

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 650 066**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/09** (2006.01)

**C12Q 1/04** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

**G01N 33/569** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.05.2009 E 14191337 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.10.2017 EP 2853594**

54 Título: **Cebador y sonda para la detección de Mycobacterium intracellulare, y método para la detección de Mycobacterium intracellulare empleando el cebador o la sonda**

30 Prioridad:

**28.05.2008 JP 2008139105**

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

**16.01.2018**

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:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 650 066 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**

Cebador y sonda para la detección de *Mycobacterium intracellulare*, y método para la detección de *Mycobacterium intracellulare* empleando el cebador o la sonda

**Campo técnico**

5 La presente invención se refiere a un método para detectar y/o identificar *Mycobacterium intracellulare* (de aquí en adelante, opcionalmente abreviada como *M. intracellulare*) mediante el uso de la amplificación de ácido nucleico, y a un sistema de detección de la misma.

**Técnica anterior**

10 En el siguiente documento de la presente descripción, cuando se indica una base de ácido nucleico, A representa adenina; C representa citosina; G representa guanina; T representa timina y U representa uracilo; respectivamente. Además, cuando se menciona "oligonucleótido", en algunos casos incluye "polinucleótido".

15 La micobacteria no tuberculosa es un bacilo gram positivo que tiene características ácido-alcohol resistentes, clasificada dentro del género *Mycobacterium* (de aquí en adelante, opcionalmente abreviado simplemente como *M.*), y es un tipo de bacteria ácido-alcohol resistente distinta del complejo de tuberculosis y *Mycobacterium leprae*. Del quince al 20% de los casos que son positivos en el examen de un frotis de esputo para una bacteria ácido-alcohol resistente, han sido diagnosticados después como micobacteria no tuberculosa mediante la prueba para la identificación de especies bacterianas.

20 Entre las micobacterias no tuberculosas, se sabe que las especies bacterianas clínicamente problemáticas son *M. intracellulare*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium gordonae*, *Mycobacterium szulgai*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium xenopi*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium chelonae* y *Mycobacterium abscessus*.

25 Entre todas, las cepas comúnmente observadas son *M. intracellulare* y *M. avium*. Ya que *M. intracellulare* y *M. avium* se parecen mucho entre sí y es difícil distinguir las una de otra, *M. intracellulare* y *M. avium* se han denominado colectivamente como complejo *Mycobacterium avium* (MAC). Alrededor del 70% de los pacientes con enfermedad micobacteriana no tuberculosa tienen una infección con MAC, y la segunda gran población es la infección con *M. kansasii* que representa el 20%. Y el resto del 10% son infecciones con otras especies bacterianas.

30 En general, dado que las micobacterias no tuberculosas tienen una toxicidad débil, se cree que son inofensivas para un sujeto sano. Sin embargo, en raras ocasiones, pueden ejercer una infectividad sobre el ser humano. Entre ellas, el MAC se sabe que causa a veces efectos secundarios de tuberculosis (enfermedad pulmonar infecciosa), o causa infecciones oportunistas a un paciente vulnerable, tal como un paciente de SIDA. Por lo tanto, es particularmente importante en la terapia detectar la micobacteria no tuberculosa con rapidez y precisión.

35 Además, en los últimos años, la incidencia de una infección con micobacterias no tuberculosas muestra una tendencia al alza y, por lo tanto, se desea fuertemente el desarrollo de un método para discriminar entre una bacteria tuberculosa y una micobacteria no tuberculosa, en un corto período de tiempo. Además, desde el punto de vista del hecho que el método de detección/diagnóstico de *M. intracellulare* y *M. avium* mediante tecnología de amplificación del ácido nucleico ha sido incluido en la cobertura del seguro sanitario, su importancia diagnóstica es obviamente elevada.

40 Además, la mayoría de las micobacterias no tuberculosas muestran resistencia contra agentes antituberculosos. Por lo tanto, cuando se sospecha que un paciente tiene una infección con una bacteria ácido-alcohol resistente, el diagnóstico diferencial de si la enfermedad es una enfermedad micobacteriana tuberculosa o micobacteria no tuberculosa, es bastante importante para decidir el curso del tratamiento. Además, ya que un método para el tratamiento de las enfermedades causadas por micobacterias no tuberculosas puede variar dependiendo de la especie individual de la bacteria, la identificación de la especie bacteriana es también bastante importante. Sin embargo, las enfermedades micobacterianas no tuberculosas no muestran ningún síntoma clínico específico. Por lo tanto, es bastante difícil diferenciar la enfermedad micobacteriana tuberculosa de la no tuberculosa mediante una observación clínica y una manifestación histopatológica, y especificar las especies de micobacterias no tuberculosas. En consecuencia, el diagnóstico de si la enfermedad es una enfermedad micobacteriana tuberculosa o no tuberculosa tiene que ser llevado a cabo mediante una identificación de la bacteria infecciosa.

50 Un método típico para la identificación de una bacteria que se realiza para el diagnóstico de una enfermedad micobacteriana no tuberculosa, es el examen del frotis de un esputo. Sin embargo, con esta prueba solo se puede reconocer si la bacteria patógena es una "bacteria positiva para la prueba ácido-alcohol resistente" o no, y no se puede identificar si la bacteria patógena es una bacteria tuberculosa o una micobacteria no tuberculosa. Por lo tanto, cuando el resultado del examen del frotis de un esputo es positivo, se realiza un examen de un cultivo bacteriano mediante el aislamiento de un cultivo a partir de un medio de cultivo, tal como el medio de Ogawa, para diferenciar entre la bacteria tuberculosa y la micobacteria no tuberculosa. Y aún más, mediante la realización de exámenes bioquímicos adicionales, se identifica la especie bacteriana de la bacteria infecciosa. Sin embargo, en general, el

crecimiento de *Mycobacterium* es lento; por ejemplo, solo para el aislamiento del cultivo se prolonga de 3 a 4 semanas. Y, además, se requieren de 2 a 3 semanas adicionales para obtener los resultados de diversas pruebas bioquímicas para la identificación de una especie bacteriana. Por consiguiente, el método básico convencional con el que se obtiene un resultado diagnóstico de si la enfermedad es tuberculosis o no, mediante la realización del examen del frotis descrito anteriormente y un ensayo sobre un cultivo celular, es un método que conlleva un gasto de tiempo considerable.

Por otro lado, en los últimos años, se ha desarrollado una tecnología para la detección de bacterias a nivel genético. Por ejemplo, una técnica de diagnóstico que utiliza la tecnología de amplificación del ácido nucleico, tal como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), etc., se ha estudiado como un medio útil para la detección de bacterias. Debido a la alta sensibilidad de este método, las bacterias se pueden detectar incluso si solo hay varias células de las bacterias en una muestra. Además, este método tiene la ventaja de que la detección (identificación de la especie bacteriana) se puede completar en poco tiempo (en 4 días a lo sumo). Sin embargo, en el método de PCR habitual, el número de bacterias no se puede determinar. Además, con este método, las células se detectan independientemente de si son células vivas o muertas. Igualmente, si existen algunas bacterias en la muestra, se realiza una determinación positiva, independientemente del tamaño de la carga bacteriana. Por lo tanto, mediante el método de PCR, el diagnóstico de la infectividad se proporcionará con incertidumbre. Además, el método tiene otros problemas tales como que se suelen juzgar falsos positivos debido a una sensibilidad demasiado elevada.

Con respecto al método para la detección de *M. intracellulare* utilizando el método de PCR, hay un método para detectar la existencia o ausencia de ácido nucleico de MAC utilizando un conjunto de cebadores múltiples de un cebador oligonucleotídico específico para 2 o más de las regiones génicas que comprenden, por ejemplo, la región génica MacSequevar, la región génica de la proteína de 19 kD (MAV 19k) de *M. avium*, y la región génica de la proteína ribosómica s1 de *M. intracellulare* (documento de patente 1). Sin embargo, con este método, no se puede lograr una discriminación entre *M. intracellulare* y *M. avium*. Además, en la PCR que emplea el cebador rps1 (un cebador diseñado a partir de la región génica de la proteína ribosómica s1 de *M. intracellulare*), incluso cuando la cepa aislada de *M. avium* se utiliza como una muestra, el producto de la amplificación también se detecta; sigue habiendo un problema en términos de especificidad para *M. intracellulare*.

Además, también se conoce un método en el que se realiza una PCR usando un cebador que es capaz de amplificar una secuencia de nucleótidos de ADN que se dirige a un sitio de inserción de la secuencia de inserción del gen IS901, y determina si se trata de la bacteria de la tuberculosis aviar (*M. avium*) o *M. intracellulare*, basándose en la longitud de la cadena del producto obtenido a partir de la amplificación (documento de patente 2). Sin embargo, en la PCR que emplea el cebador mencionado anteriormente, el producto de extensión del cebador se puede obtener no solo cuando la muestra es una bacteria de tuberculosis aviar (*M. avium*), sino también *M. intracellulare*, y por lo tanto, no se puede decir que este método de determinación sea un método específico de *M. intracellulare*. Además, el método, con el que se realiza la discriminación entre las dos especies de bacterias basándose en la longitud de la cadena del producto de extensión del cebador, es engorroso; y es concebible que se pueda realizar una determinación diferente dependiendo de una apreciación; y en consecuencia, el método no se puede decir que sea un método de determinación fiable.

Aparte del método de la PCR, existe un método de determinación mediante el uso del método de amplificación por desplazamiento de hebra (método SDA). Por ejemplo, el documento JP-A-10-4984 (documento de Patente 3) da a conocer un método en el que se hace un direccionamiento hacia un segmento de 63 nucleótidos del gen BCG85-B que codifica una parte del antígeno  $\alpha$  de las micobacterias. En este método, usando un cebador que es capaz de amplificar la secuencia diana en el gen BCG85-B, propio tanto de *M. intracellulare* como de *M. avium*, se realiza una reacción de amplificación del ácido nucleico por el método de SDA, y luego MAC se detecta basándose en los resultados. Es decir, el cebador utilizado en el método mencionado anteriormente es un cebador capaz de amplificar tanto *M. intracellulare* como *M. avium*. Sin embargo, en este método, como una cuestión de rutina, se obtiene en ambos casos un producto de extensión del cebador en donde *M. intracellulare* o *M. avium* existen en una muestra. Debido a esto, MAC se puede detectar por este método; sin embargo, es imposible detectar *M. intracellulare* específicamente. Además, incluso cuando se detecta MAC, puede ser un caso en el que se proporciona un resultado falso positivo.

En el documento JP-A-2001-103986 (Documento de Patente 4), se describe un cebador para ser utilizado en la detección de MAC y un oligonucleótido para ser utilizado como una sonda de captura y una sonda de detección. Sin embargo, el cebador mencionado anteriormente puede amplificar una secuencia diana de 48 pb del gen dnaJ que poseen comúnmente tanto *M. intracellulare* como las bacterias de la tuberculosis aviar (*M. avium*). A saber, en ambos casos se lleva a cabo una reacción de amplificación en la que bien *M. intracellulare* o *M. avium* está presente en una muestra. Por lo tanto, si el método SDA se pone en práctica usando el cebador anteriormente mencionado, el producto de extensión del cebador será detectado usando la sonda de captura y la sonda de detección, y en base a los resultados, se puede lograr la detección de MAC. Sin embargo, la detección específica de *M. intracellulare* es imposible de lograr sin una detección de *M. avium*.

Además de esto, existe un método de amplificación del ácido nucleico de *M. intracellulare* mediante el uso del método de amplificación isotérmica mediada por bucle LAMP ("Loop-Mediated Isothermal Amplification"). Sin embargo, en el método LAMP, siguen existiendo algunos problemas tales como que la secuencia de nucleótidos del

ADN amplificado no se puede determinar; que la longitud eficaz del ADN que se va a amplificar es limitada; y que el método proporciona de vez en cuando un resultado falso positivo.

5 El documento de no Patente 2 describe el uso de un kit de sonda de ADN comercialmente disponible para la diferenciación entre *Mycobacterium avium* y *Mycobacterium intracellulare*. El documento de no Patente 3 describe un conjunto de cebadores que permite la amplificación de un fragmento en diferentes especies micobacterianas, en donde los productos de la amplificación procedentes de diferentes especies tienen diferentes longitudes. Por ejemplo, el producto de la PCR de *M. intracellulare* tiene 130 pb, mientras que el producto de *M. avium* tiene 80 pb. Por lo tanto, dichos cebadores permiten diferenciar entre diferentes especies micobacterianas. El documento de no Patente 4 describe los cebadores YNP-7 y YNP-8 que amplifican específicamente el ADN de *M. intracellulare*. El documento US 2007/042982 (documento de Patente 7) se refiere a oligonucleótidos que se reasocian con transcritos de ARNm de *Mycobacterium avium* inhibiendo de este modo la traducción de dicho ARNm (ARNi). Las secuencias de acuerdo con SEQ ID NOs: 49393 y 35090 son idénticas a la presente secuencia de *M. intracellulare* de SEQ ID NO: 6. El documento de Patente US 7.115.364 (documento de Patente 8) se refiere a micromatrices de sondas inmovilizadas, en donde una sonda de 12 nucleótidos de ADN mitocondrial es idéntica a la presente secuencia de *M. intracellulare* de SEQ ID NO: 6. El documento WO 99/042118 (Documento de Patente 9) se refiere a compuestos y a métodos para el diagnóstico de *Mycobacterium tuberculosis*, en donde una secuencia es 75,9% idéntica a la presente secuencia de *M. intracellulare* de SEQ ID NO: 6 en más de 377 de 941 nucleótidos.

20 Para resolver estos problemas, el presente inventor ya ha solicitado una patente con el documento PCT/JP2007/059251 (Documento de Patente 6). En esa solicitud, se ha descrito un cebador y una sonda que se habían desarrollado centrándose en la capacidad para distinguir/detectar una distinción entre *M. intracellulare* y *M. avium*. Además, a través de esta invención se permitió, en comparación con los métodos convencionales, una detección específica y rápida de *M. intracellulare* a diferencia de otras especies micobacterianas.

#### Lista de referencias

##### Documentos de Patente

- 25 Documento de Patente 1: JP-A-11-69999;  
Documento de Patente 2: JP-B-3111213;  
Documento de Patente 3: JP-A-10-4984;  
Documento de Patente 4: JP-A-2001-103986;  
Documento de Patente 5: JP-A-2005-204582;  
30 Documento de Patente 6: WO 2007/129628;  
Documento de Patente 7: US 2007/042982;  
Documento de Patente 8: US 7.115.364;  
Documento de Patente 9: WO 99/42118.

##### Documentos de no Patente

- 35 Documento de no Patente 1: F. Poly et al., J. Bacteriology, 2004, 186(14), p. 4781-4795;  
Documento de no Patente 2: Saito H. et al., Journal of Clinical Microbiology, American Society for Microbiology, 1990, 28 (8) 1 Agosto 1990, páginas 1694-1697;  
Documento de no Patente 3: Yamamoto T. et al., Tubercle and Lung disease, 1990, 74 (5), p. 342-345;  
Documento de no Patente 4: Yamazaki t. et al., Tubercle and Lung Disease, 76 (4), p. 330-335.

#### 40 Compendio de la invención

##### Problema técnico

Un objeto de la presente invención es proporcionar un nuevo cebador para detectar *M. intracellulare* que pueda excluir cualquier resultado falso positivo para el diagnóstico; y proporcionar un método para detectar *M. intracellulare* de forma más sencilla, rápida y con gran precisión.

##### 45 Solución del problema

La presente invención se realizó con el fin de resolver los problemas descritos anteriormente, y comprende los siguientes aspectos:

(1) Un oligonucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 6 (en donde los caracteres A, C, G y T representan adenina, citosina, guanina y timina, respectivamente; y T en una posición arbitraria se puede reemplazar por uracilo (U)); y de aquí en adelante, se usarán las mismas abreviaturas), o una secuencia complementaria a la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 6,

5 en donde el oligonucleótido es capaz de hibridarse con una secuencia de nucleótidos del gen de *Mycobacterium intracellulare*.

(2) Un cebador para detectar *Mycobacterium intracellulare*, que comprende;

10 un oligonucleótido que consiste en la secuencia de nucleótidos mostrada en cualquiera de SEQ ID NO: 40 a 47, o una secuencia complementaria a la secuencia de nucleótidos mostrada en cualquiera de SEQ ID NO: 40 a 47.

(3) Un método para detectar *Mycobacterium intracellulare*, que comprende:

usar un cebador tal y como se ha definido en el apartado (2) más arriba.

(4) Un kit de reactivos para la detección de *Mycobacterium intracellulare*, que comprende:

un cebador tal y como se ha definido en el apartado (2) más arriba.

15 Se ha sabido que existen 28 tipos de serotipos para el complejo *Mycobacterium avium* (MAC) que consiste en *M. intracellulare* y *M. avium*. Por lo tanto, técnicamente es muy difícil especificar una región del ADN (1) que sea una secuencia de consenso conservada con alta frecuencia dentro de las cepas de *M. intracellulare*, y (2) que se pueda utilizar como una secuencia marcadora (diana) para distinguir/identificar solamente *M. intracellulare* de las especies estrechamente relacionadas, incluyendo *M. avium*.

20 Por lo tanto, entre los conjuntos de cebadores conocidos hoy en día, según el que se ha controlado por su especificidad (evitando falsos positivos), la secuencia de consenso entre diferentes especies de *M. intracellulare* no puede ser capturada. Es decir, es posible distinguir/identificar una cepa específica de *M. intracellulare* de las otras especies estrechamente relacionadas, incluyendo *M. avium*. Sin embargo, cuando la determinación se lleva a cabo usando dicho conjunto de cebadores, la determinación solo se puede hacer cuando un paciente está infectado con una cepa especificada de *M. intracellulare* que se puede detectar con el conjunto de cebadores, y no se puede realizar cuando el paciente está infectado con otra cepa de *M. intracellulare*.

Por otro lado, cuando se emplea el conjunto de cebadores enfocado a la secuencia de consenso (evitando falsos negativos), la especificidad para *M. intracellulare* es, al contrario, baja.

30 Por consiguiente, en el momento actual, para determinar si un paciente está infectado con cualquiera de los diversos serotipos o cepas de *M. intracellulare*, es necesario llevar a cabo operaciones de dos etapas, de tal manera que la PCR se lleva a cabo usando un conjunto de cebadores que es capaz de amplificar todas las bacterias ácido-alcohol resistentes; y, a continuación, en los fragmentos de ADN amplificados obtenidos, una secuencia de una sonda que es específica para *M. intracellulare*, se hibrida para detectar *M. intracellulare*. Estas operaciones eran muy complicadas.

35 De cara a la situación descrita anteriormente, el presente inventor ha estudiado a fondo, basándose en la invención implicada en el documento de solicitud de patente descrita anteriormente, cómo establecer un método superior adicional para la detección de *M. intracellulare*.

40 Como resultado, se han desarrollado un cebador y una sonda que son específicos para *M. intracellulare*, y que la pueden detectar distinguiéndola de otras especies de *Mycobacterium*, y además, que pueden detectar una región de una secuencia altamente conservada dentro de diversas cepas de *M. intracellulare*. Y, se encontró que solo mediante la realización de una PCR empleando una pareja del conjunto de cebadores seleccionados a partir de los cebadores desarrollados (la operación de detección en dos etapas descrita anteriormente era innecesaria), se podía detectar el caso en el que existiera cualquiera de los diversos serotipos o cepas de *M. intracellulare*, y de este modo se completó la invención.

45 Efectos ventajosos de la invención

De acuerdo con el método para la detección de *M. intracellulare* usando el cebador de la presente invención, *M. intracellulare* se puede detectar y diagnosticar más rápidamente y con mucha precisión, en comparación con el método de identificación de bacterias convencional, mediante un ensayo de cultivo celular. Además, mediante la realización de la detección por el método de la presente invención, se puede eliminar cualquier resultado falso positivo en el diagnóstico, en comparación con el método de diagnóstico con PCR usando un cebador convencional, y como resultado, *M. intracellulare* se puede detectar y diagnosticar con mayor exactitud y precisión de una manera específica. Además, mediante el uso del método de detección de la presente invención, también se pueden cuantificar las células de *M. intracellulare*.

Además, de acuerdo con el método para la detección de *M. intracellulare* usando el cebador de la presente invención, es posible detectar el caso en el que existe cualquiera de los diversos serotipos o cepas de *M. intracellulare* sin necesidad de utilizar dos o más de los conjuntos de cebadores, en un procedimiento sencillo. Además, los efectos ventajosos como este, hacen que la operación de detección sea sencilla y también que se pueda obtener una reducción del tiempo requerido para el diagnóstico.

#### Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 muestra un resultado de un análisis de la curva de fusión obtenida en el Ejemplo 2, que se obtiene basándose en el resultado de la PCR en tiempo real por el método de intercalador usando un cebador Mint 02\_T7pa Fw1 y un cebador Mint 02\_T7pa Rv1, y empleando una muestra de ADN respectiva, obtenida partir de cada cepa de *M. intracellulare* y una muestra de ADN obtenida a partir de *M. avium* como molde.

La Fig. 2 muestra un resultado de un análisis de la curva de fusión obtenida en el Ejemplo 4, que se obtiene basándose en el resultado de la PCR en tiempo real por el método de intercalador usando un cebador Mint 02\_T7pa Fw1 y un cebador Mint 02\_T7pa Rv1, y empleando muestras de ADN obtenidas a partir de 18 especies del género *Mycobacterium* y una muestra de ADN obtenida a partir de *Escherichia coli* como molde.

La Fig. 3 muestra una curva de amplificación obtenida en el Ejemplo 6, que se obtiene mediante una PCR en tiempo real usando un cebador Mint 02\_T7pa Fw1 y un cebador Mint 02\_T7pa Rv1, y empleando una muestra de ADN obtenida a partir de *M. intracellulare* como molde.

La Fig. 4 muestra los resultados de la detección realizada con la PCR en tiempo real en el Ejemplo 4, que es una curva estándar representando gráficamente el valor de Ct (eje y) para el número de copias del genoma (eje x, escala logarítmica) de cada muestra de ADN para la PCR.

#### Descripción de las realizaciones

En la presente invención, el gen de *M. intracellulare* se refiere a una unidad arbitraria de una secuencia de nucleótidos (una región) en la secuencia del genoma completo que pertenece a *Mycobacterium intracellulare*. La secuencia del genoma completo de *Mycobacterium intracellulare* no se ha completado todavía.

El oligonucleótido de la presente invención incluye un oligonucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 6, o una secuencia complementaria a la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 6, en donde el oligonucleótido es capaz de hibridarse con una secuencia de nucleótidos del gen de *Mycobacterium intracellulare* (de aquí en adelante, opcionalmente, se hace referencia brevemente como "el oligonucleótido de la presente invención").

Un ejemplo específico de un oligonucleótido que comprende una parte de la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 6 incluye, por ejemplo, el que comprende una secuencia de nucleótidos mostrada en cualquiera de SEQ ID NO: 40 a SEQ ID NO: 47, o SEQ ID NO: 104 a SEQ ID NO: 107.

Hay que señalar que el oligonucleótido de la presente invención puede ser o bien ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN). En el caso de ácido ribonucleico, no hace falta decir que un residuo de timidina (T) se puede interpretar como un residuo de uridina (U). Además, puede ser un ADN que comprende un residuo de uridina que se sintetiza mediante el intercambio de una T en una posición arbitraria por una U. También, puede ser un ARN que comprende un residuo de timidina que se sintetiza mediante el intercambio de una U en una posición arbitraria, por una T. Además, puede tener una delección, inserción o sustitución de uno o varios nucleótidos. Uno o una pluralidad de nucleótidos pueden ser un nucleótido modificado, tal como inosina (I).

El método para obtener el oligonucleótido de la presente invención incluye, por ejemplo, pero no se limita a, un método de preparación mediante síntesis química bien conocida de por sí. En este método, es posible obtener sin dificultad un oligonucleótido de la misma calidad a mayor escala, con un coste inferior en comparación con el método de obtención del oligonucleótido o el polinucleótido mediante tecnología de ingeniería genética, usando un vector, etc. (método de clonación).

Por ejemplo, mediante un método convencional de síntesis de ADN usando un sintetizador de ADN, se sintetiza un oligonucleótido de acuerdo con el método convencional de la fosforamida, y se purifica mediante un procedimiento de rutina utilizando la cromatografía en columna de intercambio aniónico. Y de este modo, se puede obtener un oligonucleótido deseado de la presente invención.

Como alternativa, utilizando el servicio de encargo a un proveedor de una síntesis a medida, el oligonucleótido se puede comprar en el proveedor.

Los medios para la búsqueda (escrutinio) de un oligonucleótido que pueden conseguir los fines de la presente invención, incluyen el método de sustracción, tal y como se describe en FEMS Microbiology Letters 166: 63-70, 1998 o Systematic and Applied Microbiology 24: 109-112, 2001. Esta es una metodología que concentra una secuencia candidata sustrayendo una secuencia de nucleótidos que reacciona con un fragmento de ADN genómico obtenido a

partir de una especie que se va a diferenciar de un grupo de fragmentos obtenidos a partir del ADN genómico diana.

Además, existe un enfoque tal como uno en el que se prepara ADN genómico diana y una presentación diferencial de productos de la amplificación de un ADN genómico diana, obtenidos a partir de una especie que se va a diferenciar. Es decir, es un método que utiliza la reacción en cadena de la polimerasa cebada de forma arbitraria (AP-PCR) (documento JP-A-11-155589).

Adicionalmente, también con el uso del llamado método de micromatriz, la búsqueda de un oligonucleótido que puede alcanzar los fines de la presente invención, también se puede realizar, y el oligonucleótido de la presente invención se puede obtener. Una breve descripción del método es la siguiente:

Por ejemplo, se prepara un clon aleatorio de ADN genómico obtenido a partir de *M. intracellulare*, y luego el ADN se purifica a partir del clon aleatorio obtenido. Después de lo cual, el ADN purificado obtenido a partir del clon aleatorio se amplifica mediante una PCR, el ADN amplificado se dispone sobre un portaobjetos de vidrio y se prepara una micromatriz por el método convencional. Por separado, un grupo de fragmentos de ADN marcados con fluorescencia (Marcador-1) se prepara a partir de ADN genómico obtenido a partir de una diana de detección de *M. intracellulare*. Por otro lado, se prepara por separado un grupo de fragmentos de ADN marcados con fluorescencia (Marcador-2) a partir del ADN genómico obtenido a partir de una especie que se va a diferenciar. Y la reactividad (potencia de la unión) de cada Marcador-1 y Marcador-2 con el ADN purificado sobre la micromatriz se somete a ensayo mediante un método de hibridación competitiva, usando el Marcador-1 y el Marcador-2 en el mismo sistema de reacción. Mediante este ensayo, se puede seleccionar el grupo de secuencias candidatas que reacciona más específicamente con el grupo de fragmentos (Marcador-1) obtenidos a partir del ADN genómico de la diana de *M. intracellulare* (por ejemplo, el documento de no patente 1).

A través del método descrito anteriormente, un oligonucleótido que se hibrida específicamente con una secuencia de nucleótidos de la diana del gen de *M. intracellulare* se puede seleccionar.

Un ejemplo del método para la selección del oligonucleótido de la presente invención usando el método de la micromatriz se describirá con detalle del modo siguiente:

(1) Preparación de ADN genómico purificado obtenido a partir de *M. intracellulare*

Al principio, la célula microbiana de la cepa *M. intracellulare* se somete a un tratamiento de ruptura convencional (por ejemplo, el tratamiento de pulverización de células microbianas mediante un tratamiento con autoclave y empleando perlas de vidrio, etc.), y luego la extracción y la purificación del ADN se puede llevar a cabo de acuerdo con procedimientos convencionales.

