

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 643 214**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.04.2013 PCT/EP2013/058701**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.10.2013 WO13160434**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.04.2013 E 13718341 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.07.2017 EP 2841596**

54 Título: **Procedimiento de detección para Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis**

30 Prioridad:

27.04.2012 DE 102012103730

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

21.11.2017

73 Titular/es:

**GEORG-AUGUST-UNIVERSITÄT GÖTTINGEN
STIFTUNG ÖFFENTLICHEN RECHTS (100.0%)
Wilhelmsplatz 1
37073 Göttingen, DE**

72 Inventor/es:

**CZERNY, CLAUS-PETER y
MÜNSTER, PIA**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 643 214 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

Procedimiento de detección para *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*

La presente solicitud se refiere a un procedimiento para la detección específica y opcionalmente para la cuantificación de *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) en una muestra de un individuo. Para ello, de acuerdo con el procedimiento según la invención, la detección de la presencia de la región IS900 en una muestra se lleva a cabo por medio de una amplificación de ácidos nucleicos y oligonucleótidos específicos. En un aspecto adicional, se proporciona un kit de ensayo para la detección específica de MAP en una muestra mediante procedimientos de amplificación. Por último, se describen oligonucleótidos específicos que son adecuados para la detección específica de MAP.

10 **Estado de la técnica**

Mycobacterium avium es un tipo de micobacteria, que tiene una amplia variedad de hospedadores. *Mycobacterium avium* por un lado puede causar tuberculosis en las aves de corral, y por otra parte también aparece en los seres humanos y otros mamíferos como agente patógeno. Una de estas especies es *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP), una bacteria patógena estricta del género *Mycobacterium*. MAP es considerada como la causa de la paratuberculosis (enfermedad de Johne), una enfermedad que se presenta en particular en los rumiantes. La subespecie MAP también se ha podido detectar, además de en los rumiantes y los seres humanos, en otras especies animales, especialmente en animales silvestres, entre otros en conejos, aves, gatos salvajes, mapaches y ratas. También se está debatiendo una posible implicación de este agente patógeno en el cuadro clínico "enfermedad de Crohn" del hombre.

El agente patógeno MAP se conoce desde principios del siglo 19 como causante de la paratuberculosis. La paratuberculosis es una enfermedad intestinal crónica que conduce a una pérdida de peso continua durante un período de semanas. En la etapa final, esta enfermedad tiene un resultado fatal. Predominantemente, están infectados los rumiantes domésticos adultos, como las vacas, las ovejas y las cabras, pero también los rumiantes silvestres y los animales de zoológico. Por lo general, la transmisión del agente patógeno tiene lugar principalmente en terneros recién nacidos y terneros hasta una edad de 6 meses. En este caso, la infección tiene lugar principalmente de forma desapercibida y no es reconocida por la vía oral-fecal, e incluso la leche del calostro de las vacas enfermas puede contener el agente patógeno. Después de un período de latencia de varios años con una excreción de los agentes patógenos que es irregular e incontrolable, la enfermedad aparece típicamente por primera vez en las vacas de edad avanzada. En la actualidad no existe ninguna terapia. En el pasado, las vacunas mostraron un éxito dudoso, por lo que actualmente no se utilizan en Alemania. Frecuentemente, la compra de animales infectados de forma subclínica o persistente es responsable de las nuevas infecciones dentro de un rebaño. Son precisamente los portadores clínicamente inadvertidos así como los excretores no reconocidos los que son la causa más importante de continuas infecciones permanentes de la población. Precisamente debido a la amplia distribución de la paratuberculosis y las pérdidas económicas, existe actualmente una demanda de métodos diagnósticos mejorados y de desarrollo de programas de control. En Alemania, la paratuberculosis es de reporte obligatorio según el §78a Art. 2 de la Ley de Epizootias.

El diagnóstico de la paratuberculosis es un elemento significativo en la lucha y el reconocimiento precoz de la paratuberculosis. Existen ya varios procedimientos de ensayo y de diagnóstico que se basan en ensayos basados en anticuerpos, por ejemplo. Sin embargo, un problema de los ensayos comercialmente disponibles es la falta de sensibilidad y de especificidad. Además, los ensayos basados en anticuerpos no son tampoco adecuados, ya que los excretores serológicamente negativos pueden permanecer en los rebaños debido a la falta de sensibilidad de estos ensayos y, de este modo, se puede continuar propagando la enfermedad.

Para poder implementar en el futuro un programa efectivo de erradicación, es necesaria una detección fiable de los agentes patógenos. Se han debatido frecuentemente procedimientos biológicos moleculares, en particular procedimientos basados en una amplificación de los ácidos nucleicos. En particular, los procedimientos de biología molecular basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se consideran muy prometedores. La PCR es un método rápido y fiable para confirmar el ADN de MAP en muestras sospechosas. Como regiones particularmente adecuadas del genoma de MAP, se han identificado la secuencia de inserción IS900, pero también regiones de ISMav2, hspX y F57. El elemento de inserción IS900 en particular destaca como una región adecuada para el diagnóstico molecular, en particular con ayuda de métodos de PCR.

IS900 es un fragmento de 1451 pb que tiene 17 copias dentro del genoma de la cepa de referencia MAP-K10. Debido a este alto número de copias, se puede conseguir una mayor sensibilidad en el procedimiento de detección y hace que IS900 sea una región diana adecuada. Se han descrito PCRs convencionales y en tiempo real (PCR en tiempo real) para la detección de MAP, basándose en la secuencia diana IS900.

De este modo, el documento DE102007015775A1 contiene oligonucleótidos adecuados para la detección específica de MAP. Además, este documento describe procedimientos y kits de ensayo correspondientes para la detección de MAP. A partir del documento EP 2 009 118 A2, se conoce a su vez un procedimiento para la detección y la cuantificación de MAP basándose en cebadores específicos de IS900 y F57.

Sin embargo, los procedimientos descritos en ese documento todavía siguen teniendo una falta de sensibilidad en caso de una especificidad elevada.

5 Bull et al., 2007, PlosOne, 11, e1229, describen un ensayo de PCR en tiempo real para detectar MAP. Münster P. et al., 2011, Vet Microbiol, 154(1-2), 197-201, describen una PCR semianidada (snPCR, del inglés "semi-nested") para detectar MAP. Se describe una sensibilidad elevada. Sin embargo, una snPCR requiere la realización de dos rondas de PCR. La snPCR es conocida como un procedimiento en el que existe un alto riesgo de contaminación y, por lo tanto, no es adecuada para un uso rutinario con un alto rendimiento de muestras.

10 Sin embargo, es necesario detectar individuos infectados con alta sensibilidad y gran especificidad para llevar a cabo un programa de erradicación apropiado. En particular, este procedimiento también se debe poder llevar a cabo en muestras biológicas como heces, órganos, leche y tejidos sin tener que realizar un cultivo previo extensivo, el cual requiere hasta 16 semanas, o llevar a cabo unas etapas de preparación.

Además, este procedimiento debe ser adecuado para permitir una automatización apropiada. Los procedimientos descritos en el estado de la técnica no lo permiten.

Descripción de la invención

15 En un primer aspecto, la presente solicitud se refiere a un procedimiento para la detección específica, opcionalmente, para la cuantificación de *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis* (MAP) en una muestra de un individuo. Para ello, el procedimiento de acuerdo con la invención comprende la etapa de detectar la región IS900 de un genoma de MAP en una muestra mediante una amplificación del ácido nucleico, en donde esta amplificación se realiza con los oligonucleótidos específicos que comprenden respectivamente al menos 15 nucleótidos consecutivos de las secuencias de acuerdo con Seq. ID nº 1 y Seq. ID nº 2, y una detección de la región IS900 en al menos un genoma de MAP indica la presencia de MAP en la muestra.

20 Se descubrió entonces que los oligonucleótidos específicos, tal como se usan en esta memoria, a saber, los oligonucleótidos que tienen respectivamente al menos 15 nucleótidos consecutivos de las secuencias de acuerdo con Seq. ID nº 1 y Seq. ID nº 2, permiten una especificidad y sensibilidad destacadas frente a MAP en procedimientos de diagnóstico basados en una amplificación del ácido nucleico.

25 Para ello es preferible que los oligonucleótidos de acuerdo con Seq. ID nº 1 y/o Seq. ID nº 2, independientemente entre sí, tengan al menos 16, tal como 17 o 18, nucleótidos consecutivos, y en particular, al menos 19 nucleótidos de estas dos secuencias. Es más preferible que al menos uno de los oligonucleótidos específicos de acuerdo con Seq. ID nº 1 y/o Seq. ID nº 2 tenga al menos 11, 12, 13, 14, 15, en particular al menos 16, 17, 18, 19 nucleótidos o todos los nucleótidos de las secuencias mencionadas. Está claro que también se incluyen realizaciones en las que un oligonucleótido, por ejemplo, tiene al menos 18 nucleótidos de la secuencia de acuerdo con Seq. ID nº 1 y al menos 19 nucleótidos de la secuencia de acuerdo con Seq. ID nº 2. Cada variación está incluida en el alcance de esta invención.

