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> cebador oligonucleotídico

<400> 14

10 ttgcagaaag tccagctcat gc 22

<210> 15

<211> 24

<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador oligonucleotídico

20 <400> 15

 cggctgttcg agtggcaaca agtc 24

<210> 16

25 <211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> cebador oligonucleotídico

<400> 16

 ccgtcgatga tgaccttggc ccc 23

35

<210> 17

<211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> cebador oligonucleotídico

<400> 17

cgggacaagg tcgccaaggt caaga 25

10

<210> 18

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> cebador oligonucleotídico

<400> 18

20

gggatgtagg ccgtcacctc aac 23

<210> 19

<211> 18

25 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador oligonucleotídico

30

<400> 19

gtccctggct gctcttga 18

35 <210> 20

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador oligonucleotídico

5

<400> 20

gctggtggag atggagatgt t 21

10 <210> 21

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> sonda oligonucleotídica

<400> 21

20 cagctcgagc accagtgcgt cgg 23

<210> 22

<211> 21

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> sonda oligonucleotídica

30 <400> 22

ctggctgctc agcttcaagc g 21

<210> 23

35 <211> 26

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sonda oligonucleotídica

5 <400> 23

atcgtatcca ccatcctcga cagcgt 26

REIVINDICACIONES

1. Un par de cebadores para detectar *Mycobacterium tuberculosis* que consiste en un cebador que consiste en un oligonucleótido que consiste en una secuencia de ácido nucleico descrita en SEC ID N.º 2 y un cebador que consiste en un oligonucleótido que consiste en una secuencia de ácido nucleico descrita en SEC ID N.º 4.
- 5 2. El par de cebadores de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el cebador está marcado con una sustancia de marcaje, preferentemente la sustancia de marcaje se selecciona del grupo que consiste en un radioisótopo, una enzima, una sustancia fluorescente, una sustancia luminiscente y una biotina.
3. Un procedimiento para detectar *Mycobacterium tuberculosis* que comprende el uso de un par de cebadores que comprende un cebador que consiste en un oligonucleótido que consiste en una secuencia de ácido nucleico descrita en SEC ID N.º 2 y un cebador que consiste en un oligonucleótido que consiste en una secuencia de ácido nucleico descrita en SEC ID N.º 4.
- 10 4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, que comprende:
- realizar una reacción de amplificación de ácido nucleico usando el par de cebadores y usando un ácido nucleico en una muestra como molde; y
- 15 detectar un producto obtenido de extensión del cebador.
5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el procedimiento incluye los siguientes procedimientos:
- (1) realizar una reacción de amplificación de ácido nucleico usando el par de cebadores y un ácido nucleico en una muestra como molde; y
- 20 (2) realizar la electroforesis del producto de extensión del cebador obtenido en el apartado (1) anterior y determinar la existencia de *Mycobacterium tuberculosis* según el resultado obtenido.
6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, que comprende adicionalmente, después de realizar la electroforesis, confirmar una fracción del producto de extensión del cebador que tiene un número de pares de bases objetivo en la fracción electroforética obtenida, dicho procedimiento comprende, preferentemente
- 25 realizar la reacción de amplificación de ácido nucleico usando un oligonucleótido descrito en la SEC ID N.º 2 como cebador directo y un oligonucleótido descrito en la SEC ID N.º 4 como cebador inverso,
- realizar la electroforesis del producto de extensión del cebador obtenido y determinar la muestra como muestra positiva confirmando que contiene una fracción de 182 pares de bases.
- 30 7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, que además comprende, después de realizar la electroforesis:
- hibridar la fracción electroforética obtenida con una sonda marcada, que es un oligonucleótido marcado que comprende una parte o una secuencia completa de la secuencia de ácido nucleico descrita en la SEC ID N.º 2, la SEC ID N.º 4 o la SEC ID N.º 7, o una parte o una secuencia completa de la secuencia complementaria de la misma, en el que el oligonucleótido tiene la propiedad de hibridar con la secuencia de ácido nucleico del gen IS6110 en *Mycobacterium tuberculosis* con una sustancia de marcaje.
- 35 detectar la sustancia de marcaje de la sonda marcada, y
- determinar que la muestra es una muestra positiva confirmando una fracción hibridada con la sonda marcada, dicho procedimiento comprende, preferentemente
- 40 realizar la reacción de amplificación de ácido nucleico usando un oligonucleótido descrito en la SEC ID N.º 2 como cebador directo y usando un oligonucleótido descrito en la SEC ID N.º 4 como cebador inverso,
- realizar la electroforesis,
- hibridar la fracción electroforética obtenida con una sonda marcada que es oligonucleótido marcado que comprende una parte o una secuencia completa de la secuencia de ácido nucleico descrita en la SEC ID N.º 7 o la secuencia complementaria de la misma con una sustancia de marcaje,
- 45 detectar la sustancia de marcaje de la sonda marcada, y
- determinar que la muestra es una muestra positiva confirmando una fracción hibridada con la sonda marcada.
8. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en el que un cebador del par de cebadores está marcado con una sustancia de marcaje y el procedimiento incluye el proceso de realizar la reacción de amplificación del ácido