(2) Preparación de una genoteca aleatoria del genoma completo

Como un ejemplo del método para la preparación de una genoteca aleatoria del genoma completo de *M. intracellulare*, un método modificado del método aleatorio del genoma completo descrito en Venter et al., Science 16 de febrero de 2001; 291 (5507): 1304-1351, se describirá a continuación.

En primer lugar, el ADN genómico purificado obtenido a partir de *M. intracellulare* obtenido como se ha descrito anteriormente (1), se diluye con una solución tampón apropiada y luego se somete a un tratamiento de fragmentación del ADN, por ejemplo, en presencia de una concentración final de 20% de glicerol, mediante el tratamiento durante aproximadamente 1 a 5 minutos usando un nebulizador a una presión de 5 a 9 kPa. La fracción obtenida se purifica usando una columna de extracción disponible comercialmente.

Después de lo cual, la fracción obtenida (fragmentos de ADN que contienen los fragmentos de ADN deseados) se inserta en un vector de ADN mediante ligación, según los procedimientos de rutina, y se obtiene el ADN recombinante (genoteca aleatoria del genoma completo de *M. intracellulare*).

El vector de ADN que se va a usar para este propósito incluye, en el caso de que la célula hospedadora para la transformación subsiguiente sea *E. coli*, por ejemplo, vectores tales como pBS (por ejemplo, el vector pBSII sk<sup>+</sup> (producido por Stratagene Corporation)), el plásmido pQE-TRI (producido por Qiagen GmbH), pBluescript, pET, pGEM-3Z, pGEX, etc. Dependiendo del tipo de vector que se va a utilizar, antes de la ligación, los extremos terminales de los fragmentos de ADN se pueden volver romos por tratamiento con ADN polimerasa, etc., con antelación.

Después de lo cual, utilizando el ADN recombinante obtenido, una célula hospedadora apropiada se transforma para obtener un transformante.

La célula hospedadora que se utiliza para este propósito incluye, por ejemplo, *E. coli*, preferiblemente la cepa JM109, DH5 $\alpha$ , TOP10, etc. Además de las mencionadas, se pueden usar células competentes que tienen mayor eficacia de transfección para el plásmido y el ADN del fago. Por ejemplo, se incluyen células competentes para *E. coli* JM109 (Takara Bio Inc.).

La transformación de la célula hospedadora se puede llevar a cabo por un método convencional [por ejemplo, el método de D. M. Morrison (Method in Enzymology, 68, 326-331, 1979), etc.]. Además, cuando se utiliza una célula competente disponible en el mercado, la transformación se puede llevar a cabo de acuerdo con el protocolo proporcionado con el producto.

- 5 El método para la selección del transformante que se ha introducido con "el ADN recombinante en el que se ha incorporado un fragmento de ADN deseado" incluye, por ejemplo, un método mediante el uso de una propiedad del vector utilizado para la transformación. Por ejemplo, cuando se utiliza un vector que comprende un gen resistente a la ampicilina, al cultivar el transformante en un medio que contiene ampicilina y seleccionar el clon resultante, se puede obtener fácilmente la genoteca del transformante que se ha transformado con "el ADN recombinante  
10 incorporado con el fragmento de ADN deseado" (genoteca aleatoria del genoma completo de ADN genómico obtenido a partir de *M. intracellulare*).

(3) Preparación de la micromatriz

A continuación, la micromatriz se prepara por el método siguiente.

- 15 A saber, a partir del transformante (genoteca aleatoria de clones del genoma completo obtenida a partir del genoma de *M. intracellulare*) obtenido en el apartado (2) descrito anteriormente, el ADN se purifica de acuerdo con los métodos de rutina.

Utilizando el ADN purificado como molde, y usando un cebador adecuado (puede ser un cebador disponible comercialmente, por ejemplo, M13 Primer M1 (producido por Takara Bio Inc.) y M13 Primer RV (producido por Takara Bio Inc.), la PCR se lleva a cabo de acuerdo con el procedimiento de rutina, y luego el producto resultante de la amplificación con PCR se purifica. Posteriormente, de acuerdo con los procedimientos de rutina, el producto purificado de la amplificación con PCR se extiende en manchas sobre un portaobjetos de vidrio para micromatrices.  
20 Las manchas son irradiadas con luz UV (60 mJ/cm<sup>2</sup> a 300 mJ/cm<sup>2</sup>, por lo general 150 mJ/cm<sup>2</sup>) para fijar el producto de la amplificación con PCR (que tiene una secuencia de nucleótidos fragmentada procedente del ADN genómico obtenido a partir de la diana de *M. intracellulare*) sobre el portaobjetos de vidrio, y de este modo se prepara la micromatriz.  
25

(4) Marcado del ADN genómico diana con colorante fluorescente

(i) Marcado del ADN genómico diana con colorante fluorescente

Por ejemplo, mediante un procedimiento de rutina tal como un método para marcar de forma indirecta usando hexilamino-UTP, se marca un ADN genómico purificado obtenido a partir de *M. intracellulare*, por ejemplo, por el  
30 método descrito en el apartado (1) anterior, con una sustancia marcadora. Además, un ADN genómico de referencia (el ADN genómico obtenido a partir de una especie que se va a diferenciar de *M. intracellulare*) se marca con una sustancia marcadora que es diferente de la sustancia marcadora utilizada para marcar el ADN genómico purificado descrito anteriormente, obtenido a partir de *M. intracellulare*.

La sustancia marcadora que se va a utilizar para marcar el ADN descrito anteriormente, es una sustancia marcadora empleada habitualmente en este campo, y una sustancia marcadora ampliamente utilizada incluye Alexa555 (nombre del producto de Invitrogen Corp.), Alexa647 (nombre del producto de Invitrogen Corp.), Cy3 (nombre del producto de Amersham Biosciences Corp.), Cy5 (nombre del producto de Amersham Biosciences Corp.), etc.  
35

El método para marcar, el ADN descrito anteriormente que emplea sustancias marcadoras tales como la que se han descrito anteriormente, incluye un método de marcado indirecto que se ha modificado a partir de un protocolo publicado por el Laboratorio DeRisi ([www.micromatriz.org](http://www.micromatriz.org)). En ese método, en primer lugar, mediante la realización de una reacción de extensión enzimática, se produce una cadena de ADN a la que se ha incorporado una  $\alpha$ UTP que tiene un grupo amino en la molécula. Y, a este grupo amino de la cadena de ADN, se acopla químicamente un colorante fluorescente (cuerpo de succinimida), de modo que se marca el ADN. Para la preparación de la cadena de ADN antes de marcar el ADN (incorporación de una  $\alpha$ UTP) por este método, se puede usar un kit comercialmente  
40 disponible, tal como el sistema de marcado de ADN de BioPrime (producido por Invitrogen Corp.).  
45

A continuación, se describirá un ejemplo del método para marcar ADN por el método descrito anteriormente usando Alexa647 y Alexa555.

A saber, en primer lugar, un material de partida (un ADN genómico purificado obtenido a partir de *M. intracellulare*, o un ADN genómico de referencia) se somete a un tratamiento térmico de desnaturalización de acuerdo con el  
50 procedimiento de rutina. Después de lo cual, al material tratado con calor se añade DTT, una solución mixta de dATP/dCTP/dGTP, dTTP, Ha-dUTP y la enzima Klenow, y la reacción de extensión se lleva a cabo a 37°C durante aproximadamente 3 horas. El producto de reacción obtenido se coloca sobre una columna de ultrafiltración y se centrifuga a 14.000 rpm durante aproximadamente 4 minutos, y después la solución concentrada se recupera en un microtubo, y se seca usando una secadora centrífuga a vacío, etc. Después de lo cual, al producto de reacción seco  
55 anterior, se añade NaHCO<sub>3</sub> y se mezcla, y después se deja reposar a temperatura ambiente durante 2 a 3 minutos.

Por otra parte, se prepara una solución de Alexa555 (o Alexa647) disuelta en DMSO (solución de colorante Alexa555, solución de colorante Alexa647). Esta solución de colorante Alexa555 se añade al producto de reacción descrito anteriormente, obtenido usando el ADN genómico como referencia. Además, se añade la solución de colorante Alexa647 al producto de reacción descrito anteriormente, obtenido usando el ADN genómico obtenido a partir de *M. intracellulare*. Cada producto de reacción se incuba protegido de la luz a 40°C, durante aproximadamente 60 minutos. Además, a cada producto de reacción se añade NH<sub>2</sub>OH 4 M y se mezcla, y se incuba protegido de la luz durante aproximadamente 15 minutos para obtener el producto marcado de cada ADN genómico. Después de lo cual, el producto marcado obtenido se coloca sobre una columna de ultrafiltración y se centrifuga a 14.000 rpm durante aproximadamente 4 minutos. La solución concentrada se recupera en un microtubo, y después se seca utilizando una secadora centrífuga a vacío.

(ii) Procedimiento de fragmentación de los productos marcados

Para cada uno de los productos marcados de ADN genómico en estado seco, obtenidos en el apartado i) de (4) anterior, una solución de los siguientes componentes con concentraciones finales de Tris-acetato 0,04 M (pH 8,1), acetato de potasio 0,1 M y acetato de magnesio tetrahidrato 0,03 M se prepara y se añade y se mezcla en suspensión. La suspensión se trata térmicamente a 94°C durante aproximadamente 15 minutos y se obtienen los productos de fragmentación de los productos marcados del ADN genómico respectivo con 100 bases a 300 bases (producto marcado con Alexa555, producto marcado con Alexa647, respectivamente).

El producto marcado con Alexa555 y el producto marcado con Alexa647 obtenidos se colocan cada uno sobre una columna de ultrafiltración y se centrifugan a 14.000 rpm durante aproximadamente 4 minutos; después de lo cual, cada solución concentrada se recupera en un microtubo parecido; y después se seca a fondo usando una secadora centrífuga a vacío.

Posteriormente, a ese microtubo, se añade una solución de reactivo que se prepara mediante la mezcla de ADN de esperma de salmón y tampón de hibridación ArrayHyb, y el material seco obtenido anteriormente se mezcla en suspensión, y después se incuba a 95°C durante aproximadamente 5 minutos para preparar una solución mixta de los productos marcados con Alexa555/Alexa647.

(5) Hibridación de la micromatriz

Sobre una micromatriz con la genoteca aleatoria de clones del genoma completo de ADN genómico obtenido a partir de *M. intracellulare*, preparado en la etapa descrita anteriormente (3), una solución mixta de los productos marcados con Alexa555/Alexa647 preparados en el apartado (ii) de (4) descrito anteriormente, se coloca y se mantiene a 65°C protegida de la luz durante no menos de 8 horas para permitir la hibridación. Después de la hibridación, la micromatriz se lava y después se seca por centrifugación a 800 rpm durante aproximadamente 5 minutos.

(6) Medición de la intensidad de la fluorescencia: desde la detección de la señal hasta la cuantificación

Empleando un escáner para la lectura de la fluorescencia, se mide la intensidad de la fluorescencia de la micromatriz en donde la hibridación de la micromatriz se ha llevado a cabo como se ha descrito en el apartado (5) anterior. En esta ocasión, la intensidad de la fluorescencia se mide por 2 canales de Alexa555 y Alexa647 para obtener los datos de detección de la fluorescencia.

La cuantificación de la señal fluorescente se puede realizar utilizando un programa informático de análisis de imágenes de expresión de ADN tip disponible en el mercado. Y, de acuerdo con el procedimiento operativo del programa informático, se puede realizar un reconocimiento automatizado de manchas, cálculo de fondo y normalización de la relación de la intensidad de la fluorescencia.

El producto marcado con Alexa647 utilizado para la hibridación, es un grupo de fragmentos de ADN preparado a partir del ADN genómico marcado obtenido a partir de *M. intracellulare*, y el producto marcado con Alexa555 es un grupo de fragmentos de ADN preparado a partir de ADN genómico marcado como referencia. Por lo tanto, cuando se mide la intensidad de la fluorescencia de Alexa555 y Alexa647 de una cierta mancha en una micromatriz, y la relación de la intensidad de la fluorescencia entre Alexa647 y Alexa555 es alta, esto indica que el fragmento de ADN (producto de la PCR) en la mancha se ha hibridado más fuertemente con el producto marcado con Alexa647, a saber, con el ADN genómico obtenido a partir de *M. intracellulare*. Y la especificidad del fragmento de ADN (producto de la PCR) para *M. intracellulare* se considera que es alta.

Por otro lado, cuando se mide la intensidad de la fluorescencia de Alexa555 y Alexa647 de una cierta mancha, y la relación de la intensidad de la fluorescencia entre Alexa647 y Alexa555 es baja, esto indica que la especificidad del fragmento de ADN (producto de la PCR) en la mancha del ADN genómico obtenido a partir de *M. intracellulare* es baja, y se observa una reacción cruzada con el producto marcado con Alexa555, a saber, con el ADN genómico de referencia. Además de este caso, en el caso en el que las intensidades de la fluorescencia de Alexa555 y Alexa647 tienen el mismo nivel, y en el caso en el que no se detecta fluorescencia ni con Alexa555 ni con Alexa647, la especificidad del fragmento de ADN (producto de la PCR) en la mancha de *M. intracellulare* se considera que es baja.

Por tanto, por ejemplo, basándose en la relación de la intensidad de la fluorescencia entre Alexa555/aAlexa647 (Relación) detectada en la micromatriz, y analizando los resultados, por ejemplo, al realizar un gráfico de dispersión (gráfico de dispersión), se lleva a cabo el escrutinio para detectar una secuencia específica de una *M. intracellulare*.

5 En el análisis, el valor numérico de la relación entre Cy3/Cy5 para el ADN específico de *M. intracellulare* entre la secuencia de control positivo empleada, será un valor de referencia útil para la evaluación de la especificidad.

Como resultado del escrutinio, una mancha que proporciona una señal específica para *M. intracellulare* (el caso en el que la intensidad de la fluorescencia de Alexa647 es fuerte) se selecciona como candidata.

Cabe señalar que, para los fines del escrutinio de una secuencia candidata para una detección específica adicional de *M. intracellulare* entre los clones seleccionados, por ejemplo, se puede llevar a cabo un escrutinio secundario.

10 Por ejemplo, (a) el ADN genómico obtenido a partir de varias cepas de *M. intracellulare* se marca con una sustancia marcadora de la misma manera que se ha descrito anteriormente, y se fragmenta.

(b) De manera similar, el ADN genómico obtenido a partir de una especie que se va a diferenciar como referencia, se marca con una sustancia marcadora que es diferente de la sustancia marcadora utilizada para la cepa de *M. intracellulare*, y se fragmenta.

15 Para cada cepa de *M. intracellulare*, se prepara una mezcla respectiva de (a) y (b), es decir, se obtiene la mezcla del producto de fragmentación mencionado anteriormente del producto marcado de ADN genómico obtenido a partir de las cepas de *M. intracellulare* y el producto de fragmentación del producto marcado de ADN genómico obtenido a partir de la cepa de referencia.

20 Empleando una mezcla de cada fragmento marcado, se realiza una hibridación competitiva para la micromatriz sobre la que se montan las manchas candidatas seleccionadas mediante escrutinio primario. Y se selecciona la mancha que reacciona de forma redundante con el fragmento marcado de ADN genómico obtenido a partir de varias cepas de *M. intracellulare*. El fragmento de ADN de esa mancha se determina como un clon candidato final.

25 Posteriormente, la determinación de la secuencia de nucleótidos del clon candidato obtenido se lleva a cabo de acuerdo con el procedimiento de rutina, utilizando equipos tales como un secuenciador utilizado usualmente en ese campo, por ejemplo, un secuenciador capilar ABI PRISM310 (producido por Applied Biosystems Inc.).

30 El cebador para detectar *M. intracellulare* de la presente invención incluye un cebador que comprende un oligonucleótido que consiste en la secuencia de nucleótidos mostrada en cualquiera de SEQ ID NO: 40 a SEQ ID NO: 47, o una secuencia complementaria a la secuencia de nucleótidos mostrada en cualquiera de SEQ ID NO: 40 a SEQ ID NO: 47, en donde el oligonucleótido es capaz de hibridarse con una secuencia de nucleótidos del gen de *M. intracellulare* (en lo sucesivo, denominado opcionalmente como el cebador de la presente invención).

El cebador anterior tiene una longitud de 18 a 25 nucleótidos, aún más preferiblemente de 18 a 22 nucleótidos, que se considera para es un número de nucleótidos necesario para conservar la especificidad como cebador.

35 En cuanto a un método para diseñar el cebador, se puede emplear un programa informático de uso común para el diseño de un cebador o, por ejemplo, una herramienta de diseño de cebadores en la red, Primer 3 (producido por Whitehead Institute for Biomedical Research).

40 El ejemplo específico más preferible de cebador de la presente invención incluye, por ejemplo, un oligonucleótido que consiste en la secuencia de nucleótidos mostrada en cualquiera de SEQ ID NO: 40 a SEQ ID NO: 43, en donde el oligonucleótido es capaz de hibridarse con la secuencia de nucleótidos del gen de *M. intracellulare*, o un oligonucleótido que consiste en la secuencia complementaria a la secuencia de nucleótidos mostrada en cualquiera de SEQ ID NO: 40 a SEQ ID NO: 43, en donde el oligonucleótido es capaz de hibridarse con la secuencia de nucleótidos del gen de *M. intracellulare*.

Los cebadores que consisten en la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 40 a SEQ ID NO: 47 se diseñan basándose en la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 6.

45 En la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 1, las ubicaciones de las secuencias de nucleótidos que están diseñados como cebador que tienen secuencias de nucleótidos mostradas en SEQ ID NO: 16 a SEQ ID NO: 23, son cada una del modo siguiente (Ejemplo de referencia):

SEQ ID NO: 16 (Mint 02\_T7pa Fw1): 266<sup>th</sup> - 287<sup>th</sup>;

SEQ ID NO: 17 (Mint 02\_T7pa Rv1): 361<sup>st</sup> - 381<sup>st</sup>;

SEQ ID NO: 18 (Mint 02\_T3pa Fw1): 173<sup>rd</sup> - 190<sup>th</sup>;

50 SEQ ID NO: 19 (Mint 02\_T3pa Rv1): 324<sup>th</sup> - 341<sup>st</sup>;

SEQ ID NO: 20 (Mint 02\_con Fw1): 425<sup>th</sup> - 443<sup>rd</sup>;

SEQ ID NO: 21 (Mint 02\_con Rv1): 570<sup>th</sup> - 589<sup>th</sup>;

SEQ ID NO: 22 (Mint 02\_con Fw2): 63<sup>rd</sup> - 80<sup>th</sup>;

SEQ ID NO: 23 (Mint 02\_con Rv2): 245<sup>th</sup> - 262<sup>nd</sup>;

- 5 En la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 6, la ubicación de las secuencias de nucleótidos que están diseñados como cebador que tiene las secuencias de nucleótidos mostradas en SEQ ID NO: 40 a SEQ ID NO: 47, son cada una del modo siguiente:

SEQ ID NO: 40 (Mint 10\_Fwpa Fw1): 496<sup>th</sup> - 513<sup>th</sup>;

SEQ ID NO: 41 (Mint 10\_Fwpa Rv1): 613<sup>th</sup> - 632<sup>nd</sup>;

- 10 SEQ ID NO: 42 (Mint 10\_con Fw2): 750<sup>th</sup> - 769<sup>th</sup>;

SEQ ID NO: 43 (Mint 10\_con Rv2): 858<sup>th</sup> - 877<sup>th</sup>;

SEQ ID NO: 44 (Mint 10\_RVpa Fw1): 184<sup>th</sup> - 201<sup>st</sup>;

SEQ ID NO: 45 (Mint 10\_RVpa Rv1): 336<sup>th</sup> - 353<sup>rd</sup>;

SEQ ID NO: 46 (Mint 10\_con Fw1): 141<sup>st</sup> - 159<sup>th</sup>;

- 15 SEQ ID NO: 47 (Mint 10\_con Rv1): 312<sup>th</sup> - 329<sup>th</sup>.

Cabe señalar que en la descripción anterior, los nombres de los cebadores mencionados en la presente invención se muestran entre paréntesis al lado de cada SEQ ID NO.

El método para obtener el cebador de la presente invención es como se ha descrito anteriormente en el método para obtener el nucleótido de la presente invención.

- 20 Además, el cebador de la presente invención se puede marcar con una sustancia marcadora.

En cuanto a la sustancia marcadora que se va a utilizar para marcar el cebador de la presente invención, se puede emplear cualquiera de las sustancias marcadoras conocidas, tales como radioisótopos, enzimas, sustancias fluorescentes, sustancias luminiscentes, biotina, etc.

- 25 Por ejemplo, el radioisótopo incluye <sup>32</sup>P, <sup>33</sup>P y <sup>35</sup>S; la enzima incluye fosfatasa alcalina y peroxidasa de rábano picante; la sustancia fluorescente incluye Alexa555, Alexa647 (producidas por Invitrogen Corporation), colorante de cianina de tipo Cy3, Cy5 (producido por Amersham Biosciences Corp.) y fluoresceína; la sustancia luminiscente incluye reactivos quimioluminiscentes incluyendo los ésteres de acridinio.

- 30 El método para marcar el cebador de la presente invención con un radioisótopo incluye un método para marcar mediante la incorporación de un nucleótido marcado con un radioisótopo en un cebador en el momento en que se sintetiza el cebador, o un método para marcar con un radioisótopo después de sintetizar el cebador. Específicamente, como método utilizado popularmente, se incluye el método del cebador aleatorio, el método de traslación de mella, el método de marcado 5'-terminal utilizando la cinasa de polinucleótido T4, el método de marcado 3'-terminal usando la transferasa de desoxinucleótido terminal, el método de marcado de ARN.

- 35 El método para marcar el cebador de la presente invención con una sustancia marcadora incluye un método para marcar el oligonucleótido empleado habitualmente en este campo, y el método se puede seleccionar apropiadamente, dependiendo de la propiedad de las respectivas sustancias marcadoras que se van a emplear.

- 40 Por ejemplo, el método para marcar el cebador de la presente invención con una enzima incluye un método de marcado directo, que es una técnica de rutina en este campo, en donde una molécula de enzima tal como fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano picante, está ligada directamente y de forma covalente con el cebador que se va a marcar.

- 45 El método para marcar el cebador de la presente invención con una sustancia fluorescente incluye, por ejemplo, un método en el que el nucleótido marcado con fluorescencia se incorpora en el cebador mediante una técnica de marcado de rutina en este campo. Además, mediante un método de sustitución de un nucleótido en una secuencia con un nucleótido que tiene un brazo enlazador como un miembro de la secuencia (véase, por ejemplo, Nucleic Acids Res., 1986, vol. 14, p. 6115), el nucleótido también se puede marcar con una sustancia fluorescente. En este caso, puede haber un método en el que una uridina que tiene un brazo enlazador en la posición 5, se sintetiza químicamente a partir de desoxiuridina mediante el método de síntesis descrito en el documento JP-A-60-500717, y empleándolo se introduce una sustancia fluorescente en la cadena de oligonucleótido descrita anteriormente.

El método para marcar el cebador de la presente invención con una sustancia luminiscente o con biotina incluye un método de marcado con luminiscencia de rutina o un método de marcado con biotina de rutina, por lo general llevado a cabo para marcar los nucleótidos en este campo.

5 Una sonda para la detección de *M. intracellulare* incluye una sonda que comprende un oligonucleótido que consiste en 15 a 40 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 6, o una parte o la totalidad de la secuencia complementaria a la secuencia de nucleótidos mostrada en cualquiera de SEQ ID NO: 6, en donde el oligonucleótido es capaz de hibridarse con la secuencia de nucleótidos del gen de *M. intracellulare* (en lo sucesivo, denominado opcionalmente la sonda de la presente invención).

10 La sonda de la presente invención puede ser una que se diseña, de acuerdo con las condiciones de la PCR en tiempo real, y mediante una selección de la longitud apropiada de la región apropiada, teniendo en cuenta la temperatura de disociación (valor Tm) del oligonucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada de SEQ ID NO: 6, o el oligonucleótido que comprende la secuencia complementaria a la secuencia de nucleótidos mostrada en cualquiera de SEQ ID NO: 6. En este sentido, sin embargo, si se desea que la sonda tenga suficiente especificidad, es deseable diseñarla teniendo en cuenta el número de bases necesarias a fin de mantener la especificidad como secuencia de una sonda.

15 Por ejemplo, la sonda que se va a utilizar para el sistema de amplificación con PCR en tiempo real (por ejemplo, el método TaqMan<sup>®</sup>, el método de sonda fluorescente) incluye la que tiene una longitud de 15 nucleótidos a 40 nucleótidos, preferiblemente de 20 nucleótidos a 30 nucleótidos.

20 Un ejemplo específico de la sonda de la presente invención incluye, por ejemplo, un oligonucleótido que comprende de 15 a 40 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos mostrada en cualquiera de SEQ ID NO: 104 a SEQ ID NO: 107, o un oligonucleótido que comprende de 15 a 40 nucleótidos de la secuencia complementaria a la secuencia de nucleótidos mostrada en cualquiera de SEQ ID NO: 104 a SEQ ID NO: 107, en donde el oligonucleótido es capaz de hibridarse con la secuencia de nucleótidos del gen de *M. intracellulare*.

25 Un ejemplo específico preferible de la sonda de la presente invención incluye, por ejemplo, un oligonucleótido que comprende de 15 a 40 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 104 o SEQ ID NO: 105, en donde el oligonucleótido es capaz de hibridarse con la secuencia de nucleótidos del gen de *M. intracellulare*, o un oligonucleótido que comprende de 15 a 40 nucleótidos de la secuencia complementaria a la secuencia de nucleótidos mostrada SEQ ID NO: 104 o SEQ ID NO: 105, en donde el oligonucleótido es capaz de hibridarse con la secuencia de nucleótidos del gen de *M. intracellulare*.

30 Cabe señalar que la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 92 a SEQ ID NO: 129 o la secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 92 a SEQ ID NO: 129 es la secuencia de nucleótidos del oligonucleótido que se va a amplificar con la PCR, usando el cebador de la presente invención. Las combinaciones de cebador directo y cebador inverso, y el SEQ ID NO de la secuencia de nucleótidos que se va a amplificar mediante la PCR usando una combinación de cebadores de este tipo, se muestran colectivamente en la Tabla 1. Por ejemplo, la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 92 es una secuencia que se amplifica con la PCR usando un oligonucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 16 como cebador directo y un oligonucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 17 como cebador inverso.

[Tabla 1]

Nº	Cebador directo	Cebador inverso	Secuencia a amplificar
1*	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 92
2	40	41	104
3	42	43	105
4	44	45	106
4	46	47	107
*Ejemplo de Referencia			

40 El método para la obtención de la sonda de la presente invención es como se ha descrito anteriormente en el método para obtener el nucleótido de la presente invención.

La sonda de la presente invención se puede marcar con una sustancia marcadora.

45 En cuanto a la sustancia marcadora que se va a utilizar para marcar la sonda de la presente invención, se puede emplear cualquiera de las sustancias marcadoras conocidas, tales como radioisótopos y enzimas, sustancias

fluorescentes, sustancias luminiscentes y biotina.

El ejemplo específico de la sustancia marcadora y el método de marcado que se va a utilizar para marcar la sonda de la presente invención, son como se describen en el método para el marcado del cebador de la presente invención.