30 El procedimiento para la amplificación del ácido nucleico es preferiblemente una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta puede ser en particular una PCR en tiempo real (en inglés, "real-time PCR"). La PCR, por ejemplo en forma de una PCR en tiempo real, es en particular una PCR cuantitativa.

35 En contraste con procedimientos conocidos que también están basados en una PCR, ahora es posible con los oligonucleótidos de acuerdo con la invención como pareja de cebadores, obtener resultados significativos en un ciclo de amplificación. Los procedimientos conocidos hasta la fecha, usualmente se basan en los procedimientos denominados "PCR anidada" o "PCR semianidada". En estos casos, la amplificación tiene lugar en dos etapas, es decir, el procedimiento dura más y es más caro que un procedimiento de una sola etapa. Otras ventajas de la PCR en tiempo real son la posibilidad de una cuantificación del ADN de MAP, una implementación rápida con bajo riesgo de contaminación y la garantía de una sensibilidad y especificidad elevadas.

40 Es especialmente preferible que en la amplificación del ácido nucleico, tal como con la PCR, en particular la PCR en tiempo real y especialmente preferente en la PCR cuantitativa, la detección de la región IS900 se efectúe por medio de una sonda de ácido nucleico. Esta sonda de ácido nucleico es un oligonucleótido marcado usualmente con una etiqueta o un marcador que se hibrida con la región IS900 del genoma de MAP y/o con un ácido nucleico complementario a la región IS900 del genoma de MAP.

45 En el presente documento, se entiende por hibridación que una molécula de ácido nucleico, tal como la sonda de ácido nucleico, se une al menos a otra molécula de ácido nucleico, en este caso un fragmento génico amplificado, en donde en la región de unión, las dos hebras individuales de los ácidos nucleicos son en esencia totalmente complementarias. También se pueden formar hélices triples entre la sonda de ácido nucleico y el ADN de cadena doble existente. Los procedimientos de hibridación habituales son conocidos por el experto en la técnica. En particular, las regiones que se van a hibridar son al menos 70% complementarias, tal como al menos 75%, en particular al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, tal como al menos 95%, en particular al menos 99%, tal como totalmente complementarias.

En una realización preferida, el ácido nucleico es un oligonucleótido con al menos 15 nucleótidos consecutivos de acuerdo con Seq. ID nº 3. Es preferible que la sonda sea una con al menos 16, 17 o 18 nucleótidos consecutivos de acuerdo con Seq. ID nº 3, preferiblemente 19 nucleótidos, tal como mismamente la secuencia Seq. ID nº 3 con 20 nucleótidos.

5 Para ello, la sonda se marca de una manera usual con una etiqueta o un marcador que permite una detección sencilla con procedimientos conocidos. Las etiquetas o marcadores usuales son conocidos por el experto en la técnica, tales como colorantes fluorescentes, por ejemplo, FAM (5 o 6 carboxifluoresceína), VIC, NID, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC), 6-carboxi-2',4',7',4,7-hexaclorofluoresceína (HEX), colorantes de cianina tales como Cy3, Cy5, etc., colorantes de rodamina, colorantes de fenantridina y otros colorantes bien conocidos por el
10 experto en la técnica. Particularmente adecuados para la detección de sondas son FAM y Black-Hole-Quencher-1 (BHQ1).

Para cada protocolo de amplificación de ácido nucleico, tal como PCR, PCR en tiempo real y en particular para PCR cuantitativa, los colorantes adecuados en combinación con los sistemas de amplificación adecuados son conocidos por el experto en la técnica.

15 En el caso de PCR en tiempo real, se mezclan por adición de forma alterna los colorantes fluorescentes inactivos, por ejemplo, extinguidos, que se activan mediante la producción de ADN. Los colorantes habituales que pueden estar intercalados con el ADN de hebra doble sintetizado, son, por ejemplo, bromuro de etidio o verde SYBR. Cuando se utiliza el sistema TaqMan para la amplificación de ácidos nucleicos, las sondas de ácido nucleico son aquellas que son detectables por hidrólisis, por ejemplo, mediante la determinación de la fluorescencia
20 correspondiente. Otros sistemas adecuados que se basan y son conocidos por el experto en la técnica son, por ejemplo, sondas LightCycler, sondas FRET, balizas moleculares o cebadores de escorpión. Para el procedimiento de amplificación de ácido nucleico es especialmente preferible una PCR cuantitativa en tiempo real con cebadores de acuerdo con Seq. ID nº 1 y Seq. ID nº 2 y una sonda de ácido nucleico de acuerdo con Seq. ID nº 3.

25 En el procedimiento de acuerdo con la invención y también en los kits de ensayo de acuerdo con la invención, también pueden estar presentes controles apropiados. Estos controles incluyen controles para la amplificación y/o controles para la purificación. Estos controles pueden estar presentes, por ejemplo, en la propia muestra o se realizan en una preparación paralela. De este modo, por ejemplo, la sonda en la PCR en tiempo real puede estar equipada con un colorante desactivado tal como FAM. Al mismo tiempo, la sonda está equipada con un segundo
30 marcador que se puede detectar en una región diferente a la del colorante inactivado, por ejemplo, emite luz en una región diferente y no está inactivado. De este modo, es posible un control de la PCR. Además, un control positivo tal como β -actina se puede amplificar en la muestra o de forma paralela a la misma. Su detección se efectúa con un marcador que es diferente del primer y segundo marcadores, por ejemplo, un colorante Cy5. De este modo, se puede controlar la reacción y se puede mejorar la validez del procedimiento. Para el control de la amplificación, que
35 excluye el efecto inhibitorio de una muestra clínica, se puede integrar un segundo colorante fluorescente (por ejemplo, HEX, medido a 533-580 nm) para la sonda.

Además, para la cuantificación se pueden usar controles positivos adecuados para MAP en concentraciones predeterminadas en preparaciones paralelas. Las preparaciones experimentales apropiadas son conocidas por el experto en la técnica.

40 La amplificación del ácido nucleico se efectúa preferiblemente a partir de una muestra de un individuo. En este caso, la muestra sometida a amplificación del ácido nucleico puede ser una muestra que comprende un gran número de muestras agrupadas, con el fin de permitir así una prueba eficaz de MAP. Normalmente, una muestra agrupada puede ser una mezcla de, por ejemplo, 10 a 20 muestras individuales de diferentes individuos. Alternativamente, la muestra es una muestra de un solo individuo.

45 En la presente se entiende particularmente por individuo, un individuo seleccionado a partir de animales rumiantes, en particular vacas, ovejas y cabras o también rumiantes silvestres, tales como la cebra, etc. En este caso también se puede tratar, por ejemplo, de animales de zoológico. A través de la expresión individuo también se entiende personas. Por lo tanto, el procedimiento se puede usar, por ejemplo, para someter a ensayo una infección con MAP en una persona, por ejemplo, en relación con el diagnóstico de la enfermedad de Crohn.

50 La muestra misma se puede seleccionar a partir de una muestra de heces, leche, sangre, esperma, tejidos u órganos. Alternativamente, también son posibles muestras ambientales, por ejemplo muestras vegetales o muestras de instalaciones de biogás y aguas.

La muestra es preferiblemente una muestra de heces o una muestra de leche de un rumiante, en particular de una vaca.

55 También, de acuerdo con la invención, la muestra se puede procesar por procedimientos adecuados. Los procedimientos usuales incluyen el procesamiento de la muestra. Los procedimientos adecuados son conocidos por el experto en la técnica. En particular, el procesamiento se puede efectuar mediante métodos conocidos de extracción de ADN. Estos incluyen el uso de kits conocidos basados en tensioactivos y sales. Además, son posibles métodos de extracción mecánica de ADN, incluyendo un procesamiento usando homogeneizadores, etc. En

particular, son adecuados los procedimientos que incluyen el uso de tensioactivos para la extracción.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a kits de ensayo para la detección específica de MAP en una muestra mediante procedimientos de amplificación, en particular mediante PCR. Estos kits de ensayo incluyen oligonucleótidos para la amplificación de la región IS900 de MAP con al menos 15 nucleótidos consecutivos de acuerdo con Seq. ID nº 1 y 2, respectivamente. Este kit de ensayo es preferiblemente uno para la amplificación de ácido nucleico con PCR, en particular uno para la PCR en tiempo real. En una realización especialmente preferida, el kit de ensayo es uno adecuado para la PCR cuantitativa, tal como la PCR cuantitativa en tiempo real. En una realización, el kit de ensayo incluye además un oligonucleótido con al menos 15 nucleótidos consecutivos de la sonda de ácido nucleico de acuerdo con Seq. ID nº 3. Este kit de ensayo es particularmente adecuado para el análisis cuantitativo, por ejemplo, basándose en la PCR TaqMan. El kit de ensayo de acuerdo con la invención puede contener además componentes adicionales para realizar la amplificación del ácido nucleico, en particular las enzimas, nucleótidos y tampones necesarios. Además, también puede estar incluido preferentemente un control positivo y/o instrucciones para llevar a cabo el procedimiento de acuerdo con la invención.