nucleico usando el cebador marcado y el ácido nucleico en la muestra como molde y medir la sustancia de marcaje del producto de extensión del cebador obtenido, preferentemente dicho procedimiento comprende adicionalmente, tras realizar la reacción de amplificación de ácido nucleico, eliminar un cebador marcado libre y medir la sustancia de marcaje del producto de extensión del cebador, lo más preferentemente

5 (i) el procedimiento para eliminar el cebador marcado libre, después de realizar la reacción de amplificación del ácido nucleico, incluye un procedimiento para precipitar el producto de extensión del cebador en la mezcla de reacción obtenida y eliminar un sobrenadante; o

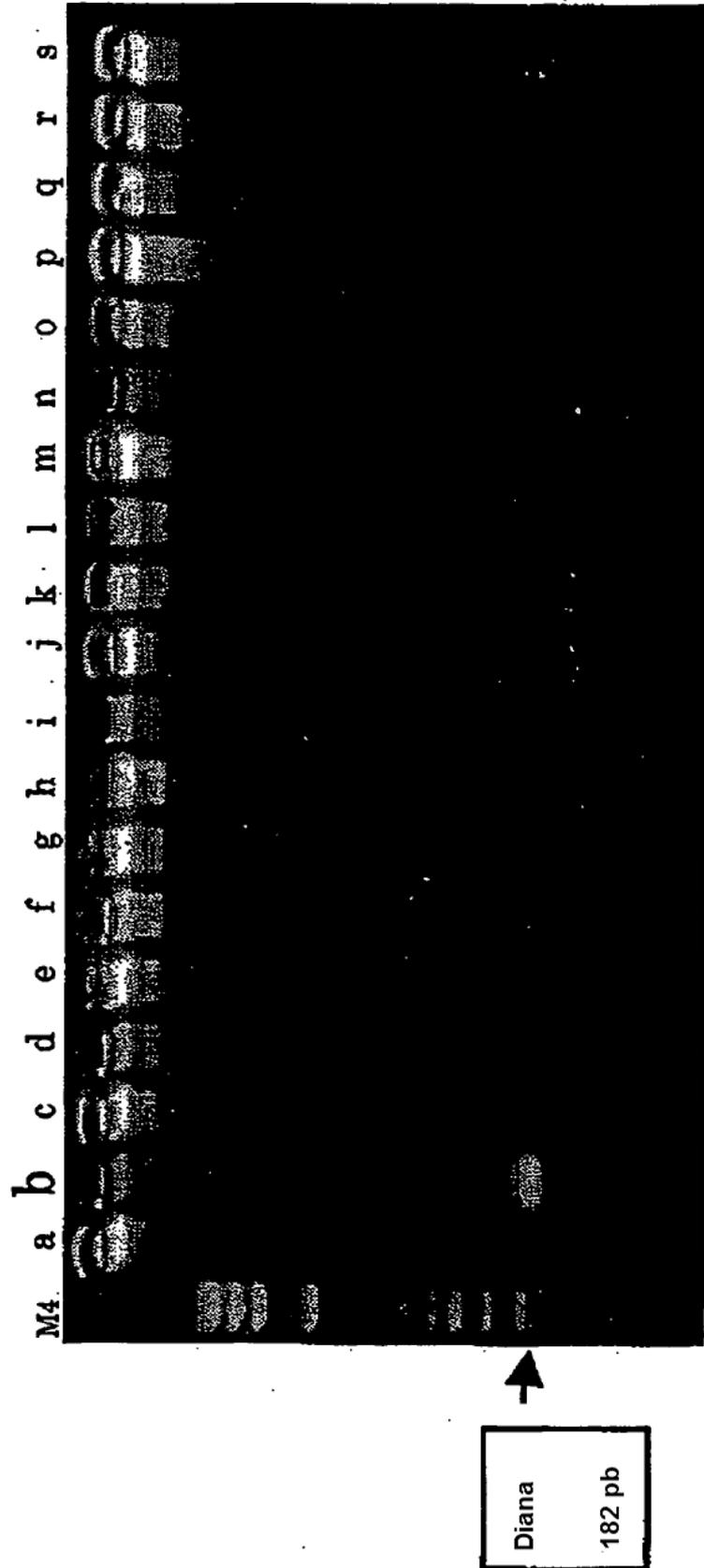
10 (ii) el procedimiento para eliminar un cebador marcado libre, después de realizar la reacción de amplificación del ácido nucleico, es un procedimiento de tratamiento del producto de reacción obtenido por medio de cromatografía en gel.