- 5 Además, la sonda marcada que se va a utilizar en el método para detectar con PCR en tiempo real como se describe más adelante, incluye aquella en la que la sonda de la presente invención se ha marcado con una sustancia marcadora que generalmente se usa en el método de PCR en tiempo real. Por ejemplo, se incluye la sonda marcada de la presente invención en la que el extremo 5'-terminal está marcado con una sustancia fluorescente informadora [carboxifluoresceína (FAM), hexaclorofluoresceína (HEX), tetraclorofluoresceína (TET), etc.] y el extremo 3'-terminal se marca con un colorante extintor [por ejemplo, una sustancia fluorescente tal como carboxitetrametilrodamina (TAMRA), una sustancia no fluorescente tal como colorante extintor "Black Hole Quencher" (BHQ) y ácido 4-((4-(dimetilamino)fenil)azo)benzoico (DABCYL).

En el método para la detección mediante PCR en tiempo real TaqMan<sup>®</sup> que se describirá de aquí en adelante, la sonda marcada descrita anteriormente también se puede utilizar.

- 15 El espécimen (muestra) que se utilizará para la detección de *M. intracellulare* implicado en la presente invención, incluye varios tipos de especímenes clínicos, tales como esputo, sangre, mucosa faríngea, jugo gástrico, fluido de lavado bronquial, espécimen transbronquial, líquido de punción, tal como derrame pleural, orina, pus, etc. Además, la muestra puede ser una célula microbiana aislada y cultivada a partir de un espécimen; un ácido nucleico aislado y purificado a partir de tal célula microbiana; o un ácido nucleico amplificado por el sistema de detección por  
20 amplificación del ácido nucleico.

La extracción y la purificación del ADN a partir de las muestras descritas anteriormente, se pueden llevar a cabo de acuerdo con los procedimientos de rutina que habitualmente se utilizan para la extracción de ADN de bacterias ácido-alcohol resistentes (bacteria de la tuberculosis) a partir de un espécimen.

- 25 En primer lugar, es necesario romper la pared celular de una célula microbiana en la muestra. El método para este fin incluye, por ejemplo, en el caso en el que la célula microbiana se utilice como muestra, un método para la ruptura de la estructura de la membrana de la bacteria de la tuberculosis mediante el tratamiento de la célula microbiana, por ejemplo, con un agente tensioactivo tal como SDS, un agente desnaturizante de proteínas, tal como tiocianato de guanidina (GTC), y un método para la ruptura física de la célula microbiana usando perlas de vidrio, etc.

- 30 En el caso en el que se utiliza como muestra el esputo expectorado, como un pretratamiento, es deseable llevar a cabo una homogeneización del material del espécimen mediante el método NALC (N-acetil-L-cisteína)-NaOH (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, U.S.A., 1985, p.31-55) de acuerdo con la recomendación del Centro para Control y Prevención de Enfermedades (CDC).

- 35 Después de la ruptura de la pared celular de la célula microbiana, la extracción y purificación del ADN se puede llevar a cabo por un método general para la preparación de ADN en este campo [extracción con fenol-cloroformo, método de precipitación con etanol, método de precipitación usando isopropanol, etc. (R. Boom, C. J. A. SOL, M. M. M. SALIMANS, C. L. JANSEN, P. M. E. WERTHEIM-van DILLEN, J. VAN DER NOORDAA, Rapid and simple method for purification of nucleic acids, J. Clin. Microbiol., 1990, Mar; 28(3), pp. 495-503)].

- 40 Para la extracción y la purificación del ADN, puesto que están disponibles comercialmente diversos tipos de kits para este fin, tales kits se pueden utilizar, o la extracción se puede llevar a cabo de acuerdo con los procedimientos rutinarios en este campo (por ejemplo, método de extracción con fenol-cloroformo, método de precipitación usando etanol, propanol, etc.). Por ejemplo, la extracción y la purificación del ADN se pueden llevar a cabo utilizando un kit de extracción y purificación de ADN de tipo resina de intercambio iónico y Genomic-tip producido por Qiagen GmbH.

- 45 Tomando un caso como ejemplo en el que se utilizan como muestra las células microbianas aisladas y cultivadas del espécimen, el procedimiento se muestra del modo siguiente.

- Por ejemplo, las colonias que crecen en medio de Ogawa se recogen y se suspenden en agua destilada estéril, y las células microbianas se aíslan mediante centrifugación, a continuación, las células recogidas se resuspenden en agua destilada. Posteriormente, después de que la suspensión de las células microbianas se tratan en un autoclave, se lleva a cabo el tratamiento de pulverización de las células (fractura física usando perlas de vidrio); y la suspensión de células rotas se centrifuga adicionalmente para recuperar el fluido sobrenadante. El ADN puede ser extraído y purificado a partir del fluido sobrenadante obtenido.

El método para la detección de *M. intracellulare* de la presente invención incluye, un método para detectar *Mycobacterium intracellulare*, que comprende el cebador de la presente invención.

- 55 El método incluye, por ejemplo,

(A) un método para la detección mediante la realización de una reacción de amplificación del ácido nucleico usando el cebador de la presente invención, a continuación, detección del producto de extensión obtenido con el cebador;

5 (B) un método para la detección mediante el uso de la sonda de la presente invención marcada con una sustancia marcadora.

A continuación se explicará cada método.

(A) El método para la detección mediante la realización de una reacción de amplificación del ácido nucleico usando el cebador de la presente invención, a continuación, detección del producto de extensión obtenido con el cebador.

10 En el método (A), el método para llevar a cabo la reacción de amplificación del ácido nucleico utilizando el oligonucleótido de la presente invención como cebador y el ácido nucleico en la muestra como molde incluye, por ejemplo, un método en el que usando el cebador de la presente invención y usando el ácido nucleico en la muestra como molde, la amplificación del ácido nucleico con la ADN polimerasa y un método similar [por ejemplo, el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR); el método LAMP (amplificación isotérmica mediada por bucle) (Tsugunori Notomi et al., Nucleic Acid Res., 28, e63, 2000), el método ICANTM (amplificación isotérmica y química iniciada con cebador de ácidos nucleicos) (Rinsho Byori (Clinical Pathology), 51(11), 1061-1067, 2003, Nov), el método LCR (reacción en cadena de la ligasa) (documento JP-A-4-211399), el método SDA (amplificación por desplazamiento de cadena) (documento JP-A-8-19394)] se lleva a cabo para permitir la extensión del cebador. Mediante este método, la secuencia de una región específica de la secuencia de nucleótidos del gen de *M. intracellulare* se puede amplificar, y por lo tanto *M. intracellulare* se puede detectar midiendo el producto de extensión del cebador resultante.

20 Entre los métodos descritos anteriormente para la reacción de amplificación del ácido nucleico, el método de la PCR se cita como el método más común; y un ejemplo del método de la PCR incluye, por ejemplo, el método de detección con amplificación en tiempo real (véase, por ejemplo, la descripción en los documentos USP-5210015 y USP-5538848). Además, un ejemplo del método de detección mediante el método de detección con amplificación en tiempo real incluye, por ejemplo, el método de detección con PCR en tiempo real.

25 Un ejemplo del método de detección con PCR en tiempo real incluye el método TaqMan<sup>®</sup> de PCR en tiempo real (véase, por ejemplo, la descripción en el documento USP 5538848), el método de sistema de sonda eclipse MGB (véase, por ejemplo, la descripción en el documento USP-5.801.155), el método de tecnología de sonda fluorescente (véase, por ejemplo, la descripción en el documento USP-5925517), el método del cebador fluorogénico LUX (Invitrogen Corp.), el método de PCR con sonda de extinción (QP) (véase, por ejemplo, la descripción en el documento USP-6.492.121), etc.

Ejemplos específicos del cebador de la presente invención que se pueden utilizar en la reacción de amplificación del ácido nucleico, tal como PCR, son como se han descrito anteriormente.

35 Además, una combinación preferible de cebador directo y cebador inverso que se va a utilizar en la reacción de amplificación del ácido nucleico incluye, por ejemplo, las combinaciones mostradas en la Tabla 1 descrita anteriormente.

40 Por ejemplo, en la Tabla 1, la combinación del N° 1 indica "una combinación en la que el cebador directo es un oligonucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 40 y el cebador inverso es un oligonucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 41", o "una combinación en la que el cebador directo es un oligonucleótido que comprende la secuencia complementaria a la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 40 y el cebador inverso es un oligonucleótido que comprende la secuencia complementaria a la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 41".

Entre todas ellas, las combinaciones preferibles de cebador directo y cebador inverso incluyen, por ejemplo, las combinaciones descritas en el siguiente Tabla 2:

45 [Tabla 2]

N°	Cebador directo	Cebador inverso
1*	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 17
2	40	41
3	42	43
*Ejemplo de Referencia		

Otros reactivos tales como desoxirribonucleósido trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) y ADN polimerasa que se

pueden utilizar en la reacción de amplificación del ácido nucleico, tal como la PCR en tiempo real, usando los cebadores descritos anteriormente, pueden ser los reactivos utilizados comúnmente en este campo; y las condiciones y los procedimientos, etc., excepto para el uso del cebador y la sonda de la presente invención, se pueden llevar a cabo de acuerdo con el protocolo general de la PCR.

- 5 El método para la detección del producto de extensión obtenido con el cebador mediante la reacción de amplificación del ácido nucleico no está particularmente limitado, y pueden ser procedimientos de rutina utilizados comúnmente en este campo.

Por ejemplo, se incluyen varios métodos de detección tales como: el método de intercalador; el método TaqMan<sup>®</sup> de PCR en tiempo real (véase, por ejemplo, la descripción en el documento USP 5538848); el método del sistema de sonda eclipse MGB (véase, por ejemplo, la descripción en el documento USP-5.801.155); el método de tecnología de sonda fluorescible (véase, por ejemplo, la descripción en el documento USP-5925517); el método del cebador fluorogénico LUX (Invitrogen Corp.); el método de PCR con sonda de extinción (QP) (véase, por ejemplo, la descripción en el documento USP-6.492.121); un método en el que, después de llevar a cabo la reacción de amplificación del ácido nucleico, los productos obtenidos por la extensión con el cebador se someten a electroforesis, y la detección se realiza basándose en los resultados de la electroforesis; un método en el que la detección se realiza mediante la medición de una señal obtenida a partir del producto de extensión obtenido con el cebador mediante la reacción de amplificación del ácido nucleico usando un cebador marcado.

Entre todos ellos, el método utilizado más comúnmente incluye, por ejemplo, los métodos siguientes:

(A-1) método de intercalador;

- 20 (A-2) método TaqMan<sup>®</sup> de PCR en tiempo real;

(A-3) un método en el que, después de llevar a cabo la reacción de amplificación del ácido nucleico, los productos obtenidos por la extensión con el cebador se someten a electroforesis, y la detección se realiza basándose en los resultados de la electroforesis; y

- 25 (A-4) un método en el que la reacción de amplificación del ácido nucleico se lleva a cabo utilizando un cebador marcado y se mide una señal obtenida a partir del producto de extensión obtenido con el cebador.

A continuación se explicará cada uno de estos métodos.

Método de intercalador (A-1)

El método de intercalador convencional, en el que la PCR en tiempo real se lleva a cabo mediante el uso de un intercalador conocido, se puede utilizar.

- 30 Por ejemplo, se incluye un método en el que, usando el cebador de la presente invención y un intercalador, la PCR en tiempo real se lleva a cabo mediante el uso de un método de intercalador convencional.

A saber, el intercalador es un reactivo capaz de generar fluorescencia al unirse específicamente a ADN de cadena doble, y genera fluorescencia cuando se expone a luz de excitación. Puesto que la cantidad de ADN se incrementa como resultado de una amplificación repetida por la PCR, el intercalador se incorpora en el ADN, y una cantidad del intercalador incorporado en el ADN se incrementa en relación con la cantidad del producto generado en la amplificación, una cantidad de producto de extensión con el cebador se puede determinar mediante la detección de la intensidad de la fluorescencia obtenida a partir del intercalador.

En este sentido, sin embargo, puesto que el intercalador se une a todo el ADN de cadena doble, el análisis de la curva de fusión se puede llevar a cabo basándose en los resultados de la medición de la intensidad de la fluorescencia, si es necesario. Es decir, después de llevar a cabo la PCR, se mide la intensidad de la fluorescencia obtenida a partir del intercalador, mientras que la temperatura de la solución de la reacción de la PCR se eleva gradualmente. Al principio, el producto de la amplificación con PCR genera fluorescencia porque se forma una cadena doble. Sin embargo, cuando la temperatura de la solución de reacción de la PCR alcanza una cierta temperatura, los productos de la amplificación se disocian en una hebra sencilla, y la intensidad de la fluorescencia obtenida a partir del intercalador disminuye rápidamente. La temperatura en este punto es la temperatura de fusión (valor T<sub>m</sub>), y es un valor específico para una secuencia del producto de extensión con el cebador. Si el pico del análisis de la curva de fusión se corresponde con el producto específico deseado o un producto no específico, se puede determinar a partir de este valor T<sub>m</sub>.

- 50 Este método de intercalador no requiere ningún procedimiento electroforético después de la PCR en tiempo real, y por lo tanto, el método de intercalador es un método eficaz en el caso en que se requiera una determinación rápida en el campo de los ensayos clínicos, etc.

El intercalador que se puede utilizar en la presente invención incluye, cualquier tipo de intercalador utilizado usualmente en este campo, e incluye, por ejemplo, SYBR<sup>®</sup> Green I (nombre del producto de Molecular Probes Inc.),

bromuro de etidio, flúor.

Un ejemplo del "método para la detección de *M. intracellulare* a través del uso del método de intercalador" implicado en la presente invención se explica a continuación:

5 Usando el cebador de la presente invención y el intercalador (por ejemplo, SYBR<sup>®</sup> Green I), y usando una muestra de ADN purificado que se ha purificado a partir de una muestra como molde, la PCR en tiempo real se lleva a cabo utilizando una polimerasa tal como ADN polimerasa Taq. Y, por el método de aumentar la temperatura descrito anteriormente, se mide la intensidad de la fluorescencia obtenida a partir del intercalador (SYBR<sup>®</sup> Green I) intercalado en los productos de extensión con el cebador.

10 Posteriormente, la curva de fusión se prepara trazando un gráfico de la temperatura de fusión del producto de extensión del cebador (ADN de cadena doble) como eje horizontal y la primera derivación (variación) de la intensidad de la fluorescencia como eje vertical. El análisis de la curva de fusión del producto de extensión del cebador se lleva a cabo usando la curva de fusión obtenida, y se examina de este modo la detección del pico. Cuando se obtiene un pico único, se puede determinar que la muestra es positiva para *M. intracellulare* (es decir, existe una bacteria de *M. intracellulare* o el gen de la misma; y de aquí en adelante, lo mismo que anteriormente).

15 Además, para llevar a cabo una determinación de *M. intracellulare* más precisa, es preferible llevar a cabo el método siguiente.

20 A saber, la medición descrita anteriormente se lleva a cabo utilizando una muestra; la curva de fusión se genera; y la detección del pico se lleva a cabo. Por separado, la misma medición que se ha descrito anteriormente se lleva a cabo utilizando una cepa de referencia de *M. intracellulare*; el análisis de la curva de fusión se lleva a cabo; y la detección del pico se lleva a cabo. Y, cuando el resultado obtenido mediante el uso de una muestra es un único pico y la posición del pico es la misma o muy cercana a la posición del pico obtenido utilizando la cepa de referencia de *M. intracellulare*, se determina que la muestra es positiva para *M. intracellulare*.

25 Cabe señalar que, si la medición se lleva a cabo utilizando la cepa de referencia de *M. intracellulare* y la posición del pico se determina de antemano, no es necesario llevar a cabo la confirmación de la posición del pico para la cepa de referencia en cada medición de una muestra.

Además, basándose en el valor de la medición obtenida por el método mediante el uso del método del intercalador, una curva estándar también se puede generar de acuerdo con el procedimiento de rutina realizado en la PCR en tiempo real, y por lo tanto, utilizando la curva estándar, se puede obtener la cantidad (número de copias) del ADN genómico de *M. intracellulare* en una muestra.

30 El método para generar la curva estándar y el método del ensayo de *M. intracellulare* se describirán más adelante.

Como un ejemplo de referencia del método para la detección de *M. intracellulare* a través del método de detección con PCR en tiempo real utilizando el intercalador implicado en la presente invención, tomando un caso como ejemplo en el que *M. intracellulare* se detecta usando el cebador anteriormente descrito "Mint 02\_T7pa Fw1" y el cebador "Mint 02\_T7pa Rv1", el método se explicará de la siguiente manera.

35 En primer lugar, la muestra de ADN purificada se obtiene a partir de la muestra por el método conocido.

Por otra parte, por ejemplo, usando un sintetizador de ADN, un oligonucleótido (Mint 02\_T7pa Fw1) que consiste en la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 16 y un oligonucleótido (Mint T7pa 02\_Rv1) que consiste en la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 17, se sintetizan por el método de la fosforamidita.

40 Usando el Mint 02\_T7pa Fw1 sintetizado anteriormente como cebador directo y el Mint T7pa 02\_Rv1 como cebador inverso, la PCR en tiempo real se lleva a cabo, por ejemplo, del modo siguiente.

45 A saber, se prepara una solución tampón de Tris-HCl 10 mM (pH 8,9) que contiene de 50 nM a 2.000 nM para cada cebador Mint 02\_T7pa Fw1 y Mint T7pa 02\_Rv1, una dilución de aproximadamente de 5000 veces a 100.000 veces de la solución original de intercalador [por ejemplo, SYBR<sup>®</sup> Green I (nombre del producto de Molecular Probe Inc.)], de 1,0 mM a 4,0 mM de MgCl<sub>2</sub>, KCl, BSA, colato de sodio, de 0,005% a 0,2% de Triton X-100, 0,2 mM de cada dATP, dCTP, dGTP y dTTP, y de 10 U/ml a 80 U/ml de polimerasa (por ejemplo, ADN polimerasa Taq, y se utiliza como una solución de reacción para la PCR. A esta solución de reacción para la PCR, se añade la muestra de ADN purificada y se utiliza como una muestra para la PCR. Utilizando esta muestra para la PCR, la PCR en tiempo real se lleva a cabo mediante un equipo de detección de PCR en tiempo real, etc. La reacción se repite durante 30 ciclos a 50 ciclos, y la intensidad de la fluorescencia obtenida a partir del intercalador (por ejemplo, SYBR<sup>®</sup> Green I) intercalado en relación con la cantidad de amplificación de los productos de extensión con el cebador, se mide en cada ciclo.

Después de lo cual, la curva de fusión se genera trazando un gráfico con la temperatura de fusión del producto de extensión del cebador (ADN de cadena doble) como eje horizontal y la primera derivación (variación) de la intensidad de la fluorescencia como eje vertical. Utilizando esta curva de fusión, se lleva a cabo el análisis de la

curva de fusión del producto de extensión del cebador para detectar el pico. Cuando se obtiene un único pico, se determina que la muestra es positiva para *M. intracellulare*.

Más preferiblemente, cuando la posición del pico obtenido por la medición y el posterior análisis de la curva de fusión para una muestra, aparece en la misma posición o muy cerca del pico obtenido con la misma medición y el análisis del punto de fusión subsiguiente, como se ha descrito anteriormente para la cepa de referencia de *M. intracellulare*, se determina que la muestra es positiva para *M. intracellulare*.

Además, a modo de referencia, el ADN obtenido a partir del género *Mycobacterium* que es distinto de *M. intracellulare*, se extrae y se purifica. La PCR en tiempo real se lleva a cabo de acuerdo con el mismo método que se ha descrito anteriormente excepto por el uso de este ADN como molde; y la intensidad de la fluorescencia del SYBR® Green I se mide de la misma manera; y después se puede realizar el análisis de la curva de fusión. En este caso, ya que no hay polinucleótidos que tienen una secuencia de nucleótidos obtenida a partir de *M. intracellulare* en la muestra, no debe aparecer ningún pico en el análisis de la curva de fusión. Para realizar una determinación más segura de la presencia de *M. intracellulare*, el experimento de control descrito anteriormente se puede llevar a cabo en paralelo.

Además, mediante la generación de una curva estándar, se puede obtener la cantidad de ADN genómico (número de copias) de *M. intracellulare* en la muestra. Además, como la cantidad es proporcional a la cantidad de *M. intracellulare*, la cantidad de *M. intracellulare* en la muestra también se puede determinar.

(A-2) Método TaqMan® de PCR en tiempo real (método de sonda TaqMan®)

El método TaqMan® de PCR en tiempo real es un método de PCR en tiempo real usando una sonda en la que el extremo 5'-terminal de la misma está marcado con un colorante fluorescente (informador), tal como, por ejemplo, FAM, y el extremo 3'-terminal de la misma está marcado con un colorante extintor tal como, por ejemplo, TAMRA, y es un método capaz de detectar una pequeña cantidad de ADN diana con alta sensibilidad y de forma cuantitativa (véase, por ejemplo, la descripción en el documento USP-5.538.848).

A saber, es un método en el que usando el cebador de la presente invención y una sonda marcada de la presente invención que está marcada con un colorante informador fluorescente en el extremo 5'-terminal y con un colorante extintor en el extremo 3'-terminal, la PCR se lleva a cabo con el ácido nucleico en una muestra como molde, y después se detecta la señal de la sustancia marcada liberada desde dicha sonda marcada.

El principio del método TaqMan® de PCR en tiempo real es el siguiente:

En este método, se emplea una sonda de oligonucleótido, que está marcada con un colorante fluorescente (informador) en el extremo 5'-terminal de la misma y con un colorante extintor en el extremo 3'-terminal de la misma, y es capaz de hibridarse con una región específica en el gen diana. En la sonda mencionada anteriormente, la fluorescencia del informador es suprimida por el colorante extintor en condiciones normales. En el estado en el que esta sonda marcada fluorescente se hibrida completamente con el gen diana, la PCR se realiza desde el exterior de la misma usando una ADN polimerasa. A medida que la reacción de extensión progresa con la polimerasa de ADN, la sonda fluorescente se hidroliza lejos del extremo 5'-terminal mediante la actividad exonucleasa de la ADN polimerasa, y el colorante informador liberado genera la fluorescencia. El método de PCR en tiempo real es un método de vigilancia de la intensidad de esa fluorescencia en tiempo real, y por lo tanto, la cantidad inicial del ADN molde se puede cuantificar con exactitud.

Para el cebador directo y el cebador inverso que se van a utilizar para el método de detección TaqMan® de PCR en tiempo real implicado en la presente invención, se utiliza el cebador de la presente invención. El cebador preferible incluye el cebador que se va a utilizar en la reacción de amplificación del ácido nucleico, tal como el método de PCR descrito anteriormente, y la combinación preferible del mismo es también como se ha descrito anteriormente.

La sonda que se va a utilizar para marcar con un colorante fluorescente (informador) en el extremo 5'-terminal de la misma y un colorante extintor en el extremo 3'-terminal de la misma, y que se utiliza para el método de detección TaqMan® de PCR en tiempo real implicado en la presente invención, puede ser la sonda de la presente invención descrita anteriormente. En un sentido práctico, se puede emplear una sonda que comprende una secuencia de nucleótidos del producto de extensión del cebador que se prevé que se va a obtener cuando la PCR en tiempo real se lleva a cabo mediante el uso combinado de un cebador directo y un cebador inverso seleccionados, o una sonda que comprende una secuencia de nucleótidos diseñada adicionalmente a partir de tal secuencia.

Como un ejemplo de referencia, la sonda que se utiliza cuando se lleva a cabo la PCR en tiempo real mediante el uso combinado de Mint 02\_T7pa Fw1 y Mint T7pa 02\_Rv1, incluye un oligonucleótido que comprende una parte o la totalidad de la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 92 y que se prevé que se va a amplificar en la PCR en tiempo real.

La sustancia fluorescente informadora para marcar el extremo 5'-terminal de la sonda marcada incluye carboxifluoresceína (FAM), hexaclorofluoresceína (HEX), tetraclorofluoresceína (TET), Cy5, VIC, etc.; y entre ellos FAM es el que se utiliza comúnmente.

El colorante extintor para marcar el extremo 3'-terminal incluye una sustancia fluorescente tal como carboxitetrametilrodamina (TAMRA), una sustancia no fluorescente tal como colorante extintor "Black Hole Quencher" (por ejemplo, BHQ2), ácido 4-((4-(dimetilamino)fenil)azo)benzoico (DABCYL), etc.; y entre ellos TAMRA se utiliza comúnmente.

5 Otros reactivos que se van a utilizar para el sistema de detección TaqMan® de PCR en tiempo real, tales como desoxirribonucleósido 3-fosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), ADN polimerasa, etc., pueden ser los mismos reactivos que se emplean generalmente en la PCR en tiempo real convencional, y el procedimiento de la PCR en tiempo real se puede llevar a cabo de acuerdo con el protocolo habitual de la PCR en tiempo real, excepto para el uso del cebador y la sonda de la presente invención.

10 A modo de ejemplo del método para la detección de *M. intracellulare* por el sistema detección TaqMan® de PCR en tiempo real implicado en la presente invención, tomando un caso en el que *M. intracellulare* se detecta usando el "cebador Mint 02\_T7pa Fw1" y el "cebador Mint T7pa 02\_Rv1" descritos anteriormente como ejemplo, el método se explicará de la siguiente manera.

En primer lugar, una muestra de ADN purificada se obtiene a partir de la muestra por un método conocido.

15 Por otra parte, por ejemplo, usando un sintetizador de ADN, un oligonucleótido (Mint 02\_T7pa Fw1) que consiste en una secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 16 y un oligonucleótido (Mint 02\_T7pa Rv1) que consiste en una secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 17, se sintetizan por el método de la fosforamidita.

20 Además, a partir de la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 92 que se anticipa que va a ser amplificada con la PCR utilizando la pareja de cebadores Mint 02\_T7pa Fw1 y Mint 02\_T7pa Rv1 como cebador, se diseña una secuencia para uso como sonda, y se sintetiza un oligonucleótido que tiene esa secuencia de nucleótidos. El extremo 5'-terminal de ese oligonucleótido se acopla con un colorante informador de FAM y el extremo 3'-terminal con un extintor informador de TAMRA, mediante un procedimiento de rutina, y de este modo se obtiene una sonda marcada con fluorescencia.

Usando el Mint 02\_T7pa Fw1 sintetizado anteriormente como cebador directo y el Mint 02\_T7pa Rv1 como cebador inverso, la PCR en tiempo real se lleva a cabo, por ejemplo, del modo siguiente:

25 A saber, se prepara una solución tampón Tris-HCl 10 mM (pH 8,9) que contiene de 0,1 µM a 2 µM de cada cebador, preferiblemente 1 µM de cada uno de Mint 02\_T7pa Fw1 y Mint 02\_T7pa Rv1, de 100 nM a 1000 nM de sonda marcada con fluorescencia, de 1,0 mM a 4,0 mM de MgCl<sub>2</sub>, KCl, BSA, colato de sodio, 0,005% a 0,2% de Triton X-100, aproximadamente 0,2 mM de cada dATP, dCTP, dGTP y dTTP, y de 10 unidades/ml a 80 unidades/ml de polimerasa, tal como la ADN polimerasa Taq, y se utiliza como una solución de reacción para la PCR. A esta  
30 solución de reacción para la PCR, se añade la muestra de ADN purificada para obtener una muestra para la PCR.

Con el uso de esta muestra para la PCR, la PCR en tiempo real se lleva a cabo utilizando un equipamiento de detección apropiado para la PCR en tiempo real, etc. La reacción se repite en 30 a 50 ciclos, y en cada ciclo, se mide la intensidad de la fluorescencia obtenida a partir del colorante informador.