Por último, el kit de ensayo puede contener reactivos y medios correspondientes que son apropiados para la extracción de ADN genómico a partir de las muestras, en particular muestras de heces, leche, sangre, espermatozoides, órganos, tejidos y entorno, y/o medios para realizar la PCR, en particular una PCR en tiempo real.

Los reactivos y los medios adecuados son conocidos por el experto en la técnica.

Finalmente, la solicitud se refiere a oligonucleótidos para una detección específica y, opcionalmente, una cuantificación de MAP en una muestra de un individuo, en donde al menos 15 nucleótidos consecutivos de la secuencia Seq. ID nº 1 y al menos 15 nucleótidos consecutivos de la secuencia Seq. ID nº 2 están presentes y, opcionalmente, al menos 15 nucleótidos consecutivos de la secuencia Seq. ID nº 3.

Estos oligonucleótidos son particularmente adecuados en el uso para la detección específica y opcionalmente para la cuantificación de MAP, en particular mediante una PCR cuantitativa en tiempo real. Los oligonucleótidos de acuerdo con la invención son aquellos como los mencionados anteriormente.

La invención se explica con más detalle a continuación, por medio de ejemplos, sin estar limitada a los mismos.

Ejemplo de realización

Para comprobar la especificidad de los cebadores de acuerdo con la invención (MAP_{523-542f}/MAP_{661-642r}) y la sonda TaqMan (MAP_{617-636p}) de acuerdo con la Tabla 1, 14 especies de micobacterias así como 14 especies de no micobacterias que se presentan frecuentemente en la agricultura y en el medio ambiente, se sometieron a ensayo tanto en la PCR clásica como en la PCR en tiempo real y se confirmó la especificidad (Tabla 2). La Figura 1 muestra la posición de los cebadores de acuerdo con la invención frente a los cebadores del estado de la técnica.

Tabla 1: Secuencias de ácidos nucleicos del cebador y de la sonda TaqMan para la detección del ADN de MAP en la PCR en tiempo real.

Cebador/ sonda	Secuencia (5'-3')	Localización/ Seq.ID.No.*
MAP _{523-542f}	TACCGCGGCGAAGGCAAGAC	523-542/ 1
MAP _{661-642r}	CGGAACGTCGGCTGGTCAGG	661-642/ 2
MAP _{617-636p}	ATGACATCGCAGTCGAGCTG	617-636/ 3

* De acuerdo con la secuencia publicada de IS900, MAP K-10 (GenBank: AF416985), Seq. ID No. 4.

TABLA 2: Cepas de referencia utilizadas para la detección de la especificidad de la PCR en tiempo real TaqMan.

Especies bacterianas	Nombre/Fuente
Especies de micobacterias	
<i>M. avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i>	ATCC 19698
<i>M. avium</i> ssp. <i>avium</i>	ATCC 15769
<i>M. avium</i> ssp. <i>avium</i>	ATCC 19421
<i>M. avium</i> ssp. <i>avium</i>	ATCC 25291
<i>M. avium</i> ssp. <i>silvaticum</i>	ATCC 49884
<i>M. bovis</i>	ATCC 27289
<i>M. fortuitum</i>	ATCC 6841

Especies bacterianas	Nombre/Fuente
Especies de micobacterias	
<i>M. gordonae</i>	ATCC 14470
<i>M. intracellulare</i>	ATCC 13950
<i>M. kansasii</i>	ATCC 12478
<i>M. marinum</i>	ATCC 927
<i>M. phlei</i>	ATCC 354
<i>M. scrofulaceum</i>	ATCC 19981
<i>M. smegmatis</i>	ATCC 19420
Otras especies bacterianas	
<i>Campylobacter jejuni</i>	ATCC 33560
<i>Clostridium perfringens</i>	Vaca
<i>Clostridium sordellii</i>	Vaca
<i>Escherichia coli</i> 0101:K28	Vaca
<i>Escherichia coli</i> 0149:K91	Cerdo
<i>Escherichia coli</i> 0157:H7	ATCC 700927
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 19433
<i>Enterococcus hirae</i>	ATCC 10541
<i>Rhodococcus equi</i>	ATCC 25694
<i>Salmonella choleraesuis</i>	Vaca
<i>Salmonella typhimurium</i>	Vaca
<i>Staphylococcus aureus</i>	Vaca
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	Vaca
<i>Streptococcus uberis</i>	Vaca

5 El ADN utilizado de las cepas de referencia se extrajo de los cultivos mediante el kit QIAamp Blood (Quiagen, Hilden, Alemania) y se midió mediante Nano-Drop® (Espectrofotómetro ND-1000, peQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen). El ADN se ajustó a 1 ng/µl. El ADN específico de especie de las cepas de referencia se confirmó mediante el uso de procedimientos de PCR publicados. Se utilizó agua destilada, estéril como control negativo.

En todos los casos, los productos de la PCR que se esperaban de la PCR específica de género se podían reconocer claramente en el gel de agarosa.

10 Para clarificar la especificidad, se sometió a ensayo la reactividad cruzada de ambos cebadores (MAP_{523-542f}/MAP_{661-642r}) con otras especies bacterianas en la PCR clásica (Figura 2). Para la preparación de la PCR, se utilizaron "perlas" de PCR "Ready-To-Go®" (Amersham Pharmacia Biotech Europe, Friburgo). Las mezclas de reacción y las condiciones de la PCR utilizadas eran las siguientes:

Perlas de PCR Ready-To-Go®	1 perla
Agua dest.	21 µl
Cebador MAP-directo (10 pmol/µl)	1 µl
Cebador MAP-inverso (10 pmol/µl)	1 µl
Molde	2 µl

A la PCR precede una etapa de desnaturalización a 95°C durante 4 minutos.

Desnaturalización:	95°C,	30 s
Reasociación:	58-70°C,	30 s
Elongación:	72°C,	60 s

La prolongación de la elongación a 72°C durante 7 minutos constituye el final de la PCR.

5 Los productos de la PCR de 139 pb esperados se pueden reconocer claramente sobre el gel de agarosa y solo con la muestra de ADN de MAP (ATCC 19698). No se observaron productos de amplificación en la región de 139 pb en otras especies bacterianas (n = 14). Por lo tanto, los cebadores utilizados (MAP_{523-542f}/MAP_{661-642r}) se pueden considerar específicos de MAP.

10 Además, la especificidad se confirmó secuenciando el producto de 139 pb de longitud. Para ello, se clonaron los productos de la PCR en el vector plasmídico pCR[®] 2.1-TOPO[®] (Invitrogen, Groningen, Países Bajos), se multiplicaron en bacterias *E. coli* y se purificaron con el Sistema de Purificación Wizard[®] Plus SV Minipreps (Promega, Mannheim). Las secuencias de nucleótidos se compararon con la secuencia de la cepa de referencia de MAP K-10 (número de orden AE16958) por medio de MegAlign. Se secuenció y se evaluó un total de 15 clones en ambas direcciones. Las secuencias de IS900 de los productos de amplificación coincidieron en un 100% con la secuencia de MAP K-10 bovina publicada.

15 Después de que la especificidad de los cebadores (MAP_{523-542f}/MAP_{661-642r}) se había comprobado en la PCR clásica, basándose en las cepas de referencia (n = 14), la especificidad de la sonda (MAP_{617-636p}) tenía que confirmarse en combinación con los cebadores en la PCR en tiempo real. Como control negativo, se utilizó agua destilada, estéril. La mezcla de reacción así como las condiciones de reacción de la PCR en tiempo real con la sonda TaqMan en el LightCycler[®] 480 (Roche Diagnostics, Mannheim) fueron las siguientes:

Light Cycler [®] DNA 480 Master	10 µl
Cebador MAP-directo (10 pmol/µl)	0,5 µl
Cebador MAP-inverso (10 pmol/µl)	0,5 µl
Sonda (10 pmol/µl)	1 µl
Agua dest.	3 µl
Molde	5 µl

95°C	10 min	
95°C	15 s	
60°C	30 s	45 ciclos
72°C	35 s	

20 La Figura 3 muestra la detección de MAP mediante la sonda TaqMan (MAP_{617-636p}).

La especificidad para MAP de los cebadores (MAP_{523-542f}/MAP_{661-642r}) y de la sonda TaqMan (MAP_{617-636p}) se pudo justificar adecuadamente. Solo era visible una señal con la cepa de referencia MAP (ATCC 19698). La reacción de las otras especies bacterianas era comparable con el control negativo.

25 Para una mayor claridad de la especificidad, se sometieron a ensayo los cebadores (MAP_{523-542f}/MAP_{661-642r}) así como la sonda TaqMan (MAP_{617-636p}) con respecto a la reactividad cruzada con otras especies de micobacterias (n = 13).

30 El ADN empleado de las cepas de micobacterias de referencia se purificó a partir de cultivos como se ha descrito anteriormente y se sometió a ensayo mediante Nano-Drop[®]. El ADN se ajustó a una concentración de 1 ng/µl. El ADN específico de especie de las cepas de referencia se confirmó mediante el uso de un procedimiento publicado de PCR "multiplexada" (Shin et al., 2010, Journal of Clinical Microbiology 48 (11), 4057-4062). Como control negativo, se utilizó agua destilada, estéril. La mezcla de reacción y las condiciones de reacción fueron como las indicadas en la bibliografía.