9. Un kit para detectar *Mycobacterium tuberculosis* que comprende un cebador que consiste en un oligonucleótido que consiste en la secuencia de ácido nucleico descrita en SEC ID N.º 2 y un cebador que consiste en un oligonucleótido que consiste en una secuencia de ácido nucleico descrita en SEC ID N.º 4.

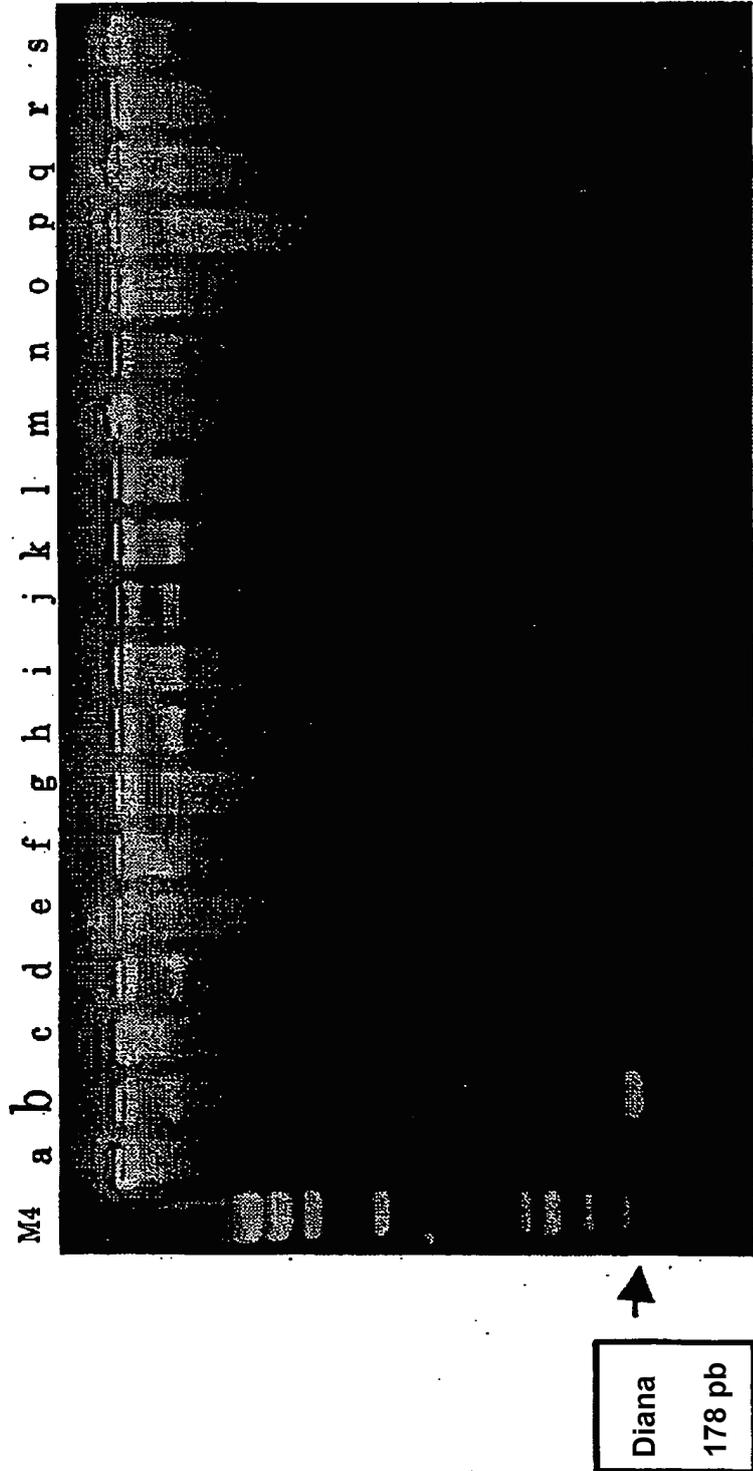
15 10. El kit de la reivindicación 9, que comprende adicionalmente una sonda marcada obtenida mediante marcaje de un oligonucleótido que comprende una parte o una secuencia completa de la secuencia de ácido nucleico descrita en la SEC ID N.º 2, la SEC ID N.º 4 o la SEC ID N.º 7, o una parte o una secuencia completa de la secuencia complementaria de la misma, en el que el oligonucleótido tiene la propiedad de hibridar con la secuencia de ácido nucleico del gen IS6110 en *Mycobacterium tuberculosis* mediante una sustancia de marcaje.