35 En cuanto al método para la detección de *M. intracellulare* en este caso, cuando se observa la fluorescencia obtenida a partir del colorante informador, se determina que la muestra es positiva para *M. intracellulare*.

Además, en el método de PCR en tiempo real, dado que se puede generar una curva estándar, se puede obtener la cantidad de ADN genómico (número de copias) de *M. intracellulare* en la muestra. Además, dado que la cantidad es proporcional a la cantidad de células de *M. intracellulare*, la cantidad de *M. intracellulare* en la muestra (espécimen) también se puede determinar.

40 El método para generar la curva estándar se puede realizar de acuerdo con el procedimiento de rutina llevado a cabo comúnmente en el método de la PCR en tiempo real. Por ejemplo, usando una muestra de ADN genómico con un número de copias conocido, obtenida a partir de *M. intracellulare* como patrón, se prepara una serie de diluciones de la concentración (número de copias) de la muestra de ADN para la PCR. Después de lo cual, usando cada una de las diluciones de la serie de la muestra de ADN para la PCR, la PCR en tiempo real se lleva a cabo de acuerdo  
45 con el método descrito anteriormente, y se mide la intensidad de la fluorescencia obtenida a partir del colorante informador. Para cada concentración de la serie de diluciones de la muestra de ADN para la PCR, el valor medido de la intensidad de la fluorescencia (Rn, eje y) se traza en un gráfico para cada número de ciclo de la PCR (eje x) para generar una curva de amplificación. Posteriormente, se selecciona una parte de Rn en donde la intensidad de la fluorescencia se amplifica exponencialmente, y se dibuja una línea umbral (Th). El punto de cruce de la Th con  
50 una curva de amplificación de cada muestra de ADN para la PCR se define como el valor del ciclo umbral (Ct). Después de esto, el valor de Ct (eje y) se traza en un gráfico para el valor logarítmico del número de copias de cada muestra de ADN para la PCR (eje x), y una curva aproximada obtenida para cada Ct se puede utilizar como curva estándar.

55 Cuando la PCR en tiempo real se lleva a cabo por el método de intercalador descrito anteriormente, la curva estándar también se puede generar por la misma vía, basándose en el valor de la medición obtenida. Por ejemplo, una curva de amplificación se genera trazando un gráfico del valor de la medición de la intensidad de la

fluorescencia obtenida a partir del intercalador (Rn, eje y) para cada número de ciclo de la PCR (eje x). Después de lo cual, el valor de Ct se obtiene de la misma manera que se ha descrito anteriormente, y el valor de Ct (eje y) se representa por el valor logarítmico del número de copias de cada muestra de ADN utilizada para la PCR (eje x), y una curva aproximada obtenida para cada Ct se puede utilizar como curva estándar.

5 Para la determinación cuantitativa de la cantidad de ADN genómico (número de copias) de *M. intracellulare* en una muestra, en primer lugar, el ADN se aísla y se purifica a partir de la muestra; la PCR en tiempo real para la muestra de ADN obtenida se lleva a cabo; y se genera una curva de amplificación de la misma manera. Se obtiene el valor de Ct en el punto en donde la curva de amplificación obtenida cruza la Th obtenida cuando se genera la curva estándar. Mediante el ajuste del valor de Ct con la curva estándar, se puede obtener la cantidad (número de copias) de ADN genómico de *M. intracellulare* en la muestra.

(A-3) El método en el que, después de llevar a cabo la reacción de amplificación del ácido nucleico, los productos de extensión obtenidos con el cebador se someten a electroforesis, y la detección se realiza basándose en los resultados de la electroforesis

15 Este método incluye, por ejemplo, "el método para detectar *M. intracellulare* que comprende las siguientes etapas de:

(i) llevar a cabo una reacción de amplificación del ácido nucleico usando como cebador un oligonucleótido que consiste en la secuencia de nucleótidos mostrada en cualquiera de SEQ ID NO: 40 a SEQ ID NO: 47, o consultando la secuencia complementaria a la secuencia de nucleótidos mostrada en cualquiera de SEQ ID NO: 40 a SEQ ID NO: 47, en donde el oligonucleótido es capaz de hibridarse con la secuencia de nucleótidos de *Mycobacterium intracellulare*, y emplear un ácido nucleico en una muestra como molde;

(ii) llevar a cabo una electroforesis del producto de extensión obtenido con el cebador en el apartado (i); y detectar *Mycobacterium intracellulare* basándose en el resultado obtenido de la electroforesis".

Un ejemplo específico de la reacción de amplificación del ácido nucleico es como se ha descrito anteriormente.

25 El método para la determinación de la presencia de *M. intracellulare* basándose en los resultados de la electroforesis incluye, por ejemplo,

(A-3-1) un método en el que la determinación se realiza mediante una confirmación de una fracción del producto de extensión del cebador que tiene un tamaño deseado (número de pares de bases);

(A-3-2) un método en el que la determinación se realiza mediante hibridación utilizando una sonda marcada.

30 Las condiciones, los procedimientos operativos y similares de la electroforesis pueden estar de conformidad con los del método convencional llevado a cabo por lo general en este campo.

Los métodos (A-3-1) y (A-3-2) se describen a continuación.

(A-3-1) El método en el que la determinación se realiza mediante una confirmación de una fracción del producto de extensión del cebador que tiene un tamaño deseado (número de pares de bases)

35 Por ejemplo, en primer lugar, una combinación apropiada del cebador directo y el cebador inverso se selecciona a partir del cebador de la presente invención, y mediante el uso de la combinación, se lleva a cabo la reacción de amplificación del ácido nucleico tal como una PCR.

40 Posteriormente, el producto de extensión obtenido con el cebador se somete a electroforesis. A partir de la combinación del cebador directo y el cebador inverso usados para la reacción de amplificación del ácido nucleico, se estima de antemano un tamaño (número de pares de bases) del producto de extensión del cebador que se anticipa que se va a amplificar con la PCR, y la confirmación de si la fracción electroforética obtenida es relevante para el tamaño estimado del producto de amplificación, se puede realizar por procedimientos de rutina. Por ejemplo, se incluye el método en el que dicha fracción se tiñe de una manera tal que se visualiza el tipo de ácido nucleico mediante una tinción con bromuro de etidio, etc., el producto de extensión del cebador se confirma basándose en su tamaño característico (número de pares de bases). Y cuando el producto de extensión del cebador que tiene un número de pares de bases deseado se confirma, se puede determinar que la muestra es positiva para *M. intracellulare*.

50 Un ejemplo específico del método para la determinación a través del método de (A-3-1) incluye, por ejemplo, un método en el que, después de llevar a cabo la PCR usando una combinación del cebador directo y el cebador inverso que aparece en la Tabla 1 descrita anteriormente, el producto de extensión del cebador se somete a electroforesis, y cuando se confirma un oligonucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que se anticipa que se va a amplificar con la combinación de los cebadores empleados, o una fracción que tiene un tamaño correspondiente a la cantidad de pares de bases que se prevé, se puede determinar que la muestra es positiva para *M. intracellulare*.

Ejemplos de referencia específicos del método de (A-3-1) se muestran colectivamente en la Tabla 3 a continuación.

A saber, por ejemplo, el método del número 1 en la Tabla 3 a continuación es "un método en el que, después de llevar a cabo la PCR utilizando un oligonucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 16 como cebador directo y un oligonucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 17 como cebador inverso, el producto de extensión obtenido con los cebadores se somete a electroforesis, y el que se confirma que tiene una fracción de 116 pares de bases o una fracción de oligonucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 92, se determina que es positivo" o "un método en el que, después de llevar a cabo la PCR utilizando un oligonucleótido que comprende la secuencia complementaria a la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO:16 como cebador directo y un oligonucleótido que comprende la secuencia complementaria a la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 17 como cebador inverso, el producto de extensión obtenido con los cebadores se somete a electroforesis, y el que se confirma que tiene una fracción de 116 pares de bases o una fracción de oligonucleótido que comprende una secuencia complementaria a la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 92, se determina que es positivo".

[Tabla 3]

Nº	Cebador directo	Cebador inverso	Diana de detección	
			Número de pares de bases	SEQ ID NO:
1*	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 17	116	SEQ ID NO: 92
2	40	41	137	104
3	42	43	128	105
4	44	45	170	106
5	46	47	189	107
*Ejemplo de Referencia				

Entre los métodos descritos en la Tabla 3 anterior, el método más preferible incluye el método del número 2 y 3 en la Tabla 3.

(A-3-2) El método en el que la determinación se realiza mediante hibridación utilizando una sonda marcada

Por ejemplo, se incluye un método en el que, un producto de extensión obtenido con el cebador mediante la reacción de amplificación del ácido nucleico se somete a electroforesis; la fracción electroforética obtenida se somete a ensayo mediante una hibridación con una sonda marcada que es la sonda de la presente invención (que tiene la secuencia de nucleótidos que se anticipa que se va a amplificar con la combinación del cebador directo y el cebador inverso empleados) marcada con una sustancia marcadora. Cuando la presencia de una fracción hibridada con dicha sonda marcada se confirma mediante la detección de una señal obtenida a partir de la sonda marcada, se puede determinar que la muestra es positiva para *M. intracellulare*.

Ejemplos específicos de la sonda que se va a utilizar y la sustancia marcadora para uso en el marcado de la sonda, y el método para marcar la sonda son como se han descrito anteriormente.

Ejemplos preferibles específicos de estos métodos se muestran colectivamente en la Tabla 4 a continuación.

Por ejemplo, en la Tabla 4, el método del número 1 (ejemplo de referencia) es un "método en el que, después de realizar la PCR empleando un oligonucleótido que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 16 como cebador directo y un oligonucleótido que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 17 como cebador inverso, el producto de extensión obtenido con el cebador se somete a electroforesis. Posteriormente, como la fracción obtenida, se somete a ensayo una hibridación con una sonda marcada que es un oligonucleótido marcado con una sustancia marcadora y que comprende una parte o toda la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 92; y cuando se confirma la fracción que se ha hibridado con dicha sonda marcada detectando la señal obtenida a partir de la sonda marcada, se determina que es positiva" o "un método en el que, después de llevar a cabo la PCR utilizando un oligonucleótido que comprende una secuencia complementaria a la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 16 como cebador directo y un oligonucleótido que comprende una secuencia complementaria a la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 17 como cebador inverso, el producto de extensión obtenido con el cebador se somete a electroforesis. Posteriormente, como la fracción obtenida, se somete a ensayo una hibridación con una sonda marcada que es un oligonucleótido marcado con una sustancia marcadora y que comprende una parte o la totalidad de la secuencia complementaria a la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 92; y cuando se confirma la fracción que se ha hibridado con dicha sonda marcada detectando la señal obtenida a partir de la sonda marcada, se determina que es positiva":

[Tabla 4]

Nº	Cebador directo	Cebador inverso	Secuencia de nucleótidos de la sonda
1*	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 92
2	40	41	104
3	42	43	105
4	44	45	106
5	46	47	107

\*Ejemplo de Referencia

Entre los métodos descritos en la Tabla 4 anterior, el método más preferible incluye el método del número y 3 en la Tabla 4.

- 5 Los detalles del método para la detección de *M. intracellulare* de la presente invención por el método de (A-3) se va a explicar, por ejemplo, haciendo referencia a un caso como en el siguiente ejemplo de referencia, en donde, después de llevar a cabo la PCR usando Mint 02\_T7pa Fw1 como cebador directo y Mint 02\_T7pa Rv1 como cebador inverso y seguida de electroforesis, la detección se realiza por el método de confirmar una fracción del producto de extensión del cebador que tiene el tamaño deseado en pares de bases (el método del número 1 en la Tabla 3 de (A-3-1) anterior), del modo siguiente.

En primer lugar, se obtiene una muestra de ADN purificado a partir una muestra por un método conocido.

Por otra parte, utilizando un sintetizador de ADN, Mint 02\_T7pa Fw1 (un oligonucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 16) y Mint 02\_T7pa Rv1 (un oligonucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 17) son sintetizados por el método de la fosforamidita.

- 15 Empleando un cebador Mint 02\_T7pa Fw1 y un cebador Mint 02\_T7pa Rv1 de la presente invención, la PCR se lleva a cabo.

La solución de la reacción obtenida después de la PCR se somete a una electroforesis en gel de agarosa. Posteriormente, después de la tinción del gel con bromuro de etidio, se detecta la fluorescencia generada mediante radiación de rayos UV. Además, el marcador del peso molecular se somete a electroforesis al mismo tiempo, en paralelo a la solución de la reacción, y se calcula la longitud del fragmento de ADN detectado mediante una comparación de la movilidad relativa. En la PCR que emplea Mint 02\_T7pa Fw1 como cebador directo y Mint 02\_T7pa Rv1 como cebador inverso, se anticipa que el fragmento de ADN con 116 pares de bases (que tiene una secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 92) en la secuencia de nucleótidos de *M. intracellulare*, se podría replicar (véase, el N° 1 en la Tabla 3). En consecuencia, cuando se confirma una banda fluorescente con el tamaño de 116 pares de bases, se puede determinar que la muestra es positiva para *M. intracellulare*.

Además, en la etapa de amplificación del ácido nucleico de la presente invención, se puede aplicar un método de detección mediante el uso de un producto de transcripción de ARN. Por ejemplo, se incluye el método NASBA (amplificación basada en una secuencia de ácido nucleico) (documento JP-B-2650159), el método 3SR (replicación de secuencia autosostenida) (documento JP-B-7-114718), el método TAS (sistema de amplificación basado en la transcripción) (documento JP- A-2-500565: WO 88/10315), el método TMA (amplificación mediada por la transcripción) (documento JP-A-11-46778), etc. Entre ellos, el método de amplificación del ácido nucleico a temperatura constante, empleando un modo concertado de acción de la transcriptasa inversa y la ARN polimerasa (la reacción se lleva a cabo en condiciones tales que se permite que la transcriptasa inversa y ARN polimerasa actúen de manera conjunta) es un método adecuado para la automatización del sistema de determinación.

- 35 (A-4) El método en el que la reacción de amplificación del ácido nucleico se lleva a cabo usando un cebador marcado, y se mide una señal obtenida a partir del producto de extensión obtenido con el cebador.

Se incluye un método en el que empleando un cebador marcado, que es el cebador de la presente invención marcado mediante el método descrito anteriormente, y empleando el ácido nucleico en la muestra como molde, se lleva a cabo la reacción de amplificación del ácido nucleico tal como una PCR; se lleva a cabo la detección/medición de la señal obtenida a partir del producto de extensión obtenido con el cebador; y cuando se detecta la señal, se puede determinar que la muestra es positiva para *M. intracellulare*.

El cebador directo y el cebador inverso que se van a utilizar en este método incluyen los que se utilizan en el método de PCR descrito anteriormente, y los ejemplos específicos de cebador preferible y combinaciones preferibles son, por tanto, como se han descrito anteriormente.

En el caso del método descrito anteriormente, después de realizar la reacción de amplificación del ácido nucleico, se eliminan los cebadores marcados libres; y la señal obtenida a partir del producto de extensión del cebador se mide; y cuando se detecta la señal, se puede determinar que la muestra es positiva para *M. intracellulare*.

5 El método para la eliminación del cebador marcado libre incluye un método en el que, después de que el producto de extensión del cebador en la mezcla de reacción obtenida por la reacción de amplificación del ácido nucleico precipita por el procedimiento de rutina para precipitar ácido nucleico (método de precipitación con etanol, método de precipitación usando isopropanol, etc.), se elimina la solución sobrenadante que contiene el cebador marcado libre no precipitado, etc.

10 Además, se incluye también un método para separar el producto de extensión del cebador a partir del cebador marcado libre mediante el procesamiento de la mezcla de reacción obtenida por la reacción de amplificación del ácido nucleico mediante cromatografía en gel, en condiciones apropiadas y un método para la separación mediante electroforesis en condiciones apropiadas.

(B) Un método en el que el oligonucleótido de la presente invención se marca con una sustancia marcadora y se utiliza como sonda marcada.

15 Además, el método para la detección de *M. intracellulare* de la presente invención incluye un método en el que un oligonucleótido de la presente invención se marca con una sustancia marcadora y se utiliza como sonda marcada, se permite que dicha sonda marcada se hibride con el ácido nucleico en la muestra, y después de eliminar la sonda marcada libre, se detecta la señal obtenida a partir del complejo hibridado.

Específicamente, por ejemplo, se incluyen los siguientes métodos.

20 (B-1) Un método de detección en el que el oligonucleótido de la presente invención que está unido al soporte sólido se utiliza como sonda de captura, y mediante la realización de la hibridación con ácido nucleico en la muestra, el ácido nucleico obtenido a partir de *M. intracellulare* se inmoviliza sobre la fase sólida (véase, por ejemplo, la descripción en el documento JP-A-62-265999).

25 En el caso de este método, el oligonucleótido de la presente invención o el soporte sólido se puede marcar con una sustancia marcadora.

30 (B-2) Un método para realizar el ensayo de tipo sándwich en el que una sonda de captura sin marcar de (B-1) y la sonda marcada que es la sonda de la presente invención, se permite que se hibriden con ácido nucleico en la muestra para formar un complejo de sonda de captura y ácido nucleico obtenido a partir de *M. intracellulare* y sonda marcada sobre el soporte sólido, a continuación, se mide la señal obtenida a partir de la sonda marcada (véase, por ejemplo, la descripción en el documento JP-A-58-40099).

(B-3) Un método en el que utilizando una sonda marcada con biotina de la presente invención, se realiza la hibridación con ácido nucleico en la muestra, y después de lo cual, el ácido nucleico obtenido a partir de *M. intracellulare* en la muestra, es atrapado por el soporte unido a avidina.

35 Cabe señalar que, en cuanto a los reactivos que se utilizarán para el método para detectar *M. intracellulare* de la presente invención, se pueden utilizar los reactivos utilizados habitualmente en este campo, por ejemplo, agente tamponador, estabilizador, conservantes, los cuales no inhiben la estabilidad de los reactivos coexistentes ni inhiben la reacción de amplificación del ácido nucleico, tal como una PCR, ni la reacción de hibridación. Y la concentración de los reactivos se puede seleccionar adecuadamente dentro del intervalo de concentración utilizado normalmente en este campo.

40 Un ejemplo específico de solución tampón incluye todos los tipos de soluciones tampón utilizadas normalmente para llevar a cabo la PCR y la reacción de hibridación, por ejemplo, tampón Tris, tampón fosfato, tampón veronal, tampón borato, tampón Good; y el pH de la solución tampón no está particularmente limitado, pero generalmente es preferible dentro del intervalo entre pH 5 a pH 9.

45 Además, si es necesario, se puede utilizar la sintetasa de ácido nucleico (ADN polimerasa, ARN polimerasa, transcriptasa inversa, etc.), los sustratos correspondientes a la enzima (dNTP, rNTP), y además un intercalador de cadena doble (bromuro de etidio, SYBR<sup>®</sup> Green), y de forma alternativa, la sustancia de detección de la señal: tal como FAM y TAMRA.

50 El kit de reactivos para la detección de *M. intracellulare* de la presente invención incluye "un kit de reactivos para la detección de *M. intracellulare* que comprende un oligonucleótido como cebador (el cebador de la presente invención). El cebador puede ser el que está marcado con una sustancia marcadora. El ejemplo específico de la sustancia marcadora es como se ha descrito anteriormente.

Los ejemplos específicos del cebador de la presente invención que constituye el kit descrito anteriormente, son como se han descrito anteriormente en la explicación del "cebador de la presente invención".

El cebador de la presente invención puede ser el que está marcado con una sustancia marcadora. Un ejemplo específico de la sustancia marcadora es como se ha descrito anteriormente.

5 El kit que comprende el cebador de la presente invención también incluye una composición que comprende una pareja de cebador directo e inverso. La combinación preferible de cebador directo y cebador inverso es como se ha descrito anteriormente.

Además, el kit descrito anteriormente puede comprender adicionalmente un oligonucleótido de la presente invención que está marcado con una sustancia marcadora, como una sonda marcada.

10 Además, el kit de la presente invención comprende "un kit de reactivos para la detección de *M. intracellulare* que comprende un oligonucleótido como cebador (el cebador de la presente invención) y/o una sonda (la sonda de la presente invención), que comprende una parte o la totalidad de la secuencia de nucleótidos mostrada en cualquiera de SEQ ID NO: 6 o una parte o la totalidad de la secuencia complementaria a la secuencia de nucleótidos mostrada en cualquiera de SEQ ID NO: 6, en donde el oligonucleótido es capaz de hibridarse con la secuencia de nucleótidos del gen de *M. intracellulare*". La sonda puede ser la que está marcada con una sustancia marcadora.

15 La realización preferible y ejemplos específicos de los reactivos constituyentes que componen estos kits son como se han descrito anteriormente.

20 Hay que señalar que el kit de reactivos para la detección de *M. intracellulare* de la presente invención puede comprender, por ejemplo, agente tamponador, estabilizador, conservantes, etc., que no inhiben la estabilidad de los reactivos coexistentes ni inhiben la reacción de amplificación del ácido nucleico, tal como la PCR, y la reacción de hibridación. Además, la concentración de los reactivos se puede seleccionar adecuadamente a partir del intervalo de concentración utilizada normalmente en este campo.

Un ejemplo específico de la solución tamponadora incluye todos los tipos de soluciones tamponadoras que se utilizan normalmente para llevar a cabo la PCR y la reacción de hibridación, por ejemplo, tampón Tris, tampón fosfato, tampón veronal, tampón borato, tampón Good, y el pH no está particularmente limitado, pero generalmente es preferible dentro del intervalo entre pH 5 a pH 9.

25 Además, si es necesario, puede estar contenida en el kit una sintetasa de ácido nucleico (ADN polimerasa, ARN polimerasa, transcriptasa inversa), sustratos correspondientes a la enzima (dNTP, rNTP), y además intercalador de cadena doble (bromuro de etidio, SYBR<sup>®</sup> Green), y de forma alternativa, la sustancia de detección de la señal: tal como FAM y TAMRA.

30 En lo sucesivo, la presente invención se explicará adicionalmente en detalle haciendo referencia a los siguientes Ejemplos. Los Ejemplos que no pertenecen al alcance de las reivindicaciones tienen fines ilustrativos.

Hay que señalar que todas las bacterias utilizadas en los Ejemplos son aislados clínicos, y sus especies bacterianas ya se han diferenciado por la morfología de la colonia y diversos ensayos bioquímicos convencionales sobre la bacteria cultivada.

## EJEMPLOS

35 Ejemplo 1: Selección de un clon obtenido a partir de *M. intracellulare*.

(1) Preparación de una muestra de ADN obtenida a partir de *M. intracellulare*.

40 En primer lugar, *Mycobacterium intracellulare* JCM6384 (donado por el Instituto de Investigación Física y Química), una cepa de referencia de *M. intracellulare*, se suspendió en agua purificada y se trató en un autoclave (a 120°C, 2 atmósferas, durante 20 minutos). Posteriormente, después de que la célula bacteriana se había sometido a un tratamiento de ruptura (ruptura física usando perlas de vidrio de 2 mm de diámetro), la suspensión se centrifugó, y de este modo se obtuvo una solución sobrenadante. A partir de la solución sobrenadante obtenida, se realizó una extracción y purificación del ADN mediante el uso de un kit de extracción y purificación de ADN de tipo resina de intercambio iónico, Genomic-tip, producido por Quiagen GmbH, y se obtuvo ADN genómico purificado obtenido a partir de *M. intracellulare* (*Mycobacterium intracellulare* JCM6384).

45 El ADN genómico purificado obtenido a partir de *M. intracellulare* se ajustó para proporcionar una concentración final de 400 ng/μL (en tampón Tris-HCl 10 mM, pH 8,9), y se utilizó como "muestra de ADN obtenida a partir de *M. intracellulare*".

(2) Preparación de la genoteca aleatoria del genoma completo

50 Empleando 24 μg de la muestra de ADN obtenida a partir de *M. intracellulare* en el apartado (1) descrito anteriormente como material, la genoteca aleatoria del genoma completo se preparó por el método siguiente (un método modificado a partir del método aleatorio de genoma completo descrito en Science 2001 Feb 16; 291 (5507): 1304-1351, Venter et al.).

5 En primer lugar, la muestra de ADN obtenida a partir de *M. intracellulare* en el apartado (1) descrito anteriormente, se fragmentó mediante el un tratamiento con uso de un nebulizador (producido por Invitrogen Corp.) en presencia de una concentración final del 20% de glicerol, a una presión de 5 kPa a 9 kPa durante aproximadamente 10 minutos. Mediante este tratamiento, una fracción (fragmento de ADN) con el tamaño deseado de 500 a 1000 pares de bases se recuperó eficientemente. La fracción obtenida se purificó usando una columna de extracción producida por Quiagen GmbH.

10 Posteriormente, usando el kit DNA Blunting (producido por Takara Bio Inc.) y mediante el uso de la actividad polimerasa 5' → 3' y la actividad exonucleasa 3' → 5' de la ADN polimerasa T4, los extremos terminales del fragmento de ADN obtenido se volvieron romos. Este fragmento de ADN se sometió a una reacción de ligación con el vector pBSII sk<sup>+</sup> de extremos romos (producido por Stratagene Corp.), y se preparó un ADN recombinante del vector pBSII sk<sup>+</sup> (*amp<sup>r</sup>*) en el que se insertó el fragmento de ADN.

Empleando células competentes de *E. coli* JM109 producidas por Takara Bio Inc., se realizó la transformación de las células competentes de *E. coli* JM109, utilizando el ADN recombinante obtenido anteriormente de acuerdo con el protocolo del producto.

15 El transformante obtenido se cultivó en una placa sobre medio de LB-agarosa que contenía 100 µg/ml de ampicilina, IPTG 0,2 mM y 40 µg/ml de X-Gal. Las colonias blancas se recogieron, y de este modo se obtuvo una genoteca del transformante (genoteca aleatoria de clones del genoma completo de ADN genómico obtenido a partir de *M. intracellulare*), en el que se había introducido mediante transducción "el ADN recombinante con el fragmento de ADN deseado integrado".

20 (3) Preparación de la micromatriz

Empleando la genoteca de transformantes obtenida en el apartado (2) descrito anteriormente (genoteca aleatoria de clones del genoma completo de ADN genómico obtenido a partir de *M. intracellulare*), la PCR se llevó a cabo por el método siguiente, y se preparó un material de sonda que se iba a fijar sobre un portaobjetos de vidrio.

25 En primer lugar, se preparó una solución tampón de Tris-HCl 10 mM (pH 8,9) que contenía 1 µM de cada uno de los cebadores M13 Primer M1 (producido por Takara Bio Inc.) y el cebador M13 Primer RV (producido por Takara Bio Inc.), MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, KCl 80 mM, 500 mg/ml de BSA, 0,1% de colato de sodio, 0,1% de Triton X-100 (polioxietilén octilfenil éter; nombre del producto de Rohm and Haas Co., Ltd.), 0,2 mM de cada dATP, dCTP, dGTP y dTTP, y 40 unidades/ml de ADN polimerasa Taq (producida por Nippon gene Co., Ltd.) y se utilizó como una solución de reacción para la PCR.

30 El ADN se purificó a partir de cada transformante (clones aleatorios del genoma completo de ADN genómico obtenido a partir de *M. intracellulare*) obtenido en el apartado (2) descrito anteriormente, de acuerdo con el procedimiento de rutina. Este ADN purificado (que se iba a utilizar como molde en la PCR posterior) se añadió a 20 µL de la solución de la reacción y se suspendió, y la suspensión preparada se empleó como una muestra para la PCR. Utilizando esta muestra para la PCR, se realizaron 30 ciclos de PCR con las siguientes condiciones de  
35 reacción, utilizando el ciclador térmico de ADN (DNA Engine PTC200, producido por MJ Research Inc.).