35 Los productos de la PCR que se esperaban de las diversas especies de micobacterias se podían reconocer claramente sobre el gel de agarosa. Para una mayor clarificación de la especificidad de los cebadores (MAP_{523-542f}/MAP_{661-642r}), se sometió a ensayo en los mismos la reactividad cruzada con otras especies de micobacterias en la PCR clásica (Figura 4).

40 Los productos de la PCR de 139 pb esperados se podían reconocer claramente sobre el gel de agarosa solo en el caso del ADN de MAP (ATCC 19698). Los productos de la amplificación en la región de 139 pb no se presentaban con otras especies de micobacterias (n = 13). Por lo tanto, los cebadores utilizados (MAP_{523-542f}/MAP_{661-642r}) se pueden considerar específicos de MAP en relación con otras especies de micobacterias.

Después de que la especificidad de los cebadores (MAP_{523-542f}/MAP_{661-642r}) se había comprobado en la PCR clásica, basándose en cepas de micobacterias de referencia (n = 13), se tenía que confirmar la especificidad de la sonda

(MAP_{617-636p}) en combinación con los cebadores en la PCR en tiempo real. Como control negativo, se utilizó agua destilada, estéril. La mezcla de reacción así como las condiciones de reacción para la PCR en tiempo real con la sonda TaqMan en el LightCycler® 480 fueron como ya se han definido anteriormente.

5 La especificidad para MAP de los cebadores (MAP_{523-542r}/MAP_{661-642r}) y de la sonda TaqMan (MAP_{617-636p}) también se podía justificar adecuadamente frente a otras especies de micobacterias. Solo era visible una señal con la cepa de referencia de MAP (ATCC 19698). La reacción de las otras cepas de micobacterias era comparable con el control negativo.

El límite de detección o la sensibilidad de la PCR en tiempo real TaqMan se desarrolló mediante una serie de titulaciones desde 1 ng/μl a 1 fg/μl de ADN plasmídico y ADN de MAP (ATCC 19698) del cultivo (Figura 5).

10 Para la preparación del ADN plasmídico, se clonaron productos de la PCR (139 pb) y se purificaron como se ha descrito anteriormente. A continuación, se determinó el contenido en ácido nucleico del ADN plasmídico por medio de NanoDrop® y se preparó una serie de diluciones desde 1 ng/μl a 1 fg/μl.

15 Cuando se empleaba ADN de MAP obtenido a partir de un cultivo, se alcanzaba un límite de detección de 10 fg/μl. El genoma de MAP tiene una longitud de 4,7 10⁶ pb (Cocito et al., 1994, Clinical Microbiology Reviews 7 (3), 328-345). Utilizando la constante de Avogadro 6,022 10²³ mol⁻¹ y el peso molecular de una pareja de bases de 660 g × mol⁻¹, se podía calcular que 5,15 fg se corresponden con una unidad genómica (Münster et al., 2011, Veterinary Microbiology 154, 197-201, Münster et al., 2012). De acuerdo con este cálculo, el límite de detección con 10 fg/μl era de aprox. 2 unidades genómicas.

20 Después de comprobar la especificidad y la sensibilidad, se sometió a ensayo la eficacia de la PCR en tiempo real. La eficacia representa una característica de la calidad de una PCR cuantitativa en tiempo real. Comparando los valores de Cp obtenidos y de la concentración de ADN de MAP, se creó una curva estándar. Una curva estándar proporciona la concentración logarítmica del ADN aislado del agente patógeno en los respectivos grados de dilución. La pendiente de la recta era de -3,42 ± 0,23, el error de 0,04 ± 0,02 y la eficacia de 1,97 ± 0,08 (valoración por el método "del máximo de la 2ª derivada"). De este modo, se demostró que la curva estándar lineal era adecuada para un uso cuantitativo de la PCR en tiempo real TaqMan.

25 La capacidad de reproducción de la PCR en tiempo real se determinó a partir de 9 repeticiones en el LightCycler® 480 (3 × 3 ejecuciones) y se evaluó mediante el método "del máximo de la 2ª derivada" y el método de "punto de ajuste". Para la visualización, el valor medio respectivo y la desviación estándar de los "puntos de cruce" (Cp), es decir, el número de ciclos en los que la fluorescencia se eleva por encima de la fluorescencia de fondo, se calcularon y se representaron como un diagrama de barras (Figuras 6 y 7).

30 Se pudo mostrar que la PCR en tiempo real producía resultados reproducibles. Las nueve repeticiones proporcionaron valores medios similares de los valores de Cp, mientras que la desviación estándar era estadísticamente baja (máximo ± 0,73).

35 Una valoración por el método del "punto de ajuste" también obtuvo resultados reproducibles con una sensibilidad constante de 10 fg/μl.

Para comprobar la capacidad de cuantificación de la PCR en tiempo real TaqMan y para ilustrar la concordancia de la concentración de ADN de MAP calculada con la conocida, éstas se calcularon y se compararon en la Tabla 3. Las concentraciones de ADN se calcularon tanto con el método "del máximo de la 2ª derivada" como con el del "punto de ajuste". Con este último, la "banda de ruido de fondo" se fijó manualmente en 6,00 y el "umbral" en 3,00.

40 **TABLA 3** Cuantificación del ADN de MAP a partir de un cultivo con grados de dilución logarítmica mediante PCR en tiempo real TaqMan sobre la base de 9 repeticiones (3 x 3 ejecuciones). La valoración se realizó mediante métodos "del máximo de la 2ª derivada" y de "punto de ajuste".

Muestra	Máximo de la 2ª derivada			Punto de ajuste	
	Conc. conocida	Conc. calculada	valor de Cp	Conc. calculada	valor de Cp
1 ng/μl	10 ⁻⁹	9,17 x 10 ⁻¹⁰	22,79 ± 0,65	1,10x 10 ⁻⁹	21,00 ± 0,62
100 pg/μl	10 ⁻¹⁰	1,25 x 10 ⁻¹⁰	25,76 ± 0,07	1,33 x 10 ⁻¹⁰	23,94 ± 0,34
10 pg/μl	10 ⁻¹¹	9,12 x 10 ⁻¹²	29,61 ± 0,38	7,62 x 10 ⁻¹²	27,88 ± 0,52
1 pg/μl	10 ⁻¹²	8,19 x 10 ⁻¹³	32,82 ± 0,39	7,46 x 10 ⁻¹³	31,11 ± 0,54
100 fg/μl	10 ⁻¹³	1,29 x 10 ⁻¹³	35,18 ± 0,36	1,14 x 10 ⁻¹³	33,73 ± 0,35
10 fg/μl	10 ⁻¹⁴	1,05 x 10 ⁻¹⁴	37,61 ± 0,73	1,26 x 10 ⁻¹⁴	36,80 ± 0,94
1 fg/μl	10 ⁻¹⁵	-	-	-	-
NTC	-	-	-	-	-

Valores similares de las concentraciones de ADN conocidas y calculadas indicaban una capacidad de cuantificación básica del ADN de MAP mediante PCR en tiempo real TaqMan. Incluso cuando se evaluaron las mezclas de reacción de la serie de diluciones del ADN de MAP mediante el método de "punto de ajuste" ("banda de ruido de fondo" 6,00, "umbral" 3,00), con una sensibilidad que permanecía igual, los resultados de las concentraciones calculadas de ADN no se falsificaron.

La estabilidad o la sensibilidad de una PCR puede estar afectada en condiciones de campo cuando el ADN se extrae de heces o de tejidos. La posible acción inhibitoria se excluyó por medio de una serie de diluciones del ADN plasmídico (de 1 ng/μl a 1 fg/μl) que se había mezclado con ADN procedente de heces negativas (Figura 8).

Incluso cuando se presentaron mezclas de reacción de la serie de diluciones de ADN plasmídico con ADN procedente de heces negativas para MAP, con una sensibilidad que permanecía igual, el resultado no estaba falsificado. Para ilustrar la coincidencia de las concentraciones calculadas de ADN de MAP con las conocidas, éstas se calcularon y se compararon en la Tabla 4.

Tabla 4: Concentraciones calculadas y valores de Cp hallados de ADN plasmídico en series de diluciones en diluciones logarítmicas en base 10 (de 1 ng/μl a 1 fg/μl) a través de PCR en tiempo real TaqMan.