20 11. El kit de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el cebador está marcado con una sustancia de marcaje.

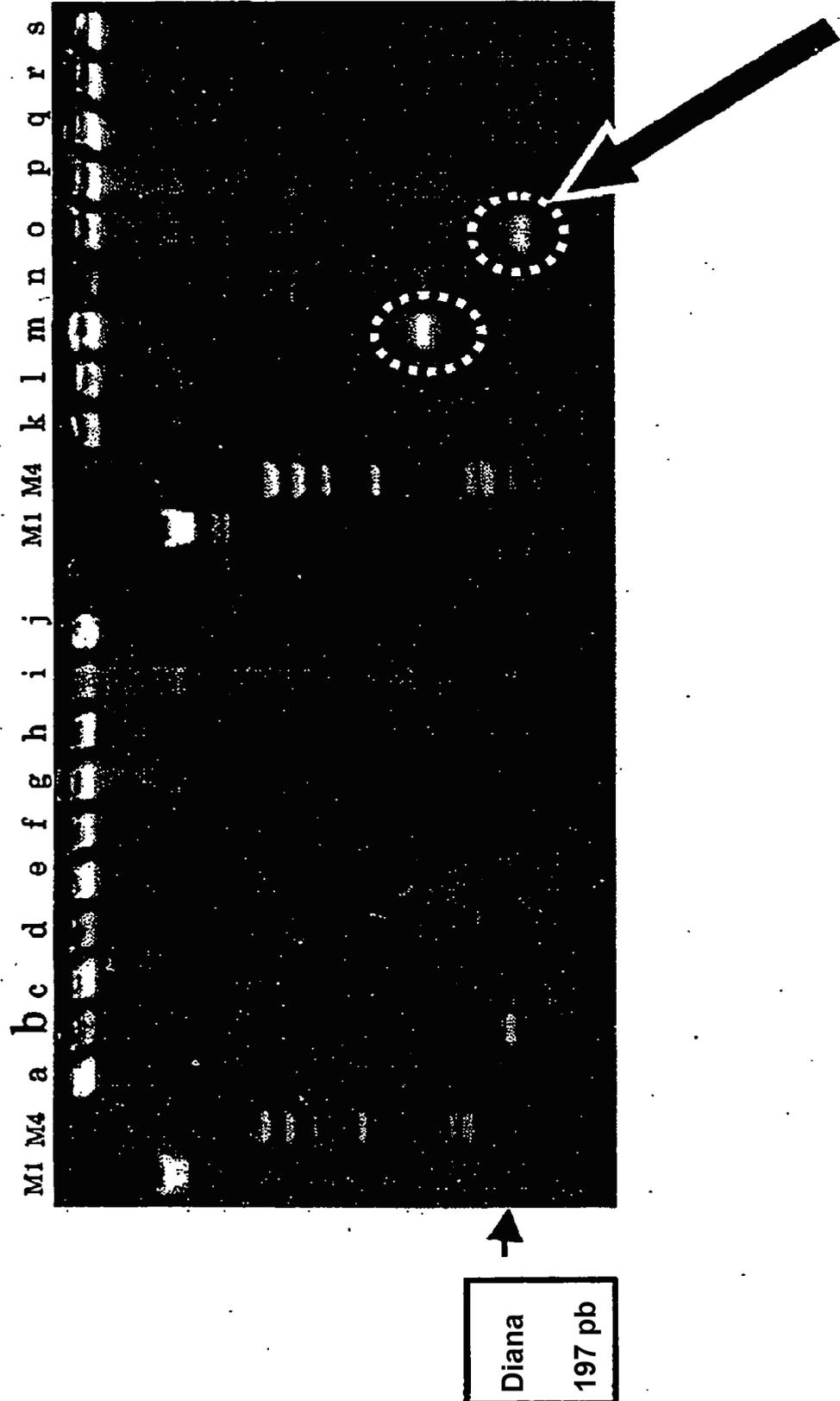
[Fig.1]