Condiciones de la reacción de PCR:

Desnaturalización térmica: 94°C durante 0,5 minutos;

Reasociación: 55°C durante 1 minuto;

Reacción de polimerización: 75°C durante 0,5 minutos.

40 El producto obtenido de la amplificación con PCR se purificó, y después se mezcló con tampón de inmovilización (concentración final: 3 x SSC).

45 La concentración final del producto de la PCR que se iba a extender en manchas, se ajustó para proporcionar 300 ng/µL, y el uso de un instrumento de tipificado (GTMAS Stamp II; producido por Nippon Laser & Electronics Co., Ltd) que se fijó en 55% de humedad en el instrumento, el producto de la amplificación con PCR obtenido anteriormente se extendió en manchas (diámetro de la mancha: 150 µm a 250 µm) sobre un portaobjetos de vidrio (CMT GAPS-II; producido por Corning Inc.). El portaobjetos de vidrio con manchas listo se transfirió a un reticulador de UV (UV Stratalinker 1800; producido por Stratagene Co., Ltd.), y se irradió luz UV de 150 mJ/cm<sup>2</sup> para fijar el producto de la amplificación con PCR (que tenía una secuencia de nucleótidos deseada del ADN genómico obtenido a partir de *M. intracellulare*) sobre el portaobjetos de vidrio, y por lo tanto se preparó la micromatriz (un micromatriz preparada a  
50 partir de la genoteca aleatoria de clones del genoma completo de ADN genómico obtenido a partir de *M. intracellulare*, como material sobre el que se habían fijado 2.000 clones en total).

(4) Marcado fluorescente del ADN genómico diana

(i) Marcado fluorescente del ADN genómico diana

El marcado fluorescente del ADN genómico diana se llevó a cabo usando un sistema de marcado de ADN de BioPrime (producido por Invitrogen Corporation).

5 En primer lugar, después de obtener 2 µg de ADN genómico purificado obtenido a partir de *M. intracellulare* en el apartado (1) descrito anteriormente, se mezclaron con 20 µL de solución de cebador aleatorio contenido en el envase del producto, la mezcla se sometió a un tratamiento térmico de desnaturalización (95°C durante 5 minutos), y de este modo, se obtuvo la solución de la muestra. Por separado, se extrajo el ADN genómico y se purificó a partir de *M. avium* (IID 585) mediante un procedimiento de rutina (ADN genómico de referencia), y el mismo tratamiento se llevó a cabo, y de este modo se obtuvo la solución de la muestra (referencia).

10 Posteriormente, a cada solución de la muestra obtenida, se añadieron 2 µL de DTT 0,1 M, 2 µL de la solución mixta de dATP/dCTP/dGTP (cada uno 5 mM), 0,8 µL de dTTP 2,5 mM, 1,6 µL de Ha-dUTP 5 mM y 1 µL de enzima Klenow (40 U/µL) y se ajustó para proporcionar el volumen total de 50 µL con agua desionizada estéril, y luego la reacción de extensión se llevó a cabo a 37°C durante 3 horas.

15 Una columna de ultrafiltración, Microcon YM-30 (producida por Millipore Corporation), se acopló al tubo de 1,5 mL adjunto y el producto de reacción obtenido anteriormente se colocó sobre la columna y se centrifugó a 14.000 rpm durante 4 minutos. El líquido concentrado se recuperó en un microtubo y se secó a fondo usando una secadora centrífuga a vacío (concentrador CentriVap; producido por LABCONCO Corporation).

Al producto seco de la reacción obtenido anteriormente se añadieron 10 µL de NaHCO<sub>3</sub> 50 mM y se mezclaron, luego se dejó reposar a temperatura ambiente durante 2 a 3 minutos.

20 Por separado, se disolvió 1 mg de Alexa647 (producido por Invitrogen Corporation) o Alexa555 (producido por Invitrogen Corporation) en 105 µL de DMSO (solución de colorante Alexa647, solución de colorante Alexa555). Se añadió una parte alícuota de 10 µL de esta solución de colorante Alexa647 al producto de la reacción descrito anteriormente que se había obtenido mediante el uso de ADN genómico obtenido a partir de *M. intracellulare*, y se incubó (bajo protección de la luz) a 40°C durante 60 minutos. Además, una parte alícuota de 10 µL de esta solución de colorante Alexa555 se añadió al producto de la reacción descrito anteriormente, que se había obtenido mediante el uso de ADN genómico (obtenido a partir de *M. avium*) de referencia, y se incubó de un modo similar (bajo protección de la luz) a 40°C durante 60 minutos.

25 Además, a cada producto de la reacción descrita anteriormente después de la incubación, se añadieron 10 µL de NH<sub>2</sub>OH 4 M (preparado justo antes del uso) y se mezclaron, y se incubaron (bajo protección de la luz) durante 15 minutos, y con ello se obtuvieron los respectivos productos marcados, es decir, el producto marcado de ADN genómico marcado con Alexa647 obtenido a partir de *M. intracellulare*, y el producto marcado de ADN genómico marcado con Alexa555 obtenido a partir de *M. avium*.

30 Una columna de ultrafiltración, Microcon YM-30 (producida por Millipore Corporation), se acopló al tubo de 1,5 mL adjunto, y luego cada uno de los productos marcados obtenidos anteriormente de ADN genómico, se colocó sobre la columna y se centrifugó a 14.000 rpm durante 4 minutos, y a continuación, el líquido concentrado se recuperó en un microtubo y se secó a fondo usando una secadora centrífuga a vacío (concentrador CentriVap; producido por LABCONCO Corporation).

(ii) Proceso de fragmentación de los productos marcados

35 A los productos marcados de cada ADN genómico en estado seco, obtenidos en el apartado descrito anteriormente (i) de (4), se añadieron 40 µL de una solución con una composición de las concentraciones finales de Tris-acetato 0,04 M (pH 8,1), acetato de potasio 0,1 M y acetato de magnesio tetrahidrato 0,03 M y se mezclaron en suspensión. Después de lo cual, las suspensiones se trataron térmicamente a 94°C durante 15 minutos, y se obtuvieron los productos de la fragmentación de cada uno de los ADN genómicos marcados con 100 a 300 bases (en lo sucesivo, se hace referencia a cada uno como "producto marcado con Alexa555" y "producto marcado con Alexa647").

40 Hay que señalar que la eficacia del marcado (base/colorante) se controló a través del uso del método de marcado indirecto. Como resultado, se confirmó que, con respecto a Alexa647, se incorporaba una molécula de colorante aproximadamente cada 100 a 200 bases. Además, con respecto a Alexa555, se confirmó que se incorporaba una molécula de colorante aproximadamente cada 150 bases.

45 Cada producto obtenido marcado con Alexa647 y marcado con Alexa555 se colocó sobre una columna de ultrafiltración de Microcon YM-10 (producida por Millipore Corporation), y después se centrifugó a 14.000 rpm durante 4 minutos. Después de lo cual, las soluciones concentradas se recuperaron en el mismo microtubo único, y después se secaron a fondo usando una secadora centrífuga a vacío (concentrador CentriVap; producido por LABCONCO Corporation). Posteriormente, se añadieron los reactivos siguientes al microtubo y se mezclaron en suspensión, y por lo tanto, el producto marcado seco se disolvió.

Tampón de hibridación ArrayHyb (producido por SIGMA Co., Ltd.); 40 µL

55 ADN de espermatozoos de salmón (10 mg/ml); 0,5 µL

Formamida; 5  $\mu$ L

Total; 40  $\mu$ L a 50  $\mu$ L

5 Mediante el procedimiento descrito anteriormente, se obtiene una solución mixta de productos marcados con Alexa555/Alexa647 que comprende un producto de la fragmentación del producto marcado con Alexa647 de ADN genómico obtenido a partir de *M. intracellulare* y un producto de la fragmentación del producto marcado con Alexa555 de ADN genómico de referencia obtenido a partir de *M. avium*.

La solución mixta obtenida de los productos marcados con Alexa555/Alexa647 se incubó a 95°C durante 5 minutos, y se mantuvo a 70°C hasta el uso en la hibridación.

#### (5) Hibridación de la micromatriz

10 Sobre la micromatriz (chip de ADN) de la genoteca aleatoria de clones del genoma completo de ADN genómico obtenido a partir de *M. intracellulare* obtenido en la etapa (3) descrita anteriormente, la solución mixta de los productos marcados con Alexa555/Alexa647 preparados en el apartado (ii) de (4) descrito anteriormente, se colocó en su totalidad, y se cubrió con una cubierta de vidrio de manera que no hubiera ninguna burbuja de aire dentro. La micromatriz se dispuso sobre una Hybri-cassette y se colocó sobre una alfombrilla Kim Towel humedecida con agua  
15 destilada en un Tupperware y se cerró herméticamente, y se mantuvo (bajo protección de la luz) a 65°C durante 8 horas o más para permitir la hibridación. Después de la hibridación, la micromatriz se empapó en una solución de 2 x SSC que contenía 0,1% de SDS junto con la cubierta de vidrio a temperatura ambiente, y la micromatriz se agitó suavemente en la solución para eliminar la cubierta de vidrio. Posteriormente, después de un lavado secuencial con una solución 1 x SSC que contenía 0,03% de SDS (a 60°C) durante 10 minutos, una solución de 0,2 x SSC (a 42°C)  
20 durante 10 minutos y una solución de 0,05 x SSC (a temperatura ambiente) durante 10 minutos, la micromatriz se transfirió rápidamente a un estante nuevo seco y se secó inmediatamente mediante centrifugación a 800 rpm durante 5 minutos.

#### (6) Medición de la intensidad de la fluorescencia: desde la detección de la señal a la cuantificación

25 Empleando un escáner de lectura de la fluorescencia GenePix 4000B (producido por Axon Instruments Inc.), se midió la intensidad de la fluorescencia en la micromatriz obtenida en el apartado (5) descrito anteriormente, que recibió el tratamiento de hibridación de la micromatriz. En esta ocasión, con el fin de analizar los resultados de la hibridación competitiva mediante el uso del producto marcado con Alexa555 y el producto marcado con Alexa647, se midieron 2 canales, es decir, la fluorescencia de 2 canales (Alexa555, Alexa647).

30 La cuantificación de la señal de la fluorescencia se realizó usando una matriz DNASIS<sup>®</sup> (programa informático para el análisis de imágenes de expresión del tip de ADN; producido por Hitachi Software Engineering Co.). A saber, de acuerdo con el procedimiento operativo del programa informático, el reconocimiento automático de manchas, el cálculo del ruido de fondo y la normalización de la relación de la intensidad de la fluorescencia, se llevaron a cabo. Además, mediante el establecimiento de una línea límite del umbral de confiabilidad, y evitando un valor más bajo que esa línea, se obtuvo una relación de la intensidad de la fluorescencia normalizada fiable.

35 Además, basándose en la relación de la intensidad de la fluorescencia (Relación) entre Alexa555/Alexa647 detectada sobre la micromatriz, según el procedimiento de rutina, se llevó a cabo el análisis del diagrama de dispersión.

40 A saber, cuando la relación de la intensidad de la fluorescencia entre Alexa647 y Alexa555 para una determinada mancha de la micromatriz es alta, esto indica que el fragmento de ADN (producto de la PCR) de la mancha se había hibridado más fuertemente con el producto marcado con Alexa647, es decir, con el ADN genómico obtenido a partir de *M. intracellulare*. Por otra parte, cuando se observa que la relación de la intensidad de la fluorescencia entre Alexa647 y Alexa555 para una determinada mancha de la micromatriz es baja, esto indica que el fragmento de ADN de la mancha tiene una especificidad baja para el ADN genómico obtenido a partir de *M. intracellulare*, pero tiene una reacción cruzada con el producto marcado con Alexa555, a saber, con el ADN genómico de referencia obtenido a partir de *M. avium* (hibridado con el ADN genómico de referencia obtenido a partir de *M. avium*).  
45

Mediante este método, se calculó la relación de la intensidad de la fluorescencia para la totalidad de las manchas de la micromatriz. Y se seleccionaron las manchas que tenían una intensidad de la fluorescencia elevada y que tenían una relación de la intensidad de la fluorescencia elevada entre Alexa647 y Alexa555.

#### (7) Escrutinio secundario utilizando otras cepas de *M. intracellulare*

50 Empleando varias cepas de *M. intracellulare* (donadas por la Sociedad Japonesa de Bacteriología) descritas a continuación en la Tabla 5, del mismo modo que se ha descrito en (1), se preparó una "muestra de ADN obtenida a partir de *M. intracellulare*", a partir de las diversas cepas.

[Tabla 5]

Especie	Cepa	Origen
<i>M. intracellulare</i>	GTC MY494	Escuela de Medicina de la Universidad de Gifu
<i>M. intracellulare</i>	GTC MY483	Escuela de Medicina de la Universidad de Gifu
<i>M. intracellulare</i>	GTC MY482	Escuela de Medicina de la Universidad de Gifu
<i>M. intracellulare</i>	GTC M91-273	Escuela de Medicina de la Universidad de Gifu
<i>M. intracellulare</i>	GTC M91-269	Escuela de Medicina de la Universidad de Gifu
<i>M. intracellulare</i>	GTC M3278	Escuela de Medicina de la Universidad de Gifu
<i>M. intracellulare</i>	GTC M3274	Escuela de Medicina de la Universidad de Gifu
<i>M. intracellulare</i>	GTC M3273	Escuela de Medicina de la Universidad de Gifu
<i>M. intracellulare</i>	GTC M3272	Escuela de Medicina de la Universidad de Gifu
<i>M. intracellulare</i>	JCM6384	Instituto de Física y Química

Posteriormente, mediante el mismo método que se ha descrito en los apartados (i) a (ii) de (4) descritos anteriormente, se obtuvieron los productos marcados de ADN genómico obtenidos a partir de cada cepa de *M. intracellulare* que se había marcado con Alexa647, y luego se obtuvieron sus productos de fragmentación.

- 5 Además, mediante el mismo método que se ha descrito en los apartados (i) a (ii) de (4) anteriores, se obtuvo el producto marcado de ADN genómico obtenido a partir de *M. avium* que se había marcado con Alexa555, y luego se obtuvieron sus productos de fragmentación.

10 Después, por el mismo método que se ha descrito en los apartados (i) a (ii) de (4) anteriores, se obtuvieron las soluciones mixtas de productos marcados con Alexa555/Alexa647 que comprendían productos de fragmentación respectivos del producto marcado con Alexa647 de ADN genómico obtenido a partir de cada cepa de *M. intracellulare* y un producto de fragmentación del producto marcado con Alexa555 de ADN genómico de referencia obtenido a partir de *M. avium*.

15 Usando cada solución mixta obtenida de productos marcados con Alexa555/Alexa647, se realizó la hibridación competitiva del producto marcado con Alexa555 y el producto marcado con Alexa647 para la micromatriz del clon aleatorio del genoma completo de ADN genómico obtenido a partir de *M. intracellulare* obtenido en el apartado (3) del Ejemplo 1, y la medición de la intensidad de la fluorescencia mediante los mismos procedimientos como se han descrito en los apartados (5) a (6) anteriores.

20 Además, por el mismo método que se ha descrito en el apartado (6) anterior, basándose en la relación de la intensidad de la fluorescencia (Relación) entre Alexa555/Alexa647 detectada sobre la micromatriz, y de acuerdo con el procedimiento de rutina, se llevó a cabo el análisis gráfico de la dispersión.

Basándose en los resultados obtenidos del análisis, por el mismo método descrito en el apartado (6) anterior, se calculó la relación de la intensidad de la fluorescencia para la totalidad de las manchas de la micromatriz, y se seleccionaron las manchas que tenían una intensidad de la fluorescencia elevada y que tenían una relación de la intensidad de la fluorescencia elevada entre Alexa647 y Alexa555.

25 (8) Selección del clon candidato

Basándose en el resultado descrito anteriormente, como un criterio en la selección del candidato como una secuencia de consenso, la mancha que se hibridaba con no menos de 7 cepas de *M. intracellulare*, pero que no se hibridaba con *M. avium*, se seleccionó entre las manchas de la micromatriz del genoma obtenido a partir de *M. intracellulare*. Como resultado, se seleccionaron 15 manchas (clones candidatos).

30 (9) Determinación de la secuencia de nucleótidos del clon candidato

Posteriormente, para los 15 clones candidatos seleccionados en el apartado (8) descrito anteriormente, se realizó un análisis de la secuencia mediante el siguiente método, y se determinó la secuencia de nucleótidos de cada clon.

A saber, usando el kit Big Dye Terminator (producido por Applied Biosystems Inc.), se realizó el análisis de la secuencia mediante el siguiente procedimiento de acuerdo con el protocolo del producto.

- 35 ADN candidato primario (el clon candidato primario); 2  $\mu$ L (100 ng)  
M13 Primer M1; 1  $\mu$ L (5 pmol)  
Premezcla; 8  $\mu$ L

A la mezcla anterior, se añadió agua desionizada estéril para proporcionar un volumen total de 20 µL y luego se llevaron a cabo 30 ciclos de reacciones de secuenciación con las siguientes condiciones de reacción, utilizando un ciclador térmico de ADN (DNA Engine PTC200; producido por MJ Research Inc.).

96°C durante 2 min → (96°C durante 10 s → 50°C durante 5 s → 60°C durante 4 min) x 25 → 4°C

5 Los productos obtenidos de la PCR se purificaron usando una columna de filtración en gel producida por QIAGEN GmbH, y luego, utilizando un secuenciador (Base Station; producida por MJ Research Inc.) se llevó a cabo un cartografiado (secuencia de nucleótidos) para todas las secuencias candidatas, de acuerdo con el manual de funcionamiento adjunto al instrumento.

10 Los resultados obtenidos se buscaron en la base de datos (NCBI BLAST y CHEMICAL ABSTRACTS), y se esperaba que la secuencia de nucleótidos de los 15 clones candidatos primarios fueran nuevas secuencias no registradas en la base de datos. Esto puede estar atribuido supuestamente al hecho de que *M. intracellulare* es una especie con una secuencia del genoma sin descifrar.

15 El nombre de la secuencia candidata de cada clon candidato determinado, el número de ID del clon y el n° de SEQ ID de la secuencia de nucleótidos se muestran colectivamente en la siguiente Tabla 6. Además, un "Clon ID NO" es el número de ID del clon otorgado por los presentes inventores.

[Tabla 6]

Clon candidato		
Nombre	Clon ID NO	SEQ ID NO
Clon candidato A	R02_5h	1
Clon candidato B	R03_7d	2
Clon candidato C	R08_8d	3
Clon candidato D	R23_8h	4
Clon candidato E	R08_9f	5
Clon candidato F	R21_11g	6
Clon candidato G	R23_1h	7
Clon candidato H	R23_4h	8
Clon candidato I	R27_10g	9
Clon candidato J	R27_4g	10
Clon candidato K	R28_2h	11
Clon candidato L	R01_3e	12
Clon candidato M	R03_5d	13
Clon candidato N	R23_12b	14
Clon candidato O	R24_8b	15

Ejemplo 2: Evaluación de la conservación-1 entre las cepas en el caso de la secuencia candidata A en *M. intracellulare*.

20 (1) Síntesis del cebador de la presente invención

Entre los clones candidatos enumerados en la Tabla 6 que se determinaron en el apartado (9) del Ejemplo 1, basándose en el resultado del análisis de la secuencia (secuencia de nucleótidos) del clon candidato A (Clon ID NO: R02\_5h), y de la secuencia del candidato A (SEQ ID NO: 1), la secuencia de nucleótidos que se utilizará para la PCR, a saber, "5'-CGTGGTGTAGTAGTCAGCCAGA-3" (SEQ ID NO: 16; en lo sucesivo denominada "Mint 02\_T7pa Fw1") y "5'-AAAAACGGATCAGAAGGAGAC-3" (SEQ ID NO: 17; en lo sucesivo denominada "Mint 02\_T7pa Rv1") se diseñaron utilizando la herramienta Web tool Primer3 para el diseño de cebadores (producida por Whitehead Institute for Biomedical Research).

30 A continuación, utilizando el sintetizador de ADN ABI 392 producido por ABI, se sintetizó el oligonucleótido con una secuencia de nucleótidos diseñada, mediante el método de la fosforamidita. El procedimiento de síntesis se ajustaba con el manual suministrado por ABI. La desprotección de diversos oligonucleótidos se realizó calentando la solución

de amoníaco acuosa del oligonucleótido a 55°C durante una noche.

Posteriormente, mediante la realización de una cromatografía en columna de intercambio aniónico empleando Pharmacia FPLC, se purificó el oligonucleótido sintético.

Este oligonucleótido sintético se utilizó como cebador de la presente invención.

5 (2) Preparación de la muestra de ADN obtenida a partir de *M. intracellulare*.

De acuerdo con el método de preparación descrito en el apartado (1) del Ejemplo 1, cepas de *M. intracellulare* (diez cepas) enumeradas en la Tabla 5 descrita anteriormente, se procesaron y el ADN respectivo se extrajo y se purificó. El ADN purificado respectivo obtenido se ajustó para proporcionar una concentración final de 1 ng/μL (en solución tampón de Tris-HCl 10 mM, pH 8,9), y se utilizó como una muestra de ADN obtenida a partir de cepas respectivas de *M. intracellulare*.

Por otra parte, el ADN genómico se extrajo y se purificó a partir de *M. avium* (IID585) por el procedimiento de rutina, y se ajustó de igual forma para proporcionar una concentración final de 1 ng/μL (solución tampón de Tris-HCl 10 mM, pH 8,9), y se utilizó como una muestra de ADN obtenida a partir de *M. avium*.

(3) PCR en tiempo real

15 (i) Preparación de la solución de la reacción para la PCR

Se preparó una solución tampón de Tris-HCl 10 mM (pH 8,9) que contenía 300 nM de cada cebador Mint 02\_T7pa Fw1 y Mint T7pa 02\_Rv1 sintetizados en el apartado (1) anterior, una dilución de 30000 veces de la solución de reserva como una concentración final de SYBR® Green I (nombre del producto de Molecular Probe Inc.), MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, KCl 80 mM, 500 μg/ml de BSA, 0,1% de colato de sodio, 0,1% de Triton X-100, 0,2 mM de cada dATP, dCTP, dGTP y dTTP, y 40 U/ml de ADN polimerasa Taq (producida por Nippon gene Co., Ltd.), y se utilizó como una solución de reacción para la PCR.

(ii) PCR en tiempo real

Empleando cada muestra de ADN obtenida a partir de cepas de *M. intracellulare* preparadas en el apartado (2) descrito anteriormente como ADN molde para amplificar como diana en la PCR, se realizó la PCR en tiempo real por el método de intercalado, y se llevó a cabo un seguimiento cuantitativo de la fluorescencia.

En primer lugar, a 20 μL de la solución de reacción para la PCR preparada en el en el apartado (i) de (3) descrito anteriormente, se añadió 1 μL (1 ng) de la muestra de ADN preparada en el en el apartado (2) descrito anteriormente y se utilizó como muestra para la PCR.

Esta muestra para la PCR se colocó en cada pocillo de una placa de reacción de 96 pocillos (MicroAmp Optical 96-well Reaction Plate; producida por Applied Biosystems Japan Ltd.), y la PCR en tiempo real se realizó utilizando un ciclador térmico/detector especializado para la PCR TaqMan® (ABI 7500; producido por Applied Biosystems Japan Ltd.).

A saber, después de mantener la temperatura a 95°C durante 10 minutos, un ciclo de reacción compuesto por calentamiento a 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 minuto, se repitió durante 40 ciclos, y se midió la intensidad de la fluorescencia obtenida a partir de SYBR® Green I que se había intercalado en correlación con la cantidad de producto de extensión del cebador amplificado.

Además, en la PCR en tiempo real descrita anteriormente usando el cebador directo Mint 02\_T7pa Fw1 y el cebador inverso Mint 02\_T7pa Rv1, si la secuencia de nucleótidos del clon candidato A está presente en el ADN genómico de cada cepa de *M. intracellulare* utilizada como molde, se anticipa que el fragmento de la secuencia (116 bases) mostrado en SEQ ID NO: 92 se replicará y se detectará la fluorescencia.

(4) Análisis de la curva de fusión

Basándose en el resultado de la medición obtenida por la PCR usando una muestra de ADN obtenida a partir de las cepas respectivas de *M. intracellulare* como molde, se generó la curva de fusión mediante el trazado de un gráfico de la temperatura de fusión del producto de extensión del cebador (ADN de cadena doble) como eje horizontal y la primera derivación (variación) de la intensidad de la fluorescencia como eje vertical, y después se llevó a cabo la detección del pico.

(5) Resultados

Los resultados del análisis de la curva de fusión obtenida usando cada muestra de ADN obtenida a partir de las cepas respectivas de *M. intracellulare* se muestran colectivamente en la Fig. 1.

50 Como se desprende de los resultados mostrados en la Fig. 1, como resultado del análisis de la curva de fusión del

5 ácido nucleico que se había amplificado en presencia de SYBR Green I mediante la realización de la PCR en tiempo real usando el cebador Mint 02\_T7pa Fw1 y el cebador Mint 02\_T7pa Rv1 de la presente invención, y empleando las respectivas muestras de ADN obtenidas a partir de 10 tipos de cepas de *M. intracellulare* como molde, en cada caso, se identificó la señal de la fluorescencia generada como resultado de la amplificación del ácido nucleico (Fig. 1: *M. intracellulare*), y todos los casos se determinaron como positivos para *M. intracellulare*. Además, todos los picos obtenidos de la señal eran picos únicos. Además, las posiciones de los picos estaban casi solapadas.

10 Por otro lado, la PCR en tiempo real se llevó a cabo mediante los mismos procedimientos que se han descrito en los apartados anteriores (1) a (4), utilizando v la muestra de ADN obtenida a partir de *M. avium* que es del género *Mycobacterium* distinta de *M. intracellulare*, y usando los mismos cebadores en las mismas condiciones. En ese caso, la señal fluorescente generada como resultado de la amplificación del ácido nucleico no se pudo identificar (Fig. 1, *M. avium*), y este caso se determinó como negativo para *M. intracellulare*.

15 A partir de los resultados descritos anteriormente, cuando la PCR se lleva a cabo usando el cebador Mint 02\_T7pa Fw1 y el cebador Mint 02\_T7pa Rv1 de la presente invención, y si existe cualquiera de los 10 tipos de cepas de *M. intracellulare* descritos anteriormente, la detección de la cepa es posible, y por otra parte, parece que se puede realizar una detección específica de una especie de *M. intracellulare*. Y a partir de este resultado, se sugirió también que la secuencia candidata A utilizada como diana tiene una alta posibilidad de ser una secuencia de consenso de *M. intracellulare*.

Ejemplo 3: Evaluación de la conservación-2 entre las cepas en el caso de la secuencia de nucleótidos de otros clones candidatos entre *M. intracellulare*.

20 Basándose en el resultado del análisis de cada secuencia (secuencia de nucleótidos) de los clones candidatos A a O que se habían determinado en el apartado (9) del Ejemplo 1 y que figuran en la Tabla 6, y a partir de la secuencia de nucleótidos de cada clon candidato, se diseñó la secuencia del cebador para la detección de la amplificación por PCR, respectivamente, utilizando la herramienta de Web tool Primer3 para el diseño de cebadores (producida por Whitehead Institute for Biomedical Research).