Muestra	Conc. conocida	H ₂ O		ADN fecal	
		Conc. calculada	Punto de cruce	Conc. calculada	Punto de cruce
1 ng/μl	10 ⁻⁹	9,63 x 10 ⁻¹⁰	11,61 ± 0,07	9,97 x 10 ⁻¹⁰	13,53 ± 0,12
100 pg/μl	10 ⁻¹⁰	1,08 x 10 ⁻¹⁰	15,27 ± 0,22	1,05 x 10 ⁻¹⁰	16,88 ± 0,02
10 pg/μl	10 ⁻¹¹	9,67 x 10 ⁻¹²	19,22 ± 0,11	9,42 x 10 ⁻¹²	20,47 ± 0,14
1 pg/μl	10 ⁻¹²	7,51 x 10 ⁻¹³	23,33 ± 0,24	9,89 x 10 ⁻¹³	23,83 ± 0,03
100 fg/μl	10 ⁻¹³	9,00 x 10 ⁻¹⁴	26,63 ± 0,15	1,03 x 10 ⁻¹³	27,20 ± 0,07
10 fg/μl	10 ⁻¹⁴	1,14 x 10 ⁻¹⁴	29,75 ± 0,06	9,83 x 10 ⁻¹⁵	30,13 ± 0,17
1 fg/μl	10 ⁻¹⁵	9,85 x 10 ⁻¹⁶	33,33 ± 0,07	1,01 x 10 ⁻¹⁵	32,34 ± 0,03
NTC	-	-	-	-	-

A pesar de la mezcla con ADN de heces negativas para MAP, no se reconoce ningún desplazamiento grave de los valores. Valores similares de las concentraciones de ADN conocidas y calculadas indican una capacidad de uso básica de la PCR en tiempo real TaqMan para cuantificar el ADN de MAP independientemente de las heces de la matriz.

Para tener una amplia capacidad de aplicación de la PCR en tiempo real en el diagnóstico de rutina así como en la investigación, debe estar garantizada la detección del ADN de MAP en diferentes matrices. Para demostrar su uso universal, las muestras tomadas del archivo de diagnóstico de rutina y que ya habían dado como positivas en la PCR "semianidada", se comprobaron dos veces en el LightCycler[®] 480. Se seleccionaron muestras de heces, leche, esperma, sangre, tejidos y entorno (Figura 9).

El ADN de MAP se podía detectar de forma fiable en todas las matrices en ambas ejecuciones. Los valores de Cp para ambas ejecuciones y los valores medios (MW) y la desviación estándar (STBW) se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5: Valores de Cp calculados de las diferentes matrices en el LightCycler[®] 480 con sonda TaqMan.

	Heces	Leche	Esperma	Sangre	Tejidos	Entorno
Ejecución 1	25,07	33,53	27,83	30,00	33,26	29,33
Ejecución 2	26,28	33,34	27,85	29,97	31,88	29,30
MW	25,68 ±	33,44 ±	27,84 ±	29,99 ±	32,57 ±	29,32 ±
STBW	0,86	0,13	0,01	0,02	0,98	0,02

Las muestras de heces, leche, esperma, sangre, tejidos y entorno sometidas a ensayo dieron una señal fluorescente clara con valores de Cp entre 25,07 y 33,53. El resultado era reproducible con desviaciones estándar de 0,02 a 0,98.

Para el uso de la PCR en tiempo real para la detección de paratuberculosis en rumiantes, se pueden utilizar también sistemas de control para la amplificación (por ejemplo, canal HEX) o extracción (por ejemplo, canal Cy5) que se pueden detectar independientemente a través de otras etiquetas o marcadores. Al mismo tiempo, la extracción exitosa de ácido nucleico se puede detectar, por ejemplo, mediante una amplificación del gen diana β-actina. Otros

sistemas de control para la amplificación o la extracción son conocidos por el experto en la técnica.

El protocolo final para la PCR en tiempo real TaqMan de MAP es el siguiente:

95°C	10 min	
95°C	15 s	
60°C	30 s	40 ciclos
72°C	35 s	

5 En el análisis con un sistema de control para la amplificación y la extracción en el canal FAM (465-510 nm), las muestras tomadas del archivo también proporcionaron una señal fluorescente clara y reproducible con valores medios de Cp entre 23,58 y 33,29 así como desviaciones estándar de 0,02 a 0,98.

El ensayo descrito se evaluó con 13 vacas que habían dado positivo para MAP. Para ello, se extrajo ADN de las muestras fecales y MAP se sometió a ensayo con la PCR en tiempo real descrita. Aquí se mostraba que la prueba podía detectar MAP en muestras fecales.

10 Por último, para confirmar la solidez de la prueba, se analizaron muestras de órganos procedentes de diferentes áreas intestinales de dos vacas. Como se puede observar en las tablas siguientes, el ensayo de acuerdo con la invención es adecuado para la detección de MAP.

15 **Tabla 7:** Uso cuantitativo de la PCR en tiempo real TaqMan de IS900 para la detección de MAP en muestras de tejidos de dos vacas que padecen paratuberculosis. Se muestran los valores de Cp medidos tres veces en el canal FAM (465-510 nm).

Animal	Muestra	Canal FAM (465-510 nm)
Animal A	duodeno	32,68 ± 0,21
	yeyuno	28,00 ± 0,12
	íleon	27,09 ± 0,08
	ciego	25,06 ± 0,04
	Ln cecal	33,00 ± 0,23
Animal B	duodeno	33,79 ± 0,69
	yeyuno	34,33 ± 0,61
	íleon	25,52 ± 0,03
	ciego	24,53 ± 0,03
	Ln cecal	28,86 ± 0,11

Todas las muestras mostraban una curva de amplificación en el canal FAM con valores de Cp de 24,53 a 34,33 y desviaciones estándar de 0,03 a 0,69.

20 Para una valoración cuantitativa, como ya se ha descrito anteriormente, se calculó la concentración de ADN así como las unidades genómicas de MAP por gramo de tejido (Tabla 8) y se presentaron en forma de gráfico (Figura 10).

TABLA 8: Uso cuantitativo de la PCR en tiempo real TaqMan de IS900 para la detección de MAP en muestras de tejidos de dos vacas que padecen paratuberculosis. Para la cuantificación de MAP en los tejidos, se calculó la concentración de ADN y el número de unidades genómicas por gramo de tejido.

Animal	Muestra	Concentración de ADN	MAP / g de tejido
Animal A	duodeno	7,99 x 10 ⁻¹⁴	6,21 x 10 ³
	yeyuno	4,04 x 10 ⁻¹²	3,14 x 10 ⁵
	íleon	8,13 x 10 ⁻¹²	6,32 x 10 ⁵
	ciego	3,57 x 10 ⁻¹¹	2,77 x 10 ⁶
	Ln cecal	5,96 x 10 ⁻¹⁴	4,63 x 10 ³

Animal	Muestra	Concentración de ADN	MAP / g de tejido
Animal B	duodeno	$3,27 \times 10^{-14}$	$2,54 \times 10^3$
	yeyuno	$1,91 \times 10^{-14}$	$1,48 \times 10^3$
	íleon	$2,57 \times 10^{-11}$	$2,00 \times 10^6$
	ciego	$5,17 \times 10^{-11}$	$4,02 \times 10^6$
	Ln cecal	$2,05 \times 10^{-12}$	$1,59 \times 10^5$

En un estudio de validación, los kits comercialmente disponibles para la PCR de MAP de Adiavet (Adiavet ParaTB Realtime), AB-TaqMan (Applied Biosystems Taq-ManMAP) y Vetmax (Applied Biosystems VetMax MAP Real Time PCR Screening Kit), así como un ensayo de PCR publicado en Bull et al. (Tim J. Bull et al., 2007, PloS One 2007(11), e1229), se sometieron a un ensayo comparativo con la PCR en tiempo real descrita en este documento. Esto se realizó con los kits comercialmente disponibles, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Como referencia, se utilizó una PCR semianidada (snPCR) (Münster P. et al., Vet Microbiol. 2011: 154(1-2): 197-201). Con la detección de 1 unidad genómica, posee la sensibilidad más alta y es superior a todos los procedimientos "en tiempo real" en cuanto a sensibilidad. Sin embargo, a partir del estado de la técnica general es sabido que tales snPCRs no son adecuadas para aplicaciones rutinarias debido al riesgo de contaminación extremadamente alto por rendimiento de masa.

Las ejecuciones de la PCR se llevaron a cabo en un aparato Roche LightCycler 480. La snPCR se realizó de forma convencional en un termociclador convencional (Biometra "Trio").

Como muestras del ensayo, estaban disponibles 14 muestras fecales que dieron negativo por medio de una PCR semianidada (sn-PCR) y 35 muestras fecales que dieron positivo a partir de un diagnóstico de rutina (N = 49).

Los resultados de la prueba se resumen en la Tabla 9 para las muestras fecales que dieron positivo. Se promediaron los valores de Cp de dos pruebas. Si estaban disponibles los resultados de una sola prueba, éstos se utilizaron para los análisis posteriores. La validación en la Tabla 9 muestra la diferencia entre los valores de Cp. En primer lugar, la PCR en tiempo real TaqMan se comprobó en comparación con todas las PCRs comercialmente disponibles. Para ello, en cada caso, se restó el "valor de Cp de las muestras de PCR TaqMan" correspondiente del "valor de Cp de las muestras de PCR comparativa" correspondiente. Un valor positivo en la columna correspondiente indica que el valor de Cp de las muestras de PCR TaqMan era mayor que el valor comparativo restado. Por consiguiente, la PCR tenía una sensibilidad peor que la PCR comparativa, ya que según la definición, cuanto menor es el valor de Cp, mayor es la sensibilidad. De forma similar, se realizó una comparación entre la PCR TaqMan y la PCR publicada de Bull et al., en donde el volumen final en la PCR en tiempo real TaqMan se correspondía con la PCR descrita por Bull et al. (en cada caso, 50 µl en lugar de 20 µl).