[Fig.2]



[Fig.3-1]



[Fig.3-2]

1ª secuencia de nucleótidos

Nombre del archivo : TB_PCRp

Tamaño de la secuencia : 195

2ª secuencia de nucleótidos

Nombre del archivo : triviate_PCRp

Tamaño de la secuencia : 195

[78,462% / 195 pb] Puntuación INT/OPT : < 528/ 528 >

```

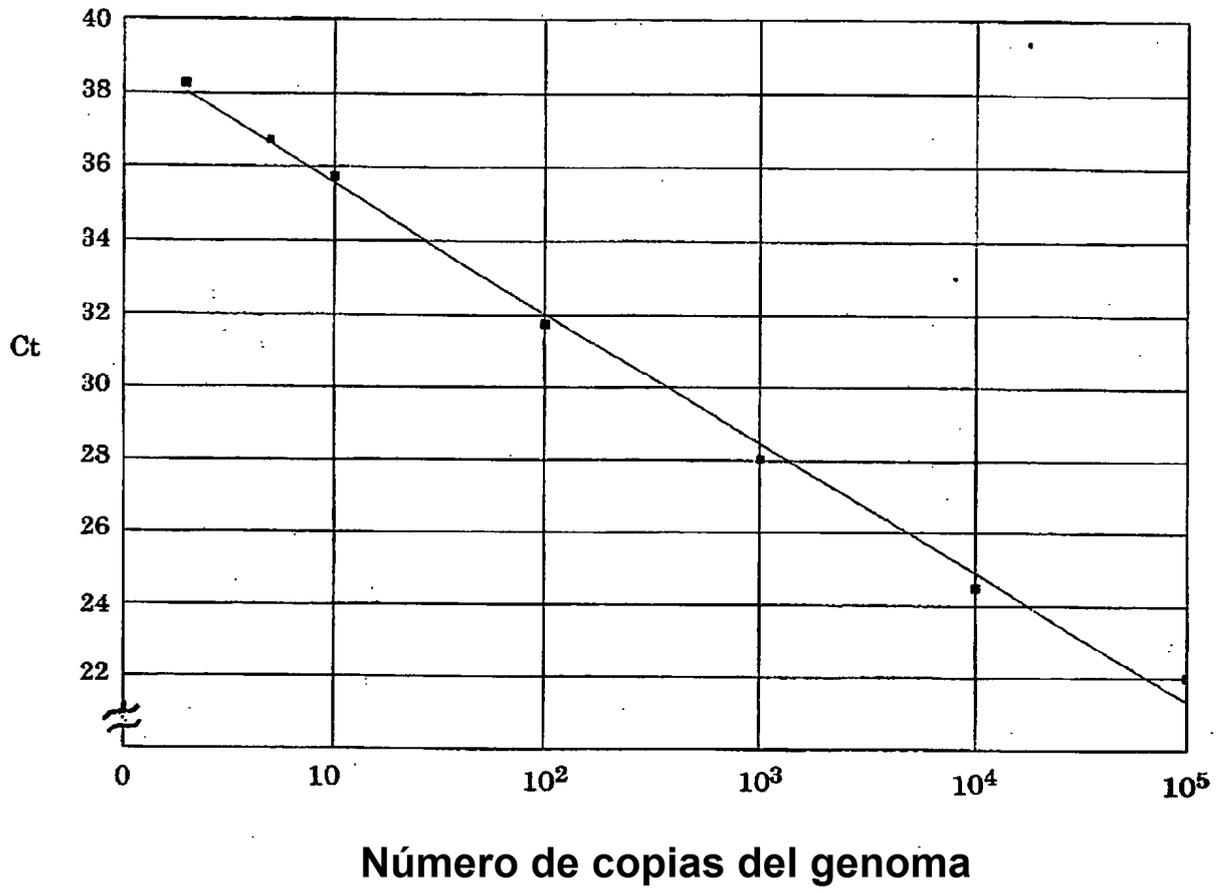
1' CGGACCACCA GCACCTAACC GGCTGTGGGT AGCAGACCTC ACCTATGTGT CGACCTGGGC
*****
1' CGGACCACCA GCACCTAACC GCTTGTGGGT GGCCGACTTC ACGTATGTGT CCACATGGTC