25 El nombre de cada secuencia candidata, el SEQ ID NO de la secuencia de nucleótidos del clon candidato, el nombre del cebador diseñado basándose en la secuencia de nucleótidos del clon candidato (nombrado por el presente inventor) y el SEQ ID NO de la secuencia de nucleótidos y, además, la combinación del cebador directo y el cebador inverso que se iban a utilizar para realizar la siguiente PCR, se muestran colectivamente en la Tabla 7.

Clon candidato		Cebador diseñado				
Nombre	SEQ ID NO	Nº de combinación	Cebador directo		Cebador inverso	
			Nombre	SEQ ID NO	Nombre	SEQ ID NO
Clon candidato A	1	1	Mint 02_T7pa Fw1	16	Mint 02_T7pa Rv1	17
		2	Mint 02_T3pa Fw1	18	Mint 02_T3pa Rv1	19
		3	Mint 02_con Fw1	20	Mint 02_con Rv1	21
		4	Mint 02_con Fw2	22	Mint 02_con Rv2	23
Clon candidato B	2	5	Mint 04_con Fw1	24	Mint 04_con Rv1	25
		6	Mint 04_T3pa Fw1	26	Mint 04_T3pa Rv1	27
Clon candidato C	3	7	Mint 06_T3pa Fw1	28	Mint 06_T3pa Rv1	29
		8	Mint 06_con Fw1	30	Mint 06_con Rv1	31
		9	Mint 06_con Fw3	32	Mint 06_con Rv3	33
Clon candidato D	4	10	Mint 17_T3pa Fw1	34	Mint 17_T3pa Rv1	35
Clon candidato E	5	11	Mint 07_FWpa Fw1	36	Mint 07_FWpaRv1	37
		12	Mint 07_con Fw1	38	Mint 07_con Rv1	39
Clon candidato F	6	13	Mint 10_FWpa Fw1	40	Mint 10_FWpa Rv1	41
		14	Mint 10_con Fw2	42	Mint 10_con Rv2	43
		15	Mint 10_RVpa Fw1	44	Mint 10_RVpa Rv1	45
		16	Mint 10_con Fw1	46	Mint 10_con Rv1	47

Clon candidato		Cebador diseñado				
Nombre	SEQ ID NO	N° de combinación	Cebador directo		Cebador inverso	
			Nombre	SEQ ID NO	Nombre	SEQ ID NO
Clon candidato G	7	17	Mint 14_T3pa Fw1	48	Mint 14_T3pa Rv1	49
		18	Mint 14_FWpa Fw1	50	Mint 14_FWpa Rv1	51
		19	Mint 14_con Fw1	52	Mint 14_con Rv1	53
Clon candidato H	8	20	Mint 15_RVpa Fw1	54	Mint 15_RVpa Rv1	55
		21	Mint 15_con Fw1	56	Mint 15_con Rv1	57
Clon candidato I	9	22	Mint 19_T3pa Fw1	58	Mint 19_T3pa Rv1	59
		23	Mint 19_FWpa Fw1	60	Mint 19_FWpa Rv1	61
		24	Mint 19_con Fw1	62	Mint 19_con Rv1	63
Clon candidato J	10	25	Mint 21_FWpa Fw1	64	Mint21_FWpaRv1	65
		26	Mint 21_T3pa Fw1	66	Mint 21_T3pa Rv1	67
		27	Mint 21_con Fw1	68	Mint 21_con Rv1	69
Clon candidato K	11	28	Mint 23_con Fw1	70	Mint 23_con Rv1	71
		29	Mint 23_FWpa Fw1	72	Mint 23_FWpa Rv1	73
Clon candidato L	12	30	Mint 01con Fw1	74	Mint 01con Rv1	75
		31	Mint 01_T7pa Fw1	76	Mint 01_T7pa Rv1	77
Clon candidato M	13	32	Mint 03_con Fw1	78	Mint 03_con Rv1	79
		33	Mint 03_con Fw2	80	Mint 03_con Rv2	81
Clon candidato N	14	34	Mint 12_FWpa Fw1	82	Mint 12_FWpa Rv1	83
		35	Mint 12_RVpa Fw1	84	Mint 12_RVpa Rv1	85
		36	Mint 12_con Fw1	86	Mint 12_con Rv1	87
Clon candidato O	15	37	Mint 18con Fw1	88	Mint 18con Rv1	89
		38	Mint 18con Fw2	90	Mint 18con Rv2	91

Posteriormente, se sintetizó un oligonucleótido de cada secuencia de nucleótidos diseñada y se purificó mediante el mismo método que en el apartado (1) del Ejemplo 2. Empleando este oligonucleótido sintético como cebador de la presente invención, y con la combinación de un cebador directo y un cebador inverso como se describe en la Tabla 7, se realizó la preparación de la muestra de ADN, la PCR en tiempo real y el análisis de la curva de fusión por el mismo método que el que se ha descrito en los apartados (2) a (4) del Ejemplo 2.

Como resultado, en la PCR en tiempo real llevada a cabo utilizando cualquier combinación de los cebadores, se obtuvieron curvas de fusión similares a las de la Fig. 1 del Ejemplo 2. A saber, utilizando las combinaciones de cebadores descritas en la Tabla 7, la PCR en tiempo real se realizó utilizando cada muestra de ADN obtenida a partir de 10 tipos de cepas de *M. intracellulare* enumeradas en la Tabla 5 como molde, y se realizó el análisis de la curva de fusión del ácido nucleico que se había amplificado en presencia de SYBR Green I. Como resultado, en cualquier caso, se identificó la señal de la fluorescencia generada como resultado de amplificación del ácido nucleico, y se determinó que era positiva para *M. intracellulare*. Además, todos los picos de la señal obtenidos eran un pico único. Además, las posiciones de los picos estaban casi solapadas.

Además, del mismo modo que en el Ejemplo 2, usando como molde la muestra de ADN obtenida a partir de *M. avium* que es un género de *Mycobacterium* distinto de *M. intracellulare*, la PCR en tiempo real se llevó a cabo usando los mismos cebadores. En ese caso, la señal fluorescente generada como resultado de la amplificación del ácido nucleico no se pudo identificar, y todas se determinaron negativas para *M. intracellulare*.

A partir de los resultados descritos anteriormente, cuando la PCR se lleva a cabo usando el cebador de la presente invención como se describe en la Tabla 7, y si cualquiera de los 10 tipos descritos anteriormente de cepas de *M. intracellulare* está presente, es posible detectar la cepa; por otra parte, parece que se puede realizar una detección específica de la especie de *M. intracellulare*. Y a partir de este resultado, se sugirió también que todas las secuencias candidatas de A a O empleadas como diana tienen una alta posibilidad de ser una secuencia de

consenso de *M. intracellulare*.

Ejemplo 4: Evaluación de la especificidad del clon candidato A para *M. intracellulare*.

(1) Síntesis del cebador de la presente invención

5 El mismo cebador Mint 02\_T7pa Fw1 y el mismo cebador Mint 02\_T7pa Rv1 que los utilizados en el apartado (1) descrito anteriormente del Ejemplo 2, se sintetizaron por el mismo método, utilizando el mismo instrumento que el utilizado en el apartado (1) del Ejemplo 2.

Estos se usaron como cebador de la presente invención.

(2) Preparación de una muestra de ADN obtenida a partir de cada bacteria

10 Las muestras de ADN obtenidas a partir de cada cepa del género *Mycobacterium* y de *Escherichia coli* mostradas a continuación, se prepararon por los métodos siguientes, respectivamente.

a: *Escherichia coli* (*E. coli*) (ATCC11775)

b: *Mycobacterium tuberculosis* (TMC102 [H37Rv])

c: *Mycobacterium kansasii* (ATCC12478)

d: *Mycobacterium marinum* (ATCC927)

15 e: *Mycobacterium simiae* (ATCC25275)

f: *Mycobacterium scrofulaceum* (ATCC19981)

g: *Mycobacterium gordonae* (ATCC14470)

h: *Mycobacterium szulgai* (ATCC35799)

i: *M. avium* (IIID 585)

20 j: *M. intracellulare* (ATCC13950)

k: *Mycobacterium gastris* (ATCC15754)

l: *Mycobacterium xenopi* (ATCC19250)

m: *Mycobacterium nonchromogenicum* (ATCC19530)

n: *Mycobacterium terrae* (ATCC15755)

25 o: *Mycobacterium triviale* (ATCC23292)

p: *Mycobacterium fortuitum* (ATCC6841)

q: *Mycobacterium chelonae* (ATCC35752)

r: *Mycobacterium abscessus* (ATCC19977)

s: *Mycobacterium peregrinum* (ATCC14467)

30 En primer lugar, en cuanto a *Mycobacterium tuberculosis*, se obtuvo un ADN genómico purificado procedente de Mycos Research, LLC, y se utilizó como ADN purificado.

35 En cuanto a *M. avium*, la cepa de referencia (IIID 585) se obtuvo del Instituto de Ciencias Médicas, Universidad de Tokio; y en cuanto a las otras bacterias, las cepas se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC). Y el ADN de las mismas se extrajo y se purificó por el método siguiente. Las bacterias usadas eran todas una cepa de referencia, y sus especies bacterianas ya se habían diferenciado por la morfología de las colonias y diversos exámenes bioquímicos convencionales, etc. para la bacteria cultivada.

40 A saber, en cuanto a las bacterias del género *Mycobacterium*, en primer lugar, se recogieron las colonias que crecían en medio de Ogawa y se suspendieron en agua purificada, y después se trataron en un autoclave (a 120°C a 2 atmósferas durante 20 minutos). Posteriormente, las células microbianas fueron sometidas a un tratamiento de ruptura (fractura física usando de perlas de vidrio de 2 mm de diámetro), seguido de centrifugación, y se obtuvo la solución sobrenadante. A partir de la solución sobrenadante obtenida, se llevó a cabo la extracción y la purificación del ADN utilizando un kit de extracción y purificación de ADN de tipo resina de extracción de intercambio iónico, Genomic-tip producido por QUIAGEN GmbH.

Además, en cuanto a *E. coli*, de acuerdo con el procedimiento de rutina del método de extracción de ADN de *E. coli*, se llevaron a cabo la extracción y la purificación del ADN.

Cada uno de los ADN purificados obtenidos se ajustó para proporcionar una concentración final de 1 ng/μL (en tampón Tris-HCl 10 mM, pH 8,9), y se utilizó como una muestra de ADN obtenida a partir de las respectivas bacterias.

(3) PCR en tiempo real

La PCR en tiempo real se llevó a cabo mediante el mismo procedimiento que el descrito en el apartado (3) del Ejemplo 2, excepto para el uso como molde del ADN obtenido a partir de cada bacteria preparada en el en el apartado (2) descrito anteriormente.

(4) Análisis de la curva de fusión

Mediante los mismos procedimientos que se han descrito en el apartado (4) del Ejemplo 2, y basándose en el resultado de la medición obtenida por la PCR usando como molde una muestra de ADN obtenida a partir de las bacterias respectivas, la curva de fusión se representó gráficamente mediante el trazado de la temperatura de fusión del producto de extensión del cebador (ADN de cadena doble) como eje horizontal y la primera derivación (variación) de la intensidad de la fluorescencia como eje vertical, y luego se llevó a cabo la detección del pico.

(5) Resultados

Los resultados del análisis de la curva de fusión obtenida usando cada muestra de ADN obtenida a partir de las bacterias respectivas, se resumen en un gráfico, y se muestran en la Fig. 2.

Como se desprende de los resultados mostrados en la Fig. 2, como resultado del análisis de la curva de fusión del ácido nucleico que se había amplificado en presencia de SYBR Green I mediante la PCR en tiempo real usando el cebador Mint 02\_T7pa Fw1 y el cebador Mint 02\_T7pa Rv1 de la presente invención, solo cuando la PCR en tiempo real se llevaba a cabo usando como molde la muestra de ADN obtenida a partir de *M. intracellulare*, se podían identificar las señales de la fluorescencia generadas como resultado de una amplificación del ácido nucleico (Fig. 2: *M. intracellulare*), y se podían determinar como positivas para *M. intracellulare*.

Por otra parte, como se desprende de la Fig. 2, cuando la PCR en tiempo real se llevaba a cabo de la misma manera, utilizando la muestra de ADN obtenida a partir de bacterias de un género de *Mycobacterium* distinto de *M. intracellulare* y la muestra de ADN obtenida a partir de una bacteria de otro género de *E. coli* como molde y empleando una combinación de los mismos cebadores, la señal fluorescente correspondiente no se pudo detectar (Fig. 2: otras especies), y se pudo determinar que toda la muestra era negativa para *M. intracellulare*.

Además, como se desprende de la Fig. 2, partiendo del hecho de que se obtenía un único pico claro como resultado del análisis de la curva de fusión cuando se utilizaba como molde la muestra de ADN obtenida a partir de *M. intracellulare*, se considera que el método de detección llevado a cabo es un método que tiene una especificidad sumamente alta para *M. intracellulare*.

De los resultados anteriores se desprende que al utilizar el oligonucleótido de la presente invención como cebador para la PCR, *M. intracellulare* se puede detectar específicamente. Además, ya que se puede esperar que la detección mediante una amplificación del ácido nucleico, tal como PCR, proporcione una alta sensibilidad, el aislamiento de la bacteria no es necesario, y el espécimen clínico se puede utilizar directamente para la detección. Por lo tanto, la detección de *M. intracellulare* puede estar lista al cabo de un día como máximo, mientras que con el método convencional en el que se requiere un cultivo bacteriano antes de realizar la detección, se prolonga varias semanas.

Ejemplo 5: Evaluación de la especificidad-2 de los otros clones candidatos para *M. intracellulare*.

(1) Síntesis del cebador de la presente invención

Usando el mismo instrumento que se ha utilizado en el apartado (1) del Ejemplo 2 y con el mismo método, se sintetizaron y se purificaron los oligonucleótidos mencionados en la Tabla 7 descrita anteriormente, excepto para el cebador Mint 02\_T7pa Fw1 y el cebador Mint 02\_T7pa Rv1.

Estos oligonucleótidos sintéticos se utilizaron como cebador de la presente invención.

(2) Preparación de las muestras de ADN obtenidas a partir de cada bacteria

Las muestras de ADN obtenidas a partir de cada bacteria se prepararon usando las mismas bacterias que se habían utilizado en el Ejemplo 4, con los mismos procedimientos que los utilizados en el apartado (2) del Ejemplo 4.

(3) PCR en tiempo real

Empleando los cebadores que se habían diseñado y sintetizado en el apartado (1) descrito anteriormente y en la combinación descrita en la tabla 7 anterior, la PCR en tiempo real se llevó a cabo mediante el mismo procedimiento que el descrito en el apartado (3) del Ejemplo 2, excepto para el uso como molde de la muestra de ADN obtenida a partir de cada bacteria preparada en el apartado (2) descrito anteriormente.

#### 5 (4) Análisis de la curva de fusión

Mediante los mismos procedimientos que se han descrito en el apartado (4) del Ejemplo 2, y basándose en el resultado de la medición obtenida por la PCR usando como molde una muestra de ADN obtenida a partir de las bacterias respectivas, la curva de fusión se representó con el trazado de un gráfico de la temperatura de fusión del producto de extensión del cebador (ADN de cadena doble) como eje horizontal y la primera derivación (variación) de la intensidad de la fluorescencia como eje vertical, y luego se llevó a cabo la detección del pico.

#### 10 (5) Resultados

Como un resultado similar al del Ejemplo 4, cuando el análisis de la curva de fusión del ácido nucleico amplificado con la PCR en tiempo real en presencia de SYBR Green I, usando el cebador de la presente invención, mencionado en la Tabla 7 descrita anteriormente, en cualquier caso en el que se empleaba cualquiera de las combinaciones de cebadores descritos en la Tabla 7, la señal fluorescente generada como resultado de la amplificación del ácido nucleico se podía identificar solo cuando la PCR en tiempo real se llevaba a cabo usando como molde la muestra de ADN obtenida a partir de *M. intracellulare*, y se podía determinar que era positiva para *M. intracellulare*.

Por otra parte, cuando la PCR en tiempo real se llevaba a cabo de la misma manera utilizando como molde la muestra de ADN obtenida a partir de bacterias de un género de *Mycobacterium* distinto de *M. intracellulare* y la muestra de ADN obtenida a partir de una bacteria de otro género de *E. coli*, y empleando cualquier combinación de los mismos cebadores descritos en la Tabla 7, la señal fluorescente correspondiente no se pudo detectar, y se pudo determinar que todas las muestras eran negativas para *M. intracellulare*.

Además, se obtenía un único pico claro como resultado del análisis de la curva de fusión cuando se utilizaba como molde la muestra de ADN obtenida a partir de *M. intracellulare*, como el resultado similar del Ejemplo 4, se considera que el método de detección llevado a cabo es un método que tiene una especificidad sumamente alta para *M. intracellulare*.

De los resultados anteriores se desprende que al utilizar el oligonucleótido de la presente invención como cebador para la PCR, *M. intracellulare* se puede detectar específicamente. Además, ya que se puede esperar que la detección mediante una amplificación del ácido nucleico, tal como PCR, proporcione una alta sensibilidad, el aislamiento de la bacteria no es necesario, y el espécimen clínico se puede utilizar directamente para la detección. Por lo tanto, la detección de *M. intracellulare* puede estar lista al cabo de un día como máximo, mientras que con el método convencional en el que se requiere un cultivo bacteriano antes de realizar la detección, se prolonga varias semanas.

#### Ejemplo 6: Prueba de sensibilidad de la detección mínima

35 A través del uso del método de detección en tiempo real, se llevó a cabo una verificación de la sensibilidad de la detección en el momento de determinar el objetivo de la secuencia de nucleótidos del clon candidato J (Clon ID NO: R27\_4g).

#### (1) Síntesis del cebador de la presente invención

40 Entre los clones candidatos enumerados en la Tabla 6, determinados en el apartado (9) del Ejemplo 1, basándose en el resultado del análisis de la secuencia (secuencia de nucleótidos) del clon candidato J (Clon ID NO: R27\_4g), y de la secuencia candidata J (SEQ ID NO: 10), la secuencia de nucleótidos que se iba a utilizar para la PCR, a saber, "5'-CAGCGACCGTGTGTTCTTAC-3" (SEQ ID NO: 64; en lo sucesivo denominada "Mint 21\_FWpa Fw1") y "5'-GGAAGTGGGCGGTATCCT-3" (SEQ ID NO: 65; en lo sucesivo denominada "Mint 21\_FWpa Rv1") se diseñaron utilizando la herramienta Web tool Primer3 para el diseño de cebadores (producida por Whitehead Institute for Biomedical Research).

A continuación, utilizando el sintetizador de ADN ABI 392 producido por ABI, se sintetizó el oligonucleótido con una secuencia de nucleótidos diseñada mediante el método de la fosforamidita. El procedimiento de síntesis estaba de acuerdo con el manual suministrado por ABI. La desprotección de diversos oligonucleótidos se llevó a cabo calentando la solución de amoníaco acuoso del oligonucleótido a 55°C durante una noche.

50 Posteriormente, mediante la realización de una cromatografía en columna de intercambio aniónico empleando Pharmacia FPLC, se purificó el oligonucleótido sintético. Este oligonucleótido sintético se utilizó como cebador de la presente invención.

#### (2) Preparación de la muestra de ADN para la PCR

De acuerdo con el método de preparación descrito en el apartado (1) del Ejemplo 1, se preparó el ADN genómico purificado obtenido a partir de *M. intracellulare* se obtuvo a partir de *M. intracellulare* JCM6384, la muestra de ADN obtenida a partir de *M. intracellulare*.

5 Mediante la medición de la absorbancia de la muestra de ADN preparada, obtenida a partir de *M. intracellulare*, se determinó la cantidad de ADN en la muestra. La cantidad de ADN genómico (número de copias del genoma) en la muestra se determinó comparando la cantidad de ADN obtenida con el valor de la medición obtenida midiendo la absorbancia con el mismo procedimiento, utilizando como muestra el ADN genómico de *M. intracellulare* JCM6384 de concentración conocida. Se obtuvieron  $10^8$  copias/ $\mu$ L de ADN genómico.

10 Posteriormente, la muestra de ADN se diluyó usando un tampón Tris-HCl 10 mM, pH 8,9 en una serie de diluciones con  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ , 10 y 5 copias/ $\mu$ L, y se utilizó como muestra de ADN para la PCR.

### (3) PCR en tiempo real

#### (i) Preparación de la solución de reacción para la PCR

15 Se preparó una solución de tampón Tris-HCl 10 mM (pH 8,9) que contenía 300 nM de cada cebador Mint 02\_T7pa Fw1 y Mint T7pa 02\_Rv1 sintetizados en el apartado (1) anterior, una dilución de 30000 veces de la solución de reserva como una concentración final de SYBR<sup>®</sup> Green I (nombre del producto de Molecular Probe Inc.), MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, KCl 80 mM, 500  $\mu$ g/mL de BSA, 0,1% de colato de sodio, 0,1% de Triton X-100, 0,2 mM de cada dATP, dCTP, dGTP y dTTP, y 40 U/ml de ADN polimerasa Taq (producida por Nippon gene Co., Ltd.), y se utilizó como una solución de reacción para la PCR.

#### (ii) PCR en tiempo real

20 A 20  $\mu$ L de la solución de reacción para la PCR preparada en el en el apartado (i) de (3) descrito anteriormente, se añadió 1  $\mu$ L de la muestra de ADN para PCR preparada en el en el apartado (2) descrito anteriormente y se utilizó como una muestra para la PCR.

25 Esta muestra para la PCR se colocó en cada pocillo de una placa de reacción de 96 pocillos (MicroAmp Optical 96-well Reaction Plate; producida por Applied Biosystems Japan Ltd.), y la PCR en tiempo real se realizó utilizando un ciclador térmico/detector especializado para la PCR TaqMan<sup>®</sup> (ABI 7500; producido por Applied Biosystems Japan Ltd.).

30 A saber, después de mantener la temperatura a 95°C durante 10 minutos, un ciclo de reacción compuesto por calentamiento a 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 minuto, se repitió durante 40 ciclos, y se midió la intensidad de la fluorescencia obtenida a partir de SYBR<sup>®</sup> Green I que se había intercalado, en correlación con la cantidad de producto de extensión del cebador amplificado.

Hay que señalar que, la intensidad de la fluorescencia se midió utilizando una función del termociclador utilizado para la medición, para digitalizar la relación de la intensidad de la fluorescencia relativa, para cada una de las placas de reacción de 96 pocillos utilizadas para la medición.

### (4) Resultados

35 A partir de los datos experimentales obtenidos, de acuerdo con el procedimiento de rutina comúnmente realizado en el método de la PCR en tiempo real, para cada concentración de una muestra de ADN para PCR, se generó una curva de amplificación mediante el trazado de un gráfico de la intensidad de la fluorescencia obtenida a partir de SYBR<sup>®</sup> Green I (Rn, eje y) para cada número de ciclo de la PCR (eje x). La curva de amplificación obtenida se muestra en la Fig. 3.

40 Posteriormente, a partir de la curva de amplificación obtenida, se generó una curva estándar por el método siguiente.

45 A saber, se seleccionó una parte de Rn en donde la intensidad de la fluorescencia amplificada exponencialmente en la curva de amplificación obtenida (Fig. 3), y se trazó una línea umbral (Th). El punto de cruce de la Th con la intensidad de la fluorescencia de cada muestra de ADN para la PCR se define como ciclo valor umbral (Ct). Después de lo cual, se trazó en un gráfico el valor de Ct (eje y) para el número de copias del genoma de cada muestra de ADN utilizada para la PCR (eje x, valor logarítmico), y la curva aproximada obtenida para cada Ct, se usó como una curva estándar. La curva estándar obtenida se muestra en la Fig. 4.

$$y = -3,356x + 35,57$$

$$R^2 = 0,999$$

50 En consecuencia, partiendo del hecho de que la fluorescencia se detectaba con la PCR en tiempo real, resulta que *M. intracellulare* se puede detectar llevando a cabo la PCR en tiempo real utilizando el oligonucleótido de la presente invención como cebador.

Además, también se desprende que como la curva estándar está a disposición, la determinación cuantitativa de *M. intracellulare* es posible con la PCR en tiempo real usando el cebador y la sonda de la presente invención. Además, a partir de la Figura 4 se desprende que con el método de la PCR en tiempo real, utilizando el cebador y la sonda de la presente invención, se puede detectar *M. intracellulare* incluso con el requisito de que solamente estén presentes 5 copias del ADN genómico de *M. intracellulare* como cantidad inicial.

Además, la eficacia de la amplificación de la PCR con este método era numéricamente del 98,4%, y por lo tanto, se confirmó una reactividad elevada.

Adicionalmente, cuando el experimento se llevó a cabo de manera similar utilizando la combinación de otros cebadores enumerados en la Tabla 7 descrita anteriormente, se podían obtener resultados casi equivalentes. De los hechos descritos anteriormente, era evidente que la detección y la cuantificación de *M. intracellulare* se pueden llevar a cabo mediante la realización de una PCR en tiempo real dirigiéndola a las secuencias candidatas A a O.

#### **Aplicabilidad industrial**

De acuerdo con el método para la detección de *M. intracellulare* mediante el uso del cebador y/o la sonda de la presente invención, la detección de *M. intracellulare* se puede realizar más rápidamente y con mayor precisión, específicamente en comparación con el método de detección convencional.