El estudio comparativo llega a la conclusión de que las PCRs en tiempo real recién desarrolladas eran todas superiores a las PCRs comparativas. [La PCR en tiempo real TaqMan Plus en la versión clásica (5 µl de molde) ganó a todas las PCR comparativas. También era escasamente superior a su propia modificación con 8 µl de molde].

Tabla 9:

Resultados del estudio de validación					
Nº de ejec.	snPCR	Taq-Man	TaqMan	Taq-Man	Taq-Man
		Adiavet	ABTaqMan	Vetmax	Bull et al.
1	+	-7,55	-2,92	-2,06	-5,31
2	+	-7,44	-2,91	-2,00	-5,59
3	+	-2,73	-1,54	-1,02	-4,62
4	+	-2,67	-1,23	-0,79	-4,30
5	+	-6,95	-2,42	-1,23	-4,57
6	+	-3,65	-1,61	-0,47	-3,37
7	+	-10,07	-1,39	0,74	-2,32
8	+	-6,49	-2,31	-1,37	-4,44
9	+	-7,95	-8,10	-10,97	-4,89

Resultados del estudio de validación					
Nº de ejec.	snPCR	Taq-Man	TaqMan	Taq-Man	Taq-Man
		Adiavet	ABTaqMan	Vetmax	Bull et al.
10	+	-2,19	-1,82	-6,31	-0,27
11	+	-4,85	-10,82	-13,86	-8,96
12	+	-2,56	-7,86	-13,82	-7,72
13	+	-9,21	-9,43	-12,34	-3,61
14	++	0,41	2,75	1,73	-2,59
15	++	-3,85	-0,28	-1,40	-4,75
16	+	-11,20	-11,20	-11,20	-4,39
17	+	-11,95	-11,95	-11,95	-4,36
18	+	3,59	9,85	8,76	5,59
19	+	-10,11	-10,11	-10,11	-2,92
20	+	-12,24	-12,24	-12,24	-5,77
21	+	-12,34	-13,03	-13,03	-3,17
22	+	-6,48	-6,48	-6,48	-6,48
23	+	0,00	8,07	6,93	4,29
24	+	2,94	2,81	0,00	0,73
25	+	-8,91	-9,15	-11,62	-9,78
26	+	0,00	0,00	0,00	5,98
27	+	3,05	2,88	0,00	5,21
28	+	-12,30	-12,30	-12,30	-4,65
29	+	0,00	0,00	0,00	1,63
30	+	0,00	0,00	0,00	1,91
31	+	-13,52	-13,52	-13,52	/
32	+	-11,59	-11,59	-11,59	/
33	+	-10,40	-10,40	-10,40	-10,40
34	+	0,00	0,00	0,00	0,00
35	+	0,00	0,00	0,00	0,00
	mejor	25/35	25/35	24/35	24/33
	igual	6/35	5/35	7/35	2/33
	peor	4/35	5/35	4/35	7/33

La comparación anterior muestra claramente que el procedimiento de acuerdo con la invención con los cebadores de acuerdo con la invención, es superior en la sensibilidad a los procedimientos descritos en el estado de la técnica y a los kits de ensayo comercialmente disponibles.

5 Breve descripción de las Figuras

Figura 1: Representación gráfica de los cebadores utilizados (MAP_{523-542f}/MAP_{661-642r}) así como de documentos de patente de IS900.

Figura 2: Aclaración de la especificidad de los cebadores (MAP_{523-542f}/MAP_{661-642r}) con especies no micobacterianas. Para este propósito, se separaron productos de PCR amplificados mediante electroforesis en gel (1,5% de gel de agarosa).

- Figura 3:** Determinación de la especificidad de la PCR en tiempo real TaqMan en el Light Cycler® 480 utilizando cepas de referencia (n = 14).
- Figura 4:** Aclaración de la especificidad de los cebadores (MAP_{523-542f}/MAP_{661-642r}) con otras especies de micobacterias. Para este propósito, se separaron productos de PCR amplificados mediante electroforesis en gel (1,5% de gel de agarosa).
- Figura 5:** Determinación de la especificidad de la PCR en tiempo real mediante el ADN de MAP de ATCC 19698. **A:** 1 ng/μl, **B:** 100 pg/μl, **C:** 10 pg/μl, **D:** 1 pg/μl, **E:** 100 fg/μl, **F:** 10 fg/μl, **G:** 1 fg/μl, **NTC:** agua estéril.
- Figura 6:** Capacidad de reproducción de la PCR en tiempo real TaqMan basándose en 9 repeticiones (3x3 ejecuciones) (eficacia = $1,97 \pm 0,08$; error = $0,04 \pm 0,02$). La valoración se llevó a cabo por el método "del máximo de la 2ª derivada".
- Figura 7:** Capacidad de reproducción de la PCR en tiempo real TaqMan basándose en 9 repeticiones (3x3 ejecuciones) (eficacia = $2,07 \pm 0,09$; error = $0,18 \pm 0,03$). La valoración se llevó a cabo por el método de "punto de ajuste".
- Figura 8:** Representación gráfica de las curvas de amplificación de las series de diluciones de ADN plasmídico (de 1 ng/μl a 1 fg/μl) mezclado con H₂O (**A**) y ADN fecal (**B**) en el LightCycler® 480 con una sonda TaqMan. Curvas de izquierda a derecha: 1 ng/μl, 100 pg/μl, 10 pg/μl, 1 pg/μl, 100 fg/μl, 10 fg/μl, 1 fg/μl, agua estéril (NTC).
- Figura 9:** Representación gráfica de las curvas de amplificación para la detección de ADN de MAP procedente de diferentes matrices en el LightCycler® 480 con una sonda TaqMan.
- Figura 10:** Aplicación cuantitativa de la PCR en tiempo real TaqMan de IS900 para la detección de MAP en muestras de tejido. Comparación del animal A y del animal B. Las barras representan el valor medio y la desviación estándar (3 repeticiones) de la concentración de MAP calculada en diversos tejidos.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la detección específica y opcionalmente la cuantificación de *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) en una muestra de un individuo que comprende la etapa de:
- 5 - detectar la región IS900 de un genoma de MAP en una muestra de un individuo con la ayuda de una amplificación de ácido nucleico, en donde esa amplificación se efectúa con oligonucleótidos específicos que consisten respectivamente en al menos 15 nucleótidos consecutivos de las secuencias según Seq. ID nº 1 y Seq. ID nº 2
- en donde la detección de la región IS900 de al menos un genoma de MAP indica la presencia de MAP en el individuo.
- 10 2. Procedimiento para la detección específica de MAP según la reivindicación 1, en el que la detección se lleva a cabo mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
3. Procedimiento para la detección específica de MAP según la reivindicación 1 o 2, en el que la detección se lleva a cabo mediante una PCR en tiempo real, preferiblemente como una PCR cuantitativa.
- 15 4. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque especialmente en el caso de la PCR, la detección de la región IS900 comprende el uso de una sonda de ácido nucleico que se hibrida con la región IS900 del genoma de MAP y/o con un ácido nucleico complementario a la región IS900 del genoma de MAP.
5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la detección mediante una PCR cuantitativa en tiempo real se lleva a cabo mediante el uso de una sonda procedente de un oligonucleótido con al menos 15 nucleótidos consecutivos según Seq. ID nº 3.
- 20 6. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque la muestra es una procedente de muestras de heces, leche, sangre, esperma, tejidos, órganos y entorno.
7. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque la muestra procede de animales rumiantes, en particular de vacas, ovejas y cabras, o de seres humanos.
- 25 8. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, en el que la detección específica de MAP se lleva a cabo mediante una PCR en tiempo real, y el empleo de los oligonucleótidos según Seq. ID nº 1, Seq. ID nº 2 y Seq. ID nº 3.
9. Kit de ensayo para la detección específica de MAP en una muestra mediante un procedimiento de amplificación, en particular por medio de PCR, caracterizado porque el kit de ensayo comprende oligonucleótidos para la amplificación de la región IS900 de MAP con al menos 15 nucleótidos consecutivos según Seq. ID nº 1 y 2, respectivamente.
- 30 10. Kit de ensayo según la reivindicación 9, caracterizado porque comprende además una sonda con al menos 15 nucleótidos consecutivos según Seq. ID nº 3.
11. Kit de ensayo según la reivindicación 9 o 10, caracterizado porque presenta además medios para la obtención de ADN genómico a partir de muestras, en particular muestras de heces, leche, sangre, esperma, órganos, tejidos y entorno.
- 35 12. Kit de ensayo según una de las reivindicaciones 9 a 11, caracterizado porque presenta además medios para la realización de una PCR, particularmente una PCR en tiempo real.
13. Uso de un kit de ensayo según una de las reivindicaciones 9 a 12, para la detección específica de IS900 de MAP en muestras, en particular muestras de heces, leche, sangre, esperma, tejidos, órganos y entorno en un individuo.
- 40 14. Oligonucleótidos para la detección específica y, opcionalmente, para la cuantificación de MAP en una muestra de un individuo, caracterizados porque los oligonucleótidos tienen las siguientes secuencias de nucleótidos: un oligonucleótido con al menos 15 nucleótidos consecutivos de Seq. ID nº 1, un oligonucleótido con al menos 15 nucleótidos consecutivos de Seq. ID nº 2 y, opcionalmente, un oligonucleótido con al menos 15 nucleótidos consecutivos de Seq. ID nº 3, preferiblemente, los oligonucleótidos según Seq. ID nº 1, Seq. ID nº 2 y Seq. ID nº 3.
- 45 15. Uso de los oligonucleótidos según la reivindicación 14, para la detección específica y, opcionalmente, para la cuantificación de *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP), en particular por medio de una PCR cuantitativa en tiempo real.