61' AGGGTTCGCC TACGTGGCCT TTGTCACCGA CGCCTACGCT CGCAGGATCC TGGGCTGGCG
** * * ** * * **** ** ***** ** * **** *****
61' GGGCTGGTGC TACACCGCGT TCATCATCGA CGCCTACGCC CGCCGCATCC TGGGCTGGTC

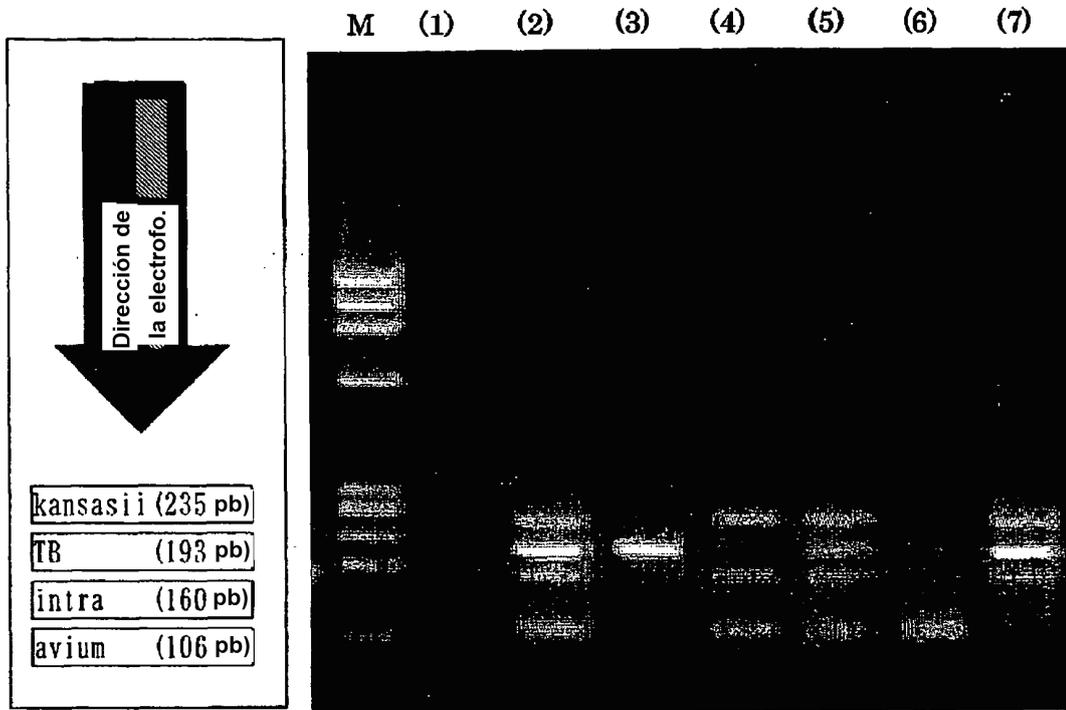
121' GGTGCTTCC ACGATGGCCA CCTCCATGGT CCTCGACGGC ATCGAGCAAG CCATCTGGAC
*** ** ** ** ** * **** * ***** **** ** * * *****
121' GGTGGCGACC ACCATGACCA GCCAACTGGT CGTCGACGCC GTCGACCAGG CGATCTGGAC

181' CGGCCAACAA GAAGG
*****
181' CGGCCAACAA GAAGG
    
```

[Fig.4]



[Fig.5]



[Fig.6]