Por otra parte, de acuerdo con el método para la detección de *M. intracellulare* usando el cebador de la presente invención, es posible detectar mediante una sola operación el caso en el que exista cualquiera entre una pluralidad de serotipos o cepas de *M. intracellulare*. Además, esto simplifica la operación de detección y se reduce también el tiempo requerido para el diagnóstico; de acuerdo con ello, este método es muy útil, en particular en el campo de los ensayos clínicos en donde se requiere una determinación rápida. Un oligonucleótido que comprende una parte o la totalidad de la secuencia de nucleótidos mostrada en cualquiera de SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 15 (en donde los caracteres de A, C, G y T representan adenina, citosina, guanina y timina, respectivamente; y, T en una posición arbitraria puede ser reemplazada por uracilo (U), y de aquí en adelante, se usarán las mismas abreviaturas), o una parte o la totalidad de la secuencia complementaria a la secuencia de nucleótidos mostrada en cualquiera de SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 15, en donde el oligonucleótido es capaz de hibridarse con una secuencia de nucleótidos del gen de *Mycobacterium intracellulare*.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Wako Pure Chemical Industries, Ltd.
- 5 <120> Procedimiento para determinar Mycobacterium intracellulare
- <130> 142484ep
- <150> EP 09754689.9
- 10 <151>26-05-2009
- <150> JP2008-139105
- <151> 28-05-2008
- 15 <160> 129
- <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- 20 <211> 597
- <212> ADN
- <213> Mycobacterium intracellulare
- <400> 1
- |  |     |
|--|-----|
| cgtagtactt gatcaccgtc tcgggatccg ggatggtgcc ggattgcaga aatttgtgcc  | 60  |
| cagcgaacga catccagatt cgcgataggt caccgtcctt ccacactcgc gctcccacgc  | 120 |
| ccaccaactc atcggaggagc ccggggaaca gtcctccat ggtctgcgtg gcgcgaactt  | 180 |
| ggggaatgtg cggactgggg ccatggggca ctccgcggcg ggccactggg cgttcgggca  | 240 |
| gaacgtctcg ttccaccacg gtcaccgtgg tgtagtagtc agccagaaca cgggcggcca  | 300 |
| tcaggccggc gatgcttccc ccagaaacga ctgcggtttc gccgaattca ggcacactga  | 360 |
| gtctccttct gatccgtttt tgtcggcggg cgacgcgcga ggactaacag ctgattgcga  | 420 |
| aggcggccat catcagcaag accgtggcga ggccgtgcag gacaagttgt cgcaaaacga  | 480 |
| catcccggcc aagcgagtcg tccaattcgg tcgaccgcga ataatccggg atcaciaaagc | 540 |
| gatagcgetc tgagccgaat ctcgttctcg tgcttcgggtg tgtgttcacg cccatcc    | 597 |
- <210> 2
- <211> 573
- <212> ADN
- 30 <213> Mycobacterium intracellulare
- <400> 2
- |  |     |
|--|-----|
| tgggcactct gaacggtagt ggtcatgaac ggagatggtg cctcagatcc tcctcagtga  | 60  |
| gcacggcctc cagcgggctt gattcatcag atgaaccggc cgtagttctg ccgtctggtg  | 120 |
| cataagccca caccagccct gggtcagatt gcaccgcaac atctttgatg tcggcgctta  | 180 |
| accgacttat tccatgaac ctcgcgctgc gtgctctgcy acgagcatga gcggcgcggtt  | 240 |
| ggtattgccg gcagtgggcg caacacctta tcgcacgtcg ccgcttggaac gaccgcgatg | 300 |
| gaggttccac tggccgcagt cggggggccag gacgtcgttg acgtcaactt cgaatccgcc | 360 |

ES 2 650 066 T3

gaccttcggc ccgggattgg acgcggtgct cacgacgcgc tggtaaagaa cagcggcggg 420  
 gtggacctga tcaccggacc aggctcgagt ttgccaggcc caccggcggc caggtgtgct 480  
 cgaagaccgc ataacgccat cggccgcggc cactggcag accctgacac ctccgtagac 540  
 cccagtgcgc tgaaccccaa gaactgagtt gat 573

<210> 3

<211> 677

<212> ADN

<213> Mycobacterium intracellulare

5

<400> 3

cgatacatcc cgtggtacga ggggaatgtg tacgtcttga acgtgctgtt cccattgctc 60  
 gctgtcgcag gtatcggcgc gggcagtgca cccggcaatc ccgcgtggct tcggttcac 120  
 ggaggtatct gcctgtcggc gccgctcggc tcggcgtcgg catcatttat gggagcggcc 180  
 gccgaatddd cggcgcggcg gtcaggcggc cgggcaggc gattgtctgc cgctatcttc 240  
 cgtggtacga gagcaaccca tacatggcga ccttctgtgt ccccctaate gcgatcgcca 300  
 tgattggcgc aggatgtgca cccggtaatc cggcgtggct gtggtacggc ggggccattc 360  
 tgctggccat ctctgcctta ttggtgggag tctccctctg gatctggcgc cgatcccttc 420  
 tccgtatcac ccccgcgggc ttgaccgtgc ggatcgcaga gcgcggcagc gagttgaccg 480  
 acatccggcg tgagcatgtc cgttcgatcg agccaaagct cgtcccagac gtggcggccg 540  
 gtaccgagcg gttgcaagtc gaagtcgcct accagcccgc cgatgtcagc agcgaggcga 600  
 ccgcgacggc gatgctcggc atgtatctga gcgttcaacc gatcaacctg ctcaacgccc 660  
 tcgtggcctg aaagacg 677

10

<210> 4

<211> 926

<212> ADN

<213> Mycobacterium intracellulare

15

<400> 4

tcgaacggac atgctcacgc cggatgtcgg tcaactcact gccgcgctct gcgatccgca 60  
 cggcacaacgc cgcgggggtg atacggagaa gggatcggcg ccagatccag agggagactc 120  
 ccaccaataa ggcagagatg gccagcagaa tggccccgcc gtaccacagc cacgccggat 180  
 taccgggtgc acatcctcgc ccaatcatgg cgatcgcgat tagggggaac agcaaggcgc 240  
 ccatgtatgg gttgctctcg taccacggaa gatagoggca gacaatctcc tgcccggctc 300  
 gcctgacccc ggcgcccgaat attcggcggc cgctccata aatgatgccc acgcccagcc 360  
 cagcggcggc gacaggcaga taccaagccg acccaaccag cacatttatg cccgccaaca 420  
 ggcatagtgc accaccgacg gcgtaacgca gtttcggtac acgacgtttc gctgtattac 480  
 ttgcatcag caacggctcc gtgttcggtt ctccggatag cgcctgggta ccccgccgac 540

ES 2 650 066 T3

gttggatttg tcaccggacc cgatcgagtg gtcagccaga caccgatcc atccatcggg 600  
 gaatcgtgta acgcgggtcac tgtagttg gcgatcagcg tctcccgttc ggccgtgatg 660  
 atcctcgatt gtgacgtgct gtcgatggtg ccgagttcat gcgcatctg gatcgcgagc 720  
 gtccccgcgc taccgggacc ctgcggtgct gcggtgaatt ctcgatgcag ttcacggcat 780  
 ttcggcgccg actgcaactg ctggtcagac agcatggcaa atacttcggg tggatccagc 840  
 gaggcctcga cccgatgcat cgtcaacacc gcgtttgcgc aaaacacgtc gatacatggg 900  
 tcggcacgac aaaccacac acgaac 926

<210> 5  
 <211> 593  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium intracellulare

5

<400> 5  
 tttggccac ttcggggcca agacgggagc gtcaatatgg cgccgatga cgaccacaca 60  
 cactgccggg ggccggcatg ccccgccgct acacacaccg cgctgcgcc tgaaacggaa 120  
 gtcgccccgc agcgggtatg tcgatggagc gtggtggccg catagtgacg acctgacggc 180  
 ggagctgcca gatctgctgg cagtgtctac ggttcggctt ggtcccgtgg gtcgtgtcat 240  
 ctacaacctc accgaatggg caacggcgcc agcaaatg gcgttcggcc cgcagacggg 300  
 acggctcgac ggataccgcc gccagccggt tcacacgctc gaggtgctcg ggctcaatcg 360  
 ccagagaatc accctcctgg tggtttcacc gcacaccgac gaaaacgatg cgcacaccgt 420  
 catgatgacc gcggccggcc cgaacaacgc cttgacggtc gcgaacctca tgatcagcgg 480  
 gcaaaaagtg gacgcccgcg agtagaccat gtcggccaca tcacgcatca gcgccggatt 540  
 cgactgaccc tgtttaacct gacttcacgg tgcattttcg ccgacctgac gcg 593

10

<210> 6  
 <211> 941  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium intracellulare

15

<400> 6  
 cttgccgatg cccgggagca gcgactgcac cgtgcgcggc ttcagcaggt ccgcggagac 60  
 ccgcgcatag taattcgcgt tggcgaccag gtcgacgac tcctcctgtg cggcccatcg 120  
 ggccttgccc gcctcggcct gcaggagatc catcaggaac tcgcggttct cgacgaccag 180  
 gtcgcgatac cgctgatga catcgacgcg ctgctgacc ggacggttcg ccagtcggc 240  
 ctgcgcccg cgccgctcgg cgaaggcggc ttcgacgtct tcggccgtgc cgacggggat 300  
 ggtggtcagc ggcttgccgg tgaagacctc gtcgatcgtc ttggtctggc gtgcgggtggc 360  
 gttcttgatc gcggccaact ggcgcaggcg gtcgaagacc tcggctgacg gtgcgggcat 420

ES 2 650 066 T3

gtcgtcacct ctcaaaaagc gcagggcgtcc aaaacaccag actattggct ctgcatgcc 480  
 gggggctctcc ggtgcccgtg ggcttgtttt gagcggctat caccgagtgg aagacgctga 540  
 tgagtcggaa ggctttgaga actcatgtag cctcgggtat cgaccaaccc acgagccgat 600  
 caggcaggtg ctctcacaca gatgatacgg ccgtccaccg gaccggtagg tcccggacgc 660  
 gtcgccgtgc cgcccaacc cgcgggccgc ttttctagat cgagaagttc gccgcttacc 720  
 tgacctcggc tcgatcctcg ccactcgcgc gtaaccaccc acaagatcgg acgtgacccc 780  
 ttttgccggc gttcgtaaac ccgccctgtc cgcctgcctc cgctcagccc gaatctcact 840  
 gattccatgg cgattaccga agtacctgaa tacgccacc tcagcgtgga cgacgtcgag 900  
 aacctcggc ccgcactgga caccgatcgt tgcgacgtcg a 941

<210> 7  
 <211> 602  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium intracellulare

5

<400> 7  
 ctgaccgcct cagtcgatga agatgggcat gaacacacac cgaagcacga gaacgagatc 60  
 ttggctgttc gccggcgacc acaacgttca tgtgaaagc cggatgttcg cggccccatt 120  
 tgcggcgccc gtcaccaaag tacgtgtggt ggtgatgtcc gctcaggggc atggcgataa 180  
 ggtccgtggt gtcgacggcc ggaccacca attcgtatgc cgatttgttt tcgaaccgcc 240  
 agatcgtgc agtaagaaca ccgccggagc cggatgatgc ttgtccgggc ttgaagccca 300  
 ggcaactcaga aacaacttcg ggcgtgacga atccgggcc agtcatgctt ggacgcctg 360  
 cccagggccc gttgtagcgc cgcgcgccga ccggtcggc tcatccgaga tcacacaaac 420  
 aagtctcgac tcggtgtcgg gccttcagcc accgatgatg ggacacgttt cccacagata 480  
 gcgacatcgt ccggctacgc acgacattcc cgaaatcggc gcgtctctcg tgcacaaggt 540  
 acgcccgcga gacacgccag tgaccacact gtcgcggtag acacgtccgg acgtttcgtt 600  
 tt 602

10

<210> 8  
 <211> 1346  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium intracellulare

15

<400> 8  
 caacttcgaa tccgccgacc ttcggcccgg gattggacgc ggtgctcacg acgcgctggt 60  
 aaagaacagc ggcgggggtg acctgatcac cggaccaggc tcgagtttgc caggcccacc 120  
 ggcggccagg tgtgctcgaa gacccgataa cgcctcggc cgcggcccac tggcagacc 180  
 tgacacctcc gtagacccca gtgcgctgaa cccaagaac tgagttgatt ccgcgaaacc 240  
 acggcagcgc ggtgtgaatc caggtattgc ggtgatgtc ctcgctgatg gtgaagaaaa 300

ES 2 650 066 T3

tcggcgcact ctggccgccc cctgccgcgg tgtgcaaacg ccaggcgggtg cgcgcatccg 360  
 cgacgccgcc cgcgtagccc cgcgtgaagt ctgacgggtgt cgaccacccc ggcttgccgt 420  
 attgtagtt actgacaatc accaaacccg cagctgtcag tgagtcggcg taggaccgag 480  
 tgatgggctt ggcgccgaac gaggagccgg ggctgacaa cgagacgtag ttgaccaccc 540  
 cgctatagcc ggcggcccgg atctgctgog ccggaatctg gtgtgcccga aagtcgatca 600  
 gctgaggggg agcggcggca gtcgctgtog gcatgccgca ggctaccgat gcggcaccca 660  
 gaccggccaa cgtggcggcg tagcgcagcg cgtcgcgccg ggagacagtg cgcaatggca 720  
 catcgggtggc ggcagagggc aaattgcgca cggcgaagg ttaaacaatgt gactgttgtt 780  
 accgatagtg ctgcgccagt cgaaacgcgg ttgcatgccc aatatagatac caagtggatga 840  
 tcgttcggct ataaccacga aaggacatgc gggagaacga cctaccgacg atcgcccgcg 900  
 ctgcccgcctc ggcgatgcgc atggtcggcg cgttgggtgtt gccggaagtg atggtgggca 960  
 tagccgaagc atcggcccgt caacatccat gttggattgg tgcatatccc tcccgcgccg 1020  
 cagcagggag ggtctttagt cacgatggca acttcaccgc ggctcaccct gctcgcgccg 1080  
 cagtgcagga gcacgactgt gctgtggccg ctaaggatcg ttaccgcaat cgtgatctcg 1140  
 cgctcggatga ttggcgtcgc cgcggcccga atcttgacaa tggggtagc ccgacgcagc 1200  
 ttcgcgcctc tacggcgaac ggaacctga gcagcgggtg accatcagcg cgcggactgc 1260  
 cgccaaccct gtgagatcaa cgtccgcctc gctgataccg caaatgccgc atcgatagcc 1320  
 ttgctcggct cgaagggcgt cgtact 1346

<210> 9

<211> 1219

5 <212> ADN

<213> Mycobacterium intracellulare

<400> 9

tgaatacatc tccgtcgcgg acaaagatcg catccggttc gacgctcacc tcggggaaga 60  
 tgccggccaa ccgcccggtg tgccgccagt gcgtggtcgc ccgcttgcca ttgagcaggc 120  
 ccgctcgcgc caggatgaag gaacccgtgc aaacggatgc caagcgcggg gtccggcccg 180  
 ggacggtctt gagtgccttcg atgagagcgg gatcgatcgg ccgcccgatc agtgtgtcac 240  
 cgcccgcgac catgacgggtg tcgacggatt cgagggccga gaggggacac gtcacagcga 300  
 atcgggtgcc gatcgacgtg gtcacatcgc gtccgtctac cgatgcgatt tcgagcgaat 360  
 agcgtgcgcc gaaccgattg gcttcggcga acacctcggc gggaccocga acgtccaaca 420  
 gtttcacgcc gtcgaagacg acgatacca ccacacgagt tgttgcggtg gcctccgcca 480  
 tacgcccata gtgtcgcgcc ggcgacgacg agtacaagcc ggaggggtgc acaacgtgtg 540  
 gatcggcgac atgaacggcg atcacctgag aaacgctgcc ggataagtgg cggcgtgcgc 600

10

ES 2 650 066 T3

gacgctggac tcacactgcg acaaagaaat tcaccggggg cggaacctgg gggctcaagc 660  
 tcttgtcagc gcgtgacatc atcgtgaacg acgcctggcg cccgaacagc atcctttggc 720  
 cagcgggtgg ctgaccacgc gactattctc gacaccgtgg acccgggtgc gccgccacgg 780  
 aatggtggtg gcctgatagc ccggcacgcg gaatgtgttg cgttgaaca gttctcacc 840  
 cgcgtgcgcg ccggtgagag tcgtgttctg gtacttcatg gagagccggg tgtcgtaag 900  
 acggccttgc tggactacgt cgggtgaacg gccgcggct gtgcgcat ccgtgccagc 960  
 ggggtcgagt cggagatgga gctggcctac gccgcggtc accagttgtg cgcggcgatg 1020  
 ctcgatcgtc tcgattatgt gccggtgccg caacgcgacg ctttgagcac ggcatgggt 1080  
 caaacgatag gtccgcacc ggaccgcctt ctctcgggt tggcgggttt gaacatgttc 1140  
 tccagcatgg ctgaggtcga gccctcgtt tgtttggtcg acgatctgca gtggctogac 1200  
 caggcctcgt cgcagacgc 1219

5 <210> 10  
 <211> 1122  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium intracellulare

<400> 10  
 aagagtgcaa gatcaagatt gcggcaacgc tccttaacgg tgcagcaca acctccccgc 60  
 tccaggaaca atggaccatg cgcagcgacc gtcccctcga aatcgcgctc ggcatggcg 120  
 tggccactcg gcgattctga aggcattgaca tcgggactgg cgcgaatac gacggattcg 180  
 aatatgcagt gttaccggga atccggacgg ttccgcgac gcacgtcgcg gttaccggtg 240  
 gtggcctgag gcaagctttg gccatgacat cgactccctc tgatgtggaa ttaatccgcc 300  
 tgaggtgatc gacggctcgg cccgttcgac aggataaggc gatgccgccg tacggattcg 360  
 acattgatga tgagttgcac gatcagttgc gtgtccagt tccaccgggc gtactggcat 420  
 gggttgagcg ccagacaaag tgtcaggtca ttgcgcagcg gccgttgaa ggcggccagt 480  
 ccgcggcgat tcaccgcctt gttctcgtat accgaagcgc tgtgatcctg cagcgattcg 540  
 tcttgattg gatccgcgac gagccgtggg ctccctcga cgaggtactg gtcttaggtc 600  
 ttttgccga tacatcgggt ccagcgcga aggtgattgc cgcgaccgg cacggacagg 660  
 acaccggtg tcccaccgta ttgatgaccg cactgccag cgcgctcgtg tgggaccac 720  
 cagagctgga cccatggttg gacgccgta tcgacgtcat gatgacgatt catgccatac 780  
 gggcgcgca acagttacgc cgggtggagc cttaccgcc ggagaacgcc ccaccggcgt 840  
 ggaccgcta tcggtgggca tgggaacgcg ccgtcaccac gtaccatgat gtgcgccaa 900  
 gcagcgaccg tgtgttctta caccgcgatt ttcacccgg caacatcttg tggcagcaag 960  
 10 gcaaaatata cggacttgct gactgggtct cgtcgtgcgc cggaccgctc caggaggata 1020  
 ccgccactt ccgcgtgaac ctggccatgc accacggaca aggcgtcga gatcgcttc 1080  
 tgcggcgtg gatgcgccg agcggccagt ttgaatacca cc 1122

15 <210> 11  
 <211> 1119

ES 2 650 066 T3

<212> ADN

<213> Mycobacterium intracellulare

<400> 11

gcttctttcg gcaccgacgt gccgcgacca ctgtggcccg gtagcgacga accaatcctg 60  
 ggcaatcggg tgcggcaggt gaatcccgac tgccgatggt gagagccaag gattccattc 120  
 cacatcgcac aaatcgggga gattgcgtga gcacttcaaa caagggcatt ttcgctcgac 180  
 gccacgacga cgcgcgtgga cgccctgtga acgggcatca ggggctgctc ggccaaaccg 240  
 ggttccggat ggtccgaaa gccgacctc caacggattt cagcgtcgtc gaagcccgcg 300  
 tcagatgact tcgacaccaa tgccggcacc cgaggttgcc gcgcgctacg acttcgtgat 360  
 ctgtgggtca ggttcttctg gatcggctgt cgccggctcg ctttcggaga atccggacgt 420  
 tacggtgctt ttgctcgagg ccggtgaaac cgatgatggt tcggcagtcc acgatcccac 480  
 gcagtgggcc ctgaacttgg gtagcgagcg tgactgggtt ttcgtctcgc agccgagcgc 540  
 ccatctcaag ggcagatcgg tgctgtctgc gatggggaag gtgctcggcg gggggtcgag 600  
 catcaacgtg atggtgtggg ctcggggaca tcgaagcgac tgggactact tcgcaacca 660  
 ggcgggtgac gaagcctggg gctatgaatc ggtgcttgac atctaccgtc gcattgagga 720  
 ttggcacggg ccggcagctc ccgcccgcgg caccgggggc cccatgtccg tgacgtcccc 780  
 gcccgacccc aatccgatcg ctccggccat cgtcgaggcc gctcgtcgc tggggatccc 840  
 gagctatccg agcaacaacg gcgccatgat ggaccgcggc ggcggcgcag cgctcttgga 900  
 cgtgacattg cgaaacgggc tgccgcagtc cgtgtatcgc tcctacgttc atccgcacct 960  
 gcaccgcccg aacatgacag tcctcaccgg tcgcacggtg actcggttgg tcgtcggccg 1020  
 aaaccgggct acggcggtcg agttctcgca caacgatcgg acgcaccagg tcgtcgcagc 1080  
 5 acacgaggtg gttgtttcgc ttggggcgat caacacgcc 1119

<210> 12

<211> 395

<212> ADN

10 <213> Mycobacterium intracellulare

<400> 12

cggcggatcc ccttggctgt tgcacgaggc gaacgagaat gccccgctga cgccctocag 60  
 cttcgcggcg gcgacgatct gcttggccgg ctcgatcacc tgcccttgg tctgatcgtc 120  
 gctcatggga tgggcccgtat cctcgtacgg attcgtcgat cccgcggcat gtggtttgtg 180  
 tagcactggc gcgcatacctc ctaacaacac ggcgacgacc actagcgaac tgatcagcgc 240  
 ttggcgcaac ggcatacgtt gttcctcaat ggtggtggtg agcatcgaac acatggttgt 300  
 cggtaataga tcctggcgac cgctcccact ccgggtcgat gacggcaggc gtgtgcgggc 360  
 15 cgatggtgac cgcacaacag atttgcccgt atgcg 395

<210> 13

<211> 902

<212> ADN

20 <213> Mycobacterium intracellulare

<400> 13

ES 2 650 066 T3

cccaacacgc ccacgctgga agcgatgaca cggcacctcg aatacgccgt cgacctcgtc 60  
 ggcatcgagc acgtcgggat cagcaccgac ttctgtttcg acgccgccga tttcgccaac 120  
 gagctgcgcc gcaatcccca cctgttcgac gccagctaca cccgctgggg cccgatccag 180  
 tgggtgccgc cggaaacctt tgtgacactc ggtgagcacc tgcggggaag gggatggaac 240  
 ggtcgtgaca tccaocgggt cctcgggtggc aacttctatc gggtgccaa acaagcctgg 300  
 cgcgcctgaa caggccaccg gcgcatcact tcacggcagt tcgaccttgc tggccagcca 360  
 tcggcagata gatgtccacg atggcgcccg cgtcctcggg cgtggccatt cttagcctca 420  
 cgaccacaga aggctagccg cacgacggcc gatggtcgcg gccttcagga aaagaacctg 480  
 gccataaggg cttctgcgaa cgggcatgac gtggtgtttt gcgaagacgc gagcaaccag 540  
 cgcccgtcgg tccgcacggc gacactggtg ttaccccggg cattgcgccg gttgcgtcgc 600  
 cgcctcacca ccgtcgcggt cgcgtgaatc agcgcacagt cgggtgtgag aaaccggagc 660  
 tgggcgacgt cgatccgtag ccgggtgccc ttgaggagct tgcggaacag cggggcgtac 720  
 gacggatcct ttctcttgat gctgtcgtg atccgggaca actgaaatgc caagtggacc 780  
 atggattccc cgccgtataa cggcgaatag gggccgaagt gtcgggttcg ttggtgatga 840  
 tcagcggctt caccocgggg ccagaaaagg ccgtcgaccg atcgatgttg gcgacaacgg 900  
 ca 902

<210> 14  
 <211> 952  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium intracellulare

5

<400> 14  
 gacgtgacca agcagtagcg ccggggcccg tcggccgtca cagccctcga ttccatcacc 60  
 ttgacggta actccggtga attcgtctgc gttgtggggg catccggctg cggtaagagc 120  
 tcactgctgt cgctgatcgc cgggatggac caaccgtccg ccggcgagct cagcaccgat 180  
 gggcaacggg tggccttgat gtttcaggaa ccggcactgt tcccatggct gacgtcggcc 240  
 gccaacgtcg agttggcctt gcgggcgcgc tcggtgccgc gcccgcaacg ccgccagcgg 300  
 acgactgact tgttgcaaac ggtcggcttg gctgactttg ccgacaaccg tcctcatcag 360  
 ctgtccgggtg gcatgcagca gcgcgtcgca ttggcgcgtg cgctcgcca agacgccgac 420  
 gtcttgctga tggacgagcc gttcggggcg ctggatgccc tgaccctga tcgcctgcac 480  
 gaagaactcg agcgcacgtg tgacgaaacg ggactgaccg tcgtgttcgt tacgcacaac 540  
 gttcgcgagg cagtgcgact cgcgatcgt gtcgtattgc tcagcccgcg gcccggtcgc 600  
 atcgtcgaag agatcgcggt cccggtggcg cggcgcaca gactcaacaa cccgggcgtt 660  
 gccgaattgg cctcccgcac ctccaccag ctacggaacg agggaaaccg tggcgggtgct 720  
 tgacagcgat ctcgctacca agagtcaacc gcctgcatcg acgccgcaag cgcgcaccc 780  
 gaaccgcatg cggatcaggt cgggtcgtggc ggcgatgcgg gcgaaagtct ttgcccgcgc 840  
 gatggttctg ctgatctggc agctcgtgta cctcagcggg tggaaagcgt cattcgtgct 900  
 gcccgcccc ggaaccgtcg cggccaacct ctggcagcgg ctgcatgagg cc 952

10

<210> 15

ES 2 650 066 T3

<211> 460  
 <212> ADN  
 <213> Mycobacterium intracellulare

5 <400> 15  
 cgaagatcaa attcgcgcgc acatccaccg tcagcgtcgg gggtagctgt cgttgaagcc 60  
 ggtgcccgatt tcgctgacgt aatagacgag ggtcccgggtg agcagcaccg cgacgccgaa 120  
 gaacgtcagc caaagacact tgatccgcga ctcgctgggt aaatccttgc gcaacaaacg 180  
 aagccacacg atggtgagca tgatgccgac gagcactgcg ccgaattcca ggccgaagat 240  
 ccacgggtcg tcgctgcccgt agcgggtatc ggccaggccg tactgccacc acagccaccg 300  
 ccaccctggg tccgtggtgg cgggccacag gttgaacggg tgaccgagca agaacggcaa 360  
 ctcataggtc agctggcttc ccgccgtcag agggatgtag atcagtgta gctcggccgc 420  
 aagctgcaga cgggatcgt gctctcccct tcccttcccg 460

<210> 16  
 <211> 22  
 10 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> cebador de oligonucleótido

15 <400> 16  
 cgtggtgtag tagtcagcca ga 22

<210> 17  
 20 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 25 <223> cebador de oligonucleótido

<400> 17  
 aaaaacggat cagaaggaga c 21

30 <210> 18  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

35 <220>  
 <223> cebador de oligonucleótido

<400> 18  
 gcgaactgg ggaatgtg 18

40 <210> 19  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

45 <220>  
 <223> cebador de oligonucleótido

<400> 19  
 50 cgaaaccgca gtcgttct 18

<210> 20

<211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

5 <220>  
 <223> cebador de oligonucleótido

<400> 20  
 ggccatcatc agcaagacc 19

10 <210> 21  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

15 <220>  
 <223> cebador de oligonucleótido

<400> 21  
 atgaacacac accgaagcac 20

20 <210> 22  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

25 <220>  
 <223> cebador de oligonucleótido

30 <400> 22  
 gcgaacgaca tccagatt 18

<210> 23  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

35 <220>  
 <223> cebador de oligonucleótido

40 <400> 23  
 accgtgtgg aacgagac 18

<210> 24  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

45 <220>  
 <223> cebador de oligonucleótido

50 <400> 24  
 gcctcagatc ctctcagtg 20

55 <210> 25  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

60 <220>  
 <223> cebador de oligonucleótido

<400> 25  
 gcgagcgttc atggaataa 19

65

<210> 26  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 5  
 <220>  
 <223> cebador de oligonucleótido  
 <400> 26  
 10 gacgcgctgg taaagaaca 19  
 <210> 27  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 15 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> cebador de oligonucleótido  
 20 <400> 27  
 ctacggaggt gtcagggtct 20  
 <210> 28  
 <211> 18  
 25 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> cebador de oligonucleótido  
 30 <400> 28  
 agagcgcggc agtgagtt 18  
 <210> 29  
 <211> 20  
 35 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 40 <223> cebador de oligonucleótido  
 <400> 29  
 gatacattcc gagcatcacc 20  
 45 <210> 30  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 50 <220>  
 <223> cebador de oligonucleótido  
 <400> 30  
 55 atacatggcg accttgctg 19  
 <210> 31  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 60 <220>  
 <223> cebador de oligonucleótido  
 <400> 31  
 65 gccagatcca gagggagact 20

<210> 32  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 5 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador de oligonucleótido  
  