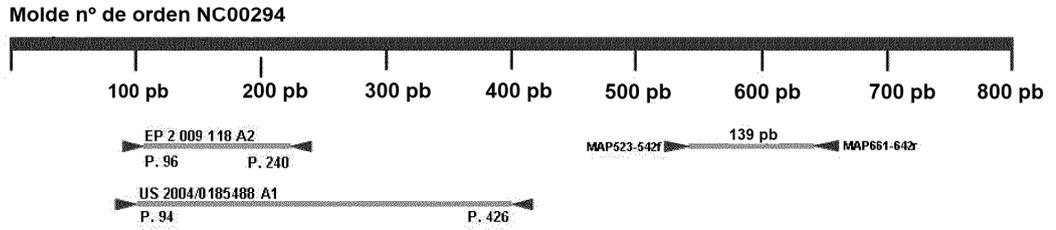


Figura 1

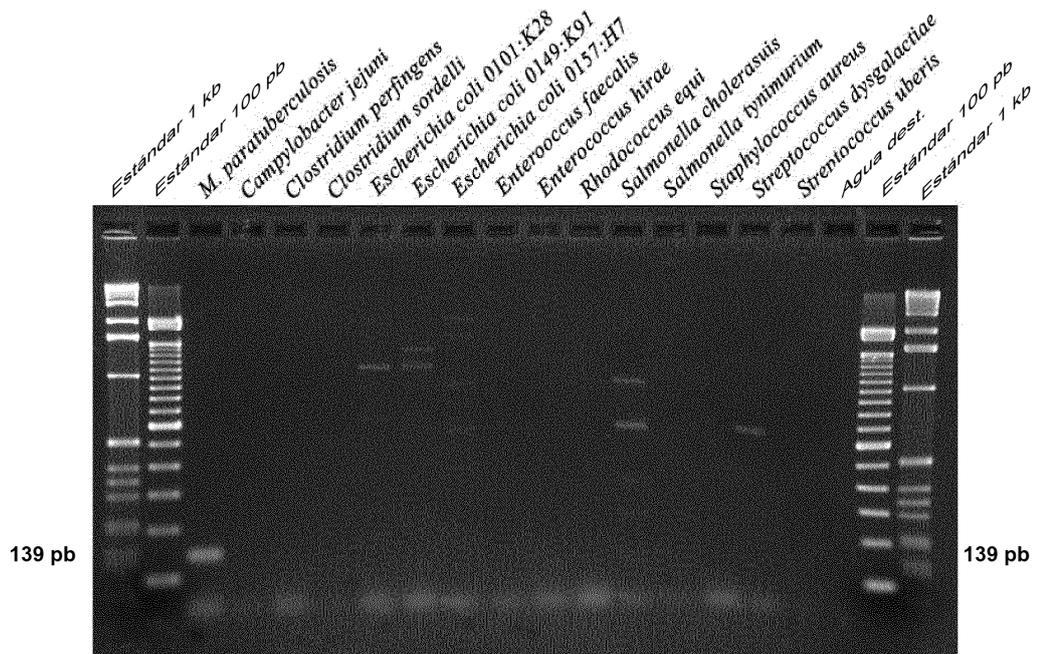


Figura 2

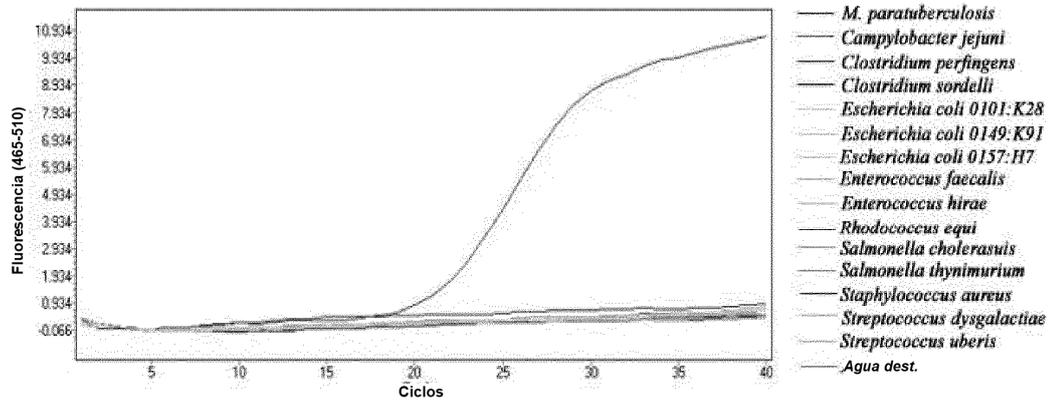


Figura 3

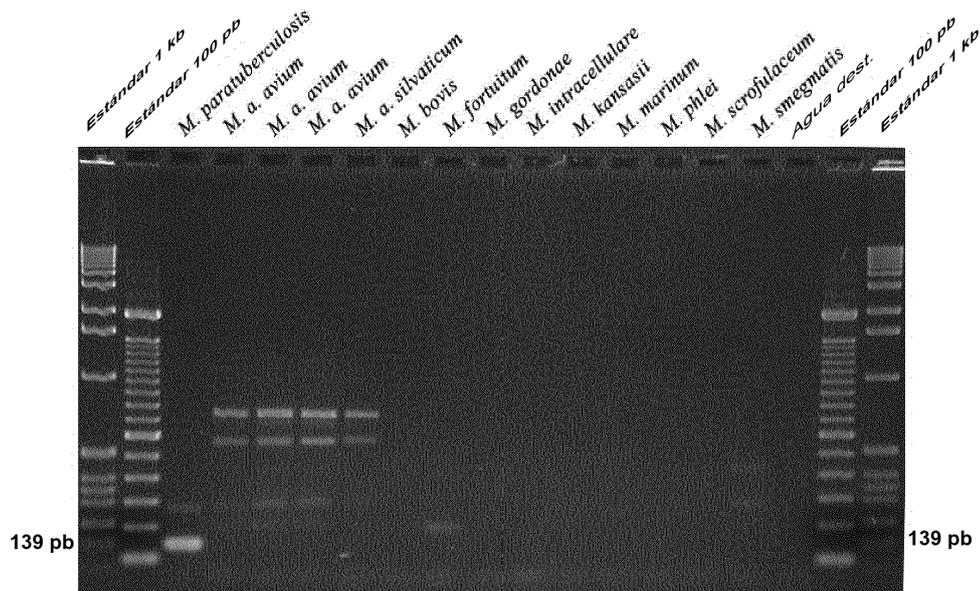


Figura 4

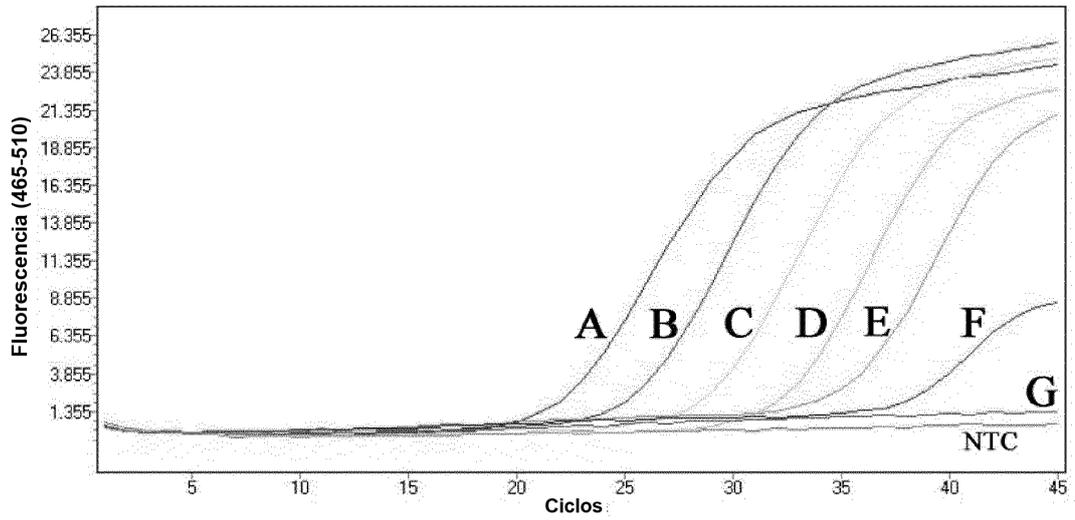


Figura 5

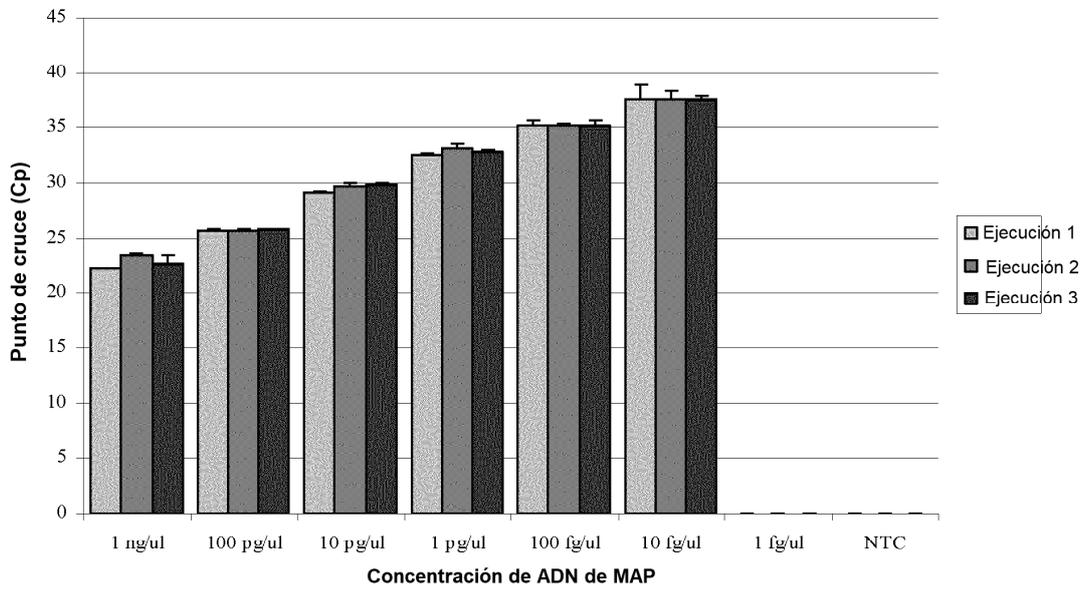


Figura 6

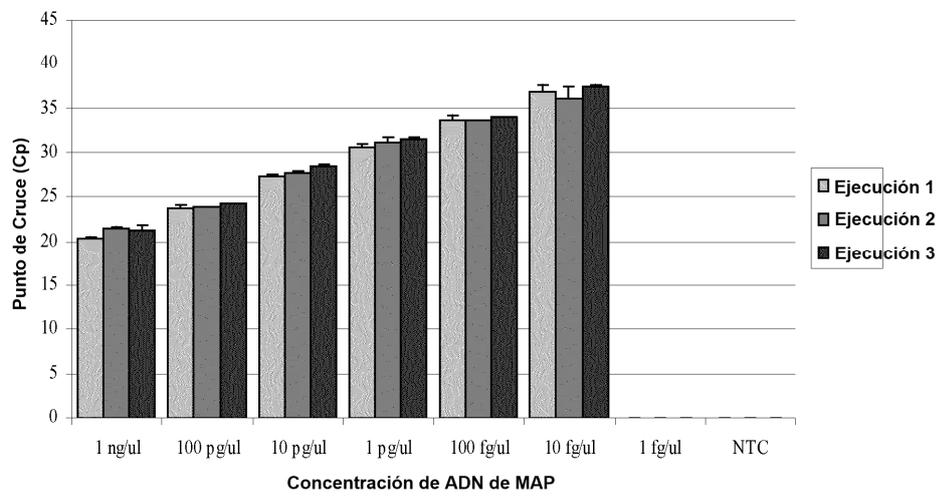


Figura 7

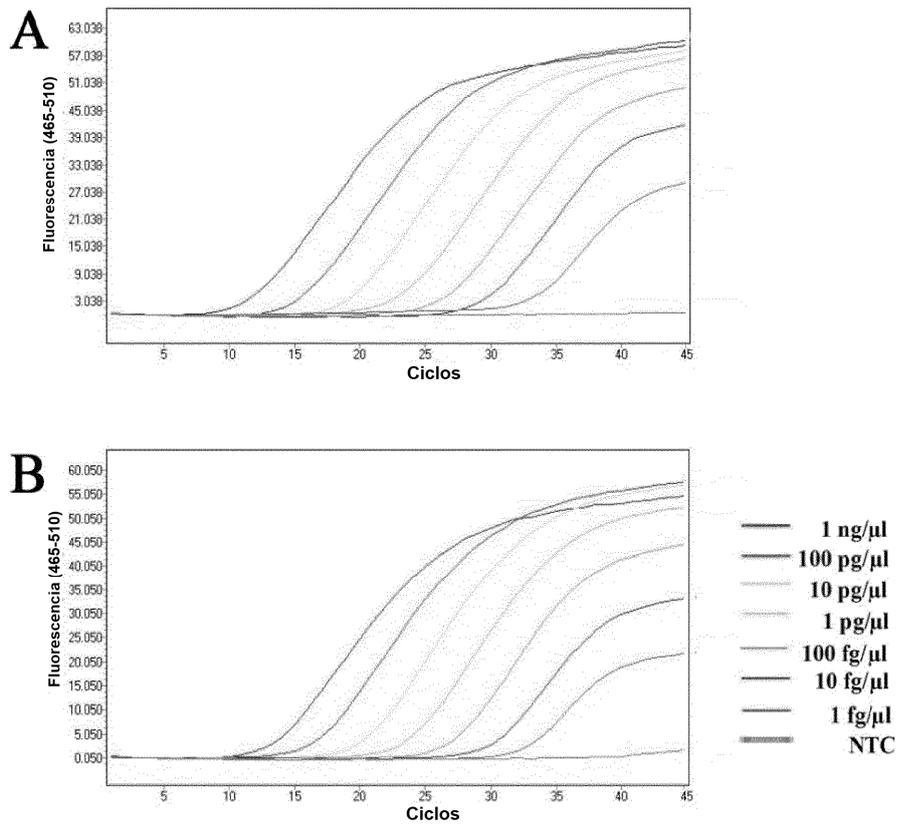


Figura 8

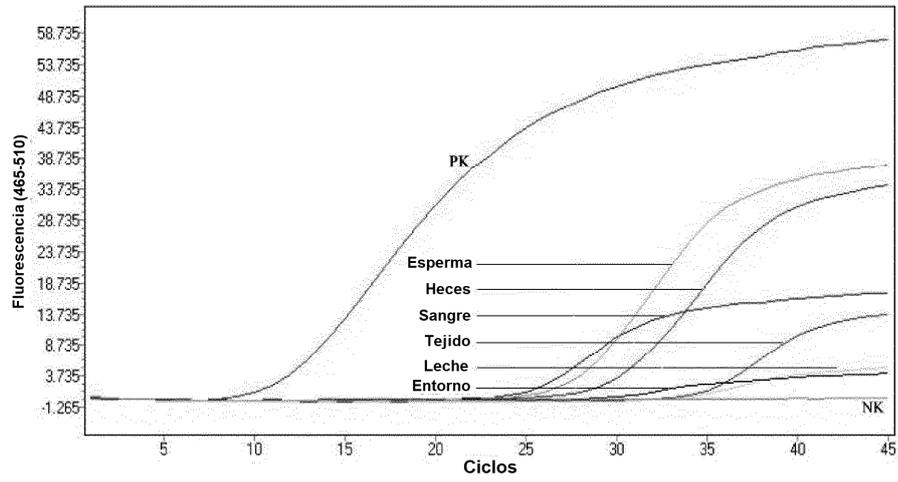


Figura 9

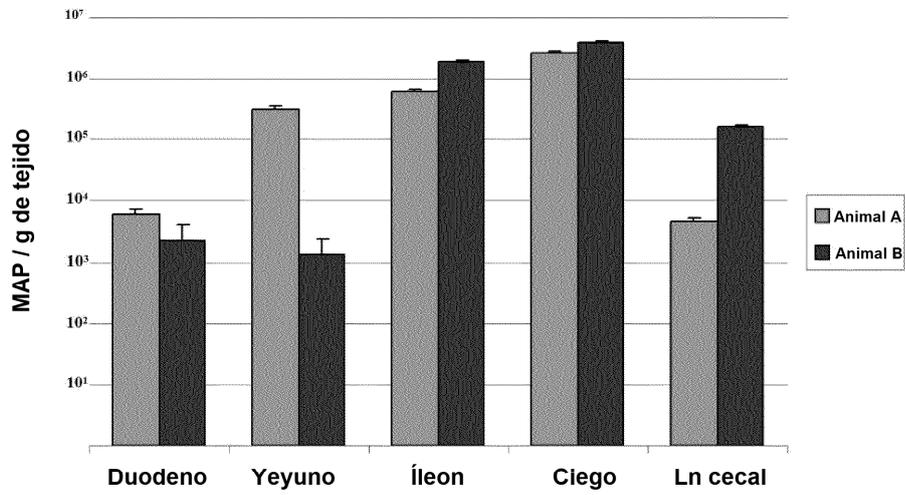


Figura 10