 10 <400> 32  
 ggcgtcggca tcattat 18  
  
 <210> 33  
 <211> 18  
 15 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador de oligonucleótido  
 20  
 <400> 33  
 cacatcctgc gccaatca 18  
  
 <210> 34  
 <211> 20  
 25 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador de oligonucleótido  
 30  
 <400> 34  
 ctcccaccaa taaggcagag 20  
  
 35 <210> 35  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 40 <220>  
 <223> cebador de oligonucleótido  
  
 <400> 35  
 45 gaccgggcag gagattgt 18  
  
 <210> 36  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 50  
 <220>  
 <223> cebador de oligonucleótido  
  
 55 <400> 36  
 ggcctgaaa ccgaagtc 18  
  
 <210> 37  
 <211> 19  
 60 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador de oligonucleótido  
 65

<400> 37  
 aagccgaacc gatagcact      19

5    <210> 38  
      <211> 20  
      <212> ADN  
      <213> Artificial

10   <220>  
      <223> cebador de oligonucleótido

     <400> 38  
      cagagaatca ccctcctggt      20

15   <210> 39  
      <211> 19  
      <212> ADN  
      <213> Artificial

20   <220>  
      <223> cebador de oligonucleótido

     <400> 39  
      tggccgacat ggtctactc      19

25   <210> 40  
      <211> 18  
      <212> ADN  
      <213> Artificial

30   <220>  
      <223> cebador de oligonucleótido

     <400> 40  
      ccgtgggctt gttttgag      18

35   <210> 41  
      <211> 20  
      <212> ADN  
      <213> Artificial

     <220>  
      <223> cebador de oligonucleótido

45   <400> 41  
      ggccgtatca tctgtgtgag      20

     <210> 42  
      <211> 20  
      <212> ADN  
      <213> Artificial

50   <220>  
      <223> cebador de oligonucleótido

     <400> 42  
      cgtaaccacc cacaagatcg      20

55   <210> 43  
      <211> 20  
      <212> ADN  
      <213> Artificial

60   <220>  
      <223> cebador de oligonucleótido

65   <220>  
      <223> cebador de oligonucleótido

<400> 43  
 gggcgtattc aggtacttcg      20

5    <210> 44  
      <211> 18  
      <212> ADN  
      <213> Artificial

10   <220>  
      <223> cebador de oligonucleótido

<400> 44  
 gcgataccgg ctgatgac      18

15   <210> 45  
      <211> 18  
      <212> ADN  
      <213> Artificial

20   <220>  
      <223> cebador de oligonucleótido

<400> 45  
 cacgccagac caagacga      18

25   <210> 46  
      <211> 19  
      <212> ADN  
      <213> Artificial

30   <220>  
      <223> cebador de oligonucleótido

<400> 46  
 gcaggagatc catcaggaa      19

35   <210> 47  
      <211> 18  
      <212> ADN  
      <213> Artificial

40   <220>  
      <223> cebador de oligonucleótido

<400> 47  
 aggtcttcac cggcaagc      18

45   <210> 48  
      <211> 20  
      <212> ADN  
      <213> Artificial

50   <220>  
      <223> cebador de oligonucleótido

<400> 48  
 tacgtgtggt ggtgatgtcc      20

55   <210> 49  
      <211> 18  
      <212> ADN  
      <213> Artificial

60   <220>

65   <220>

<223> cebador de oligonucleótido  
 <400> 49  
 5 cggcgggtgtt ctactgc 18  
 <210> 50  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 10 <220>  
 <223> cebador de oligonucleótido  
 <400> 50  
 15 gcgataaggt ccgtggtgt 19  
 <210> 51  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 20 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> cebador de oligonucleótido  
 25 <400> 51  
 gccccaagtt gtttctgagt 20  
 <210> 52  
 <211> 21  
 30 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> cebador de oligonucleótido  
 35 <400> 52  
 tcatccgaga tcacacaaac a 21  
 <210> 53  
 40 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 45 <223> cebador de oligonucleótido  
 <400> 53  
 cgagagacgc accgattt 18  
 <210> 54  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 55 <220>  
 <223> cebador de oligonucleótido  
 <400> 54  
 60 cagaccctga cacctccgta 20  
 <210> 55  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 65

<220>  
 <223> cebador de oligonucleótido  
  
 <400> 55  
 5 agagtgcgcc gattttctt 19  
  
 <210> 56  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 10 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador de oligonucleótido  
  
 <400> 56  
 15 gtagccccgc gtgaagtc 18  
  
 <210> 57  
 <211> 20  
 20 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador de oligonucleótido  
  
 <400> 57  
 25 ggggtggtca actacgtctc 20  
  
 <210> 58  
 <211> 20  
 30 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador de oligonucleótido  
  
 <400> 58  
 35 ggtgagagtc gtgttctggt 20  
  
 <210> 59  
 <211> 19  
 40 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador de oligonucleótido  
  
 <400> 59  
 50 gtaggccagc tccatctcc 19  
  
 <210> 60  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador de oligonucleótido  
  
 <400> 60  
 60 acggtcttga gtgcttcg 18  
  
 <210> 61  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 65 <213> Artificial

<220>  
 <223> cebador de oligonucleótido

5 <400> 61  
 tcgaaatcgc atcggtaga 19

<210> 62  
 <211> 19  
 10 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> cebador de oligonucleótido

15 <400> 62  
 gtacaagccg gaggtgtc 19

<210> 63  
 <211> 18  
 20 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> cebador de oligonucleótido

25 <400> 63  
 cttgagcccc caggtcc 18

30 <210> 64  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

35 <220>  
 <223> cebador de oligonucleótido

<400> 64  
 40 cagcgaccgt ggttcttac 20

<210> 65  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

45 <220>  
 <223> cebador de oligonucleótido

<400> 65  
 50 ggaagtgggc ggtatcct 18

<210> 66  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 55 <213> Artificial

<220>  
 <223> cebador de oligonucleótido

60 <400> 66  
 tcgaatatgc agtgtaccg 20

<210> 67  
 <211> 20  
 65 <212> ADN

<213> Artificial  
 <220>  
 <223> cebador de oligonucleótido  
 5 <400> 67  
 ttccacatca gagggagtcg 20  
 <210> 68  
 10 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 15 <223> cebador de oligonucleótido  
 <400> 68  
 tgagcgccag acaaagtg 19  
 20 <210> 69  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 25 <220>  
 <223> cebador de oligonucleótido  
 <400> 69  
 30 ggccaaaaga cctaagacca 20  
 <210> 70  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 35 <220>  
 <223> cebador de oligonucleótido  
 <400> 70  
 40 tctgtgggtc aggtcttct 20  
 <210> 71  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 45 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> cebador de oligonucleótido  
 50 <400> 71  
 gagacgaaac accagtcacg 20  
 <210> 72  
 <211> 18  
 55 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> cebador de oligonucleótido  
 60 <400> 72  
 cgtcgattg aggattgg 18  
 <210> 73  
 65 <211> 19

<212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 5 <223> cebador de oligonucleótido  
  
 <400> 73  
 gccgtgttg ctcgatag 19  
  
 10 <210> 74  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 15 <220>  
 <223> cebador de oligonucleótido  
  
 <400> 74  
 gatgggccgt atcctcgta 19  
 20  
 <210> 75  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 25  
 <220>  
 <223> cebador de oligonucleótido  
  
 <400> 75  
 30 ggatctatta ccgacaacca tgt 23  
  
 <210> 76  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 35 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador de oligonucleótido  
  
 <400> 76  
 40 gatccccttg gtcgttgc 18  
  
 <210> 77  
 <211> 20  
 45 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador de oligonucleótido  
 50  
 <400> 77  
 ccagtgtctac acaaaccaca 20  
  
 <210> 78  
 55 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 60 <223> cebador de oligonucleótido  
  
 <400> 78  
 gccattctta gcctcagac 20  
  
 65 <210> 79

<211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

5 <220>  
 <223> cebador de oligonucleótido

<400> 79  
 ctggttgctc gcgtcttc 18

10 <210> 80  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

15 <220>  
 <223> cebador de oligonucleótido

<400> 80  
 ctgttcgacg ccagctacac 20

20 <210> 81  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

25 <220>  
 <223> cebador de oligonucleótido

<400> 81  
 ggccaccgga tagaagttg 19

30 <210> 82  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

35 <220>  
 <223> cebador de oligonucleótido

<400> 82  
 ggtggccttg atgttcag 19

40 <210> 83  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

45 <220>  
 <223> cebador de oligonucleótido

<400> 83  
 agctgatgag gacggtgctc 20

50 <210> 84  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

55 <220>  
 <223> cebador de oligonucleótido

<400> 84  
 cgccacagag tcaacaacc 19

60 <220>  
 <223> cebador de oligonucleótido

65

<210> 85  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 5  
 <220>  
 <223> cebador de oligonucleótido  
 <400> 85  
 10 cgagatcgct gtcaagcac 19  
 <210> 86  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 15 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> cebador de oligonucleótido  
 20 <400> 86  
 agcggacgac tgactgttg 20  
 <210> 87  
 <211> 18  
 25 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> cebador de oligonucleótido  
 30 <400> 87  
 tcttcgtgca ggcgatca 18  
 <210> 88  
 <211> 21  
 35 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 40 <223> cebador de oligonucleótido  
 <400> 88  
 tttcgtgac gtaatagacg a 21  
 45 <210> 89  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 50 <220>  
 <223> cebador de oligonucleótido  
 <400> 89  
 55 ggatcttcgg cctggaat 18  
 <210> 90  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 60 <220>  
 <223> cebador de oligonucleótido  
 <400> 90  
 65 acggcaactc ataggtcagc 20

ES 2 650 066 T3

<210> 91  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 5 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador de oligonucleótido  
  
 10 <400> 91  
 gaaggggaagg ggagagca 18  
  
 <210> 92  
 <211> 116  
 15 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> sonda de oligonucleótido  
 20  
 <400> 92  
 cgtggtgtag tagtcagcca gaacacgggc ggccatcagg cggcgatgc ttccccccag 60  
 aacgactgcg gtttcgcca attcaggcac actgagtctc cttctgatcc gttttt 116  
  
 <210> 93  
 <211> 169  
 25 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 30 <223> sonda de oligonucleótido  
  
 <400> 93  
 gcgaacttgg ggaatgtgcy gactggggcc atggggcact ccgcggcggg cactgggcy 60  
 ttcgggcaga acgtctcgtt ccaccaggt caccgtggtg tagtagtcag ccagaacag 120  
 ggcggccatc aggcggcga tgcttcccc cagaacgact ggggtttcg 169  
  
 35 <210> 94  
 <211> 165  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 40 <220>  
 <223> sonda de oligonucleótido  
  
 <400> 94  
 ggccatcatc agcaagaccg tggcgaggcc gtgcaggaca agttgtcga aaacgacatc 60  
 ccggccaagc gagtcgtcca attcggtcga ccgcgaataa tccgggatca caaagcgata 120  
 gcgctctgag ccgaatctcg ttctcgtgct tcggtgtgtg ttcatt 165  
 45  
 <210> 95  
 <211> 200  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 50  
 <220>  
 <223> sonda de oligonucleótido  
  
 <400> 95

ES 2 650 066 T3

	gcgaacgaca tccagattcg cgataggtca ccgctcctcc aactcgcgc tcccatcgcc	60
	accaactcat cgaggagccc ggggaacagc tcctccatgg tctgcgtggc gcgaacttgg	120
	ggaatgtgcg gactggggcc atggggcact ccgcggcggg ccactgggcy ttcgggcaga	180
	acgtctcgtt ccaccacggt	200
	<210> 96	
	<211> 166	
5	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
10	<223> sonda de oligonucleótido	
	<400> 96	
	gcctcagatc ctctcagtg agcacggcct ccagcgggccc tgattcatca gatgaaccgg	60
	gcgtagttct gccgtctggt gcataagccc acaccagccc tgggtcagat tgcaccgcaa	120
	catctttgat gtcggcgctt aaccgactta ttccatgaac gctcgc	166
	<210> 97	
15	<211> 145	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
20	<223> sonda de oligonucleótido	
	<400> 97	
	gacgcgctgg taaagaacag cggcggggtg gacctgatca ccggaccagg ctcgagtttg	60
	ccaggcccac cggcggccag gtgtgctcga agaccgata acgccatcgg ccgcggccca	120
	ctggcagacc ctgacacctc cgtag	145
25	<210> 98	
	<211> 170	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
30	<220>	
	<223> sonda de oligonucleótido	
	<400> 98	
	agagcgcggc agtgagttga ccgacatccg gcgtgagcat gtccgttcga tccagccaaa	60
	gctcgtcccg agcgtggcgg ccggtaccga gcggttgcaa gtcgaagtcg cctaccagcc	120
35	cgccgatgtc agcagcgagg cgaccgcgac ggtgatgctc ggaatgtatc	170
	<210> 99	
	<211> 149	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
40	<220>	
	<223> sonda de oligonucleótido	
	<400> 99	
	atacatggcg accttgctgt tccccctaat cgcgatcgcc atgattggcg caggatgtgc	60
	acccggtaat ccggcgtggc tgtggtacgg cggggccatt ctgctggcca tctctgcctt	120
45	attggtggga gtctccctct ggatctggc	149

ES 2 650 066 T3

<210> 100  
 <211> 166  
 <212> ADN  
 5 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> sonda de oligonucleótido  
  
 10 <400> 100  
 ggcgtcggca tcatttatgg gagcggccgc cgaatatttcg gcgccggggt cagcgggacc 60  
 gggcaggaga ttgtctgccg ctatcttcg tggtacgaga gcaaccata catggcgacc 120  
 ttgtctgtcc cctaatacgc gatcgccatg attggcgag gatgtg 166  
  
 <210> 101  
 <211> 182  
 15 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> sonda de oligonucleótido  
 20  
 <400> 101  
 ctcccaccaa taaggcagag atggccagca gaatggccc gccgtaccac agccacgccg 60  
 gattaccggg tgcacatcct gcgccaatca tggcgatcgc gattaggggg aacagcaagg 120  
 tcgccatgta tgggttgcct tcgtaccacg gaagatagcg gcagacaatc tcctgcccg 180  
 tc 182  
  
 <210> 102  
 <211> 115  
 25 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> sonda de oligonucleótido  
 30  
 <400> 102  
 gcgcctgaaa ccgaagtgc cccgcagcgg gtatgtcgat ggagcgtggt ggccgcatag 60  
 tgacgacctg acggcggagc tgccagatct gctggcagtg ctatcggttc ggctt 115  
  
 35 <210> 103  
 <211> 157  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 40 <220>  
 <223> sonda de oligonucleótido  
  
 <400> 103  
 cagagaatca ccctcctggt ggtttcacgc cacaccgacg aaaacgatgc gcacaccgtc 60  
 atgatgaccg cggccggccc gaacaacgcc ttgacggctc cgaacctcat gatcagggg 120  
 caaaaagtgg acgcccgcga gtagaccatg tcggcca 157  
  
 45 <210> 104  
 <211> 137  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 50 <220>

ES 2 650 066 T3

	<223> sonda de oligonucleótido	
	<400> 104	
	ccgtgggctt gttttgagcg gctatcaccg agtgggaagac gctgatgagt ccgaaggctt	60
	tgagaactca tgtagcctcg ggtatcgacc aaccacagag ccgatcaggc aggtgetctc	120
5	acacagatga tacggcc	137
	<210> 105	
	<211> 128	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
10	<220>	
	<223> sonda de oligonucleótido	
	<400> 105	
	cgtaaccacc cacaagatcg gacgtgacc cttttgccgc ggttcgtaa cccgcctgt	60
	ccgcatgctt ccgctcagcc cgaatctcac tgattocatg gcgattaccg aagtacctga	120
15	atacgccc	128
	<210> 106	
	<211> 170	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
20	<220>	
	<223> sonda de oligonucleótido	
25	<400> 106	
	gcgataccgg ctgatgacat cgacgcgctc gctgaccgga cggttcgccc agtcggcctg	60
	cgccgcgcgc gcctcggcga aggcggcttc gacgtcttcg gccgtgccga cggggatggt	120
	ggtcagcggc ttgccggtga agacctcgtc gatcgtcttg gtctggcgtg	170
	<210> 107	
	<211> 189	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
30	<220>	
	<223> sonda de oligonucleótido	
35	<400> 107	
	gcaggagatc catcaggaac tcgcggttct cgacgaccag gtcgcgatac cggctgatga	60
	catcgacgcg ctcgetgacc ggacggttcg ccagtcggc ctgcgccgcg cgcgcctcgg	120
	cgaaggcggc ttcgacgtct tcggccgtgc cgacgggat ggtggtcagc ggcttgccgg	180
	tgaagacct	189
	<210> 108	
	<211> 126	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
40	<220>	
	<223> sonda de oligonucleótido	
45	<400> 108	

ES 2 650 066 T3

tacgtgtggt ggtgatgtcc gctcaggggc atggcgataa ggtccgtggt gtcgacggcc 60  
 ggacccacca attcgtatgc cgatttgttt tcgaaccgcc agatcgctgc agtaagaaca 120  
 ccgccg 126

<210> 109  
 <211> 150  
 5 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> sonda de oligonucleótido

10 <400> 109  
 gcgataagggt ccgtggtgtc gacggccgga cccaccaatt cgtatgccga tttgttttcg 60  
 aaccgccaga tcgctgcagt aagaacaccg ccggagccgg tgatgcgttg tccgggcttg 120  
 aagcccaggc actcagaaac aacttcgggc 150

<210> 110  
 <211> 130  
 15 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 20 <223> sonda de oligonucleótido

<400> 110  
 tcatccgaga tcacacaaac aagtctcgac tcggtgtcgg gccttcagcc accgatgatg 60  
 ggacacgttt cccacagata gcgacatcgt ccggctacgc acgacattcc cgaaatcggt 120  
 25 gcgtctctcg 130

<210> 111  
 <211> 139  
 <212> ADN  
 30 <213> Artificial

<220>  
 <223> sonda de oligonucleótido

35 <400> 111  
 cagaccctga cacctccgta gaccccagtg cgtgaaccc caagaactga gttgattccg 60  
 cgaaaccacg gcagcgcggt gtgaatccag gtattgcggt tgatgtcctc gtcgatgggt 120  
 aagaaaatcg ggcactct 139

<210> 112  
 <211> 168  
 40 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> sonda de oligonucleótido

45 <400> 112  
 gtagccccgc gtgaagtctg acggtgtcga cccaccggc ttgccgtatt ggtagtact 60  
 gacaatcacc aaaccgcgag ctgtcagtga gtcggogtag gaccgagtga tgggcttggc 120  
 gccgaacgag gagccggggc gtgacaacga gacgtagtgtg accacccc 168

<210> 113

ES 2 650 066 T3

<211> 138  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

5 <220>  
 <223> sonda de oligonucleótido

<400> 113  
 ggtgagagtc gtgttctggt acttcatgga gagccgggtg tcggtaagac ggccttgctg 60  
 gactacgtcg gtgaacgggc cgccggctgt cgcgtcatcc gtgccagcgg ggtcgagtcg 120  
 gagatggagc tggcctac 138

10 <210> 114  
 <211> 172  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

15 <220>  
 <223> sonda de oligonucleótido

20 <400> 114  
 acggtcttga gtgcttcgat gagagcggga tcgatcggcc gcccgatcag tgtgtcaccg 60  
 cccgcgacca tgacgggtgc gacggattcg agggccgaga ggggacacgt cacagcgaat 120  
 cgggtgccga tcgacgtggt cacatcgcgt ccgtctaccg atgcgatttc ga 172

25 <210> 115  
 <211> 148  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

30 <220>  
 <223> sonda de oligonucleótido

<400> 115  
 gtacaagccg gaggggtgtca caacgtgtgg atcggcgaca tgaacggcga tcacctgaga 60  
 aacgtgcgcg gataagtggc ggcgtgcgcg acgtggact cacactgcga caaagaaatt 120  
 caccgggggc ggaacctggg ggctcaag 148

35 <210> 116  
 <211> 131  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

40 <220>  
 <223> sonda de oligonucleótido

<400> 116  
 cagcgaccgt gtgttcttac accgcgattt tcatccggc aacatcttgt ggcagcaagg 60  
 caaaatatcc ggacttgtcg actgggtctc gtcgtgcgcc ggacctgtcc aggaggatac 120  
 cgcccacttc c 131

45 <210> 117  
 <211> 113  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

50 <220>  
 <223> sonda de oligonucleótido

# ES 2 650 066 T3

```

<400> 117
tcgaatatgc agtgttaccg ggaatccgga cggttccgcg atcgcacgtc gcggttaccg      60

ttggtggcct gaggcaagct ttggccatga catcgactcc ctctgatgtg gaa                113

5  <210> 118
    <211> 184
    <212> ADN
    <213> Artificial

10  <220>
    <223> sonda de oligonucleótido

    <400> 118
    tgagcgcag acaaagtgtc aggtcattgc gcagcggccg ttggaaggcg gccagtccgc      60
15  ggcgattcac cgccttgttc tcgatgaccg aagcgtgtg atoctgcagc gattcgttct      120
    ggattggatc cgcgacgagc cgtgggctcc tgcgaacgag gtactggtct taggtctttt      180
    ggcc                                                                184

    <210> 119
    <211> 169
    <212> ADN
    <213> Artificial

    <220>
    <223> sonda de oligonucleótido

25  <400> 119
    tctgtgggtc agggctctct ggatcggtcg tcgccggtcg gctttcggag aatccggacg      60
    ttacggtgct tttgctcgag gccggtgaaa ccgatgatgt ttcggcagtc cacgatccca      120
    cgcagtggcc gctgaacttg ggtagcagc gtgactggtg tttcgtctc                169

    <210> 120
    <211> 156
    <212> ADN
    <213> Artificial

    <220>
    <223> sonda de oligonucleótido

35  <400> 120
    cgtcgcattg aggattggca cgggccggca gtctccgcc gccgcaccgg gggcccatg      60
    tccgtgacgt ccccgccca cccaatccg atcgtccgg ccatcgtcga ggcgctcgc      120
    tcgctgggga tcccgagcta tccgagcaac aacggc                                156

40  <210> 121
    <211> 185
    <212> ADN
    <213> Artificial

45  <220>
    <223> sonda de oligonucleótido

    <400> 121

```

ES 2 650 066 T3

gatgggccgt atcctcgtag ggattcgtcg atcccgggc atgtggtttg tgtagcactg 60  
 gcgcgcatcc tcctaacaac acggcgacga ccactagcga actgatcagc gcttggcgca 120  
 acggcatacg ttgttctca atgggtggtg tgagcatcga aacatggtt gtcggaata 180  
 gatcc 185

5 <210> 122  
 <211> 184  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> sonda de oligonucleótido

<400> 122  
 gatccccttg gtcggtgac gagggaaacg agaatgccc gctgacgcc tccagcttcg 60  
 cggcggcgac gatctgcttg gccggctcga tcacctggc cttggtctga tcgtcgctca 120  
 tgggatgggc cgtatcctcg tacggattcg tcgatcccgc ggcattggtt ttgtgtagca 180  
 ctgg 184

15 <210> 123  
 <211> 136  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> sonda de oligonucleótido

<400> 123  
 gccattctta gcctcacgac cacagaaggc tagccgcacg acggccgatg gtcgcggcct 60  
 tcaggaaaag aacctggcca taagggttc tgcgaacggg cgatgcgtgg tgttttgca 120  
 agacgcgagc aaccag 136

25 <210> 124  
 <211> 147  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

30 <220>  
 <223> sonda de oligonucleótido

<400> 124  
 ctgttcgacg ccagctacac ccgctggggc ccgatccagt gggtgccgcc ggaaaccttt 60  
 gtgacactcg gtgagcacct gcggggaagg ggatggaacg gtcgtgacat ccacgcggtc 120  
 ctcggtggca acttctatcg ggtggcc 147

35 <210> 125  
 <211> 174  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

40 <220>  
 <223> sonda de oligonucleótido

<400> 125

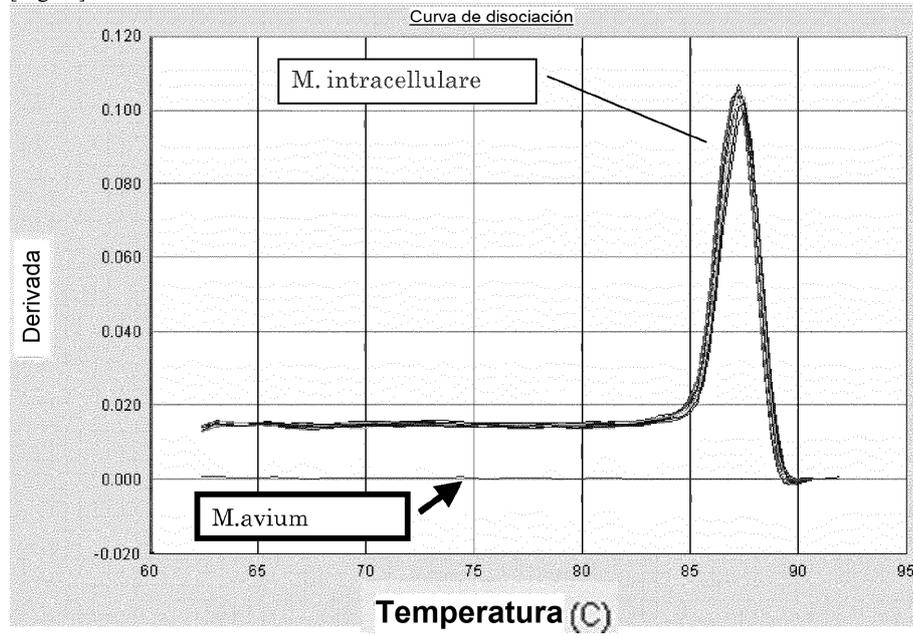
ES 2 650 066 T3

	ggcggccttg atgtttcagg aaccggcact gttcccatgg ctgacgtcgg ccgccaacgt	60
	cgagttggcc ttgcggggcg gctcggtgcc gcgcccgcaa cgccgccagc ggacgactga	120
	cttggtgcaa acggtcggct tggctgactt tgccgacaac cgtcctcacc agct	174
5	<210> 126 <211> 101 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> sonda de oligonucleótido	
	<400> 126 cgccacagag tcaacaaccc gggcgttgcc gaattggcct cccgcatctc caccagcta	60
	cggaacgagg gaaaccgtgg cgggtgcttga cagcgatctc g	101
15	<210> 127 <211> 190 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> sonda de oligonucleótido	
	<400> 127 agcggacgac tgacttggtg caaacggtcg gcttggctga ctttgccgac aaccgtcctc	60
	atcagctgtc cggtagcatg cagcagcgcg tcgattggc gcgtgctc gcccaagacg	120
	ccgacgtctt gctgatggac gagccgttcg gggcgttga tgccctgacc cgtgatcgcc	180
	tgacgaaga	190
25	<210> 128 <211> 174 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> sonda de oligonucleótido	
	<400> 128 tttcgctgac gtaatagacg agggctcccg tgagcagcac cgcgacccg aagaacgtca	60
	gccaaagaca ctgatccgc gactcgtcgg gtaaactctt gcgcaacaaa cgaagccaca	120
35	cgatggtgag catgatgccg acgagcactg cgccgaattc caggccgaag atcc	174
40	<210> 129 <211> 104 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> sonda de oligonucleótido	
	<400> 129 acggcaactc ataggtcagc tggcttcccg ccgtcagagg gatgtagatc agtgtcagct	60
45	cggccgcaag ctgcagacgg gatcgtgct ctccccttcc ctcc	104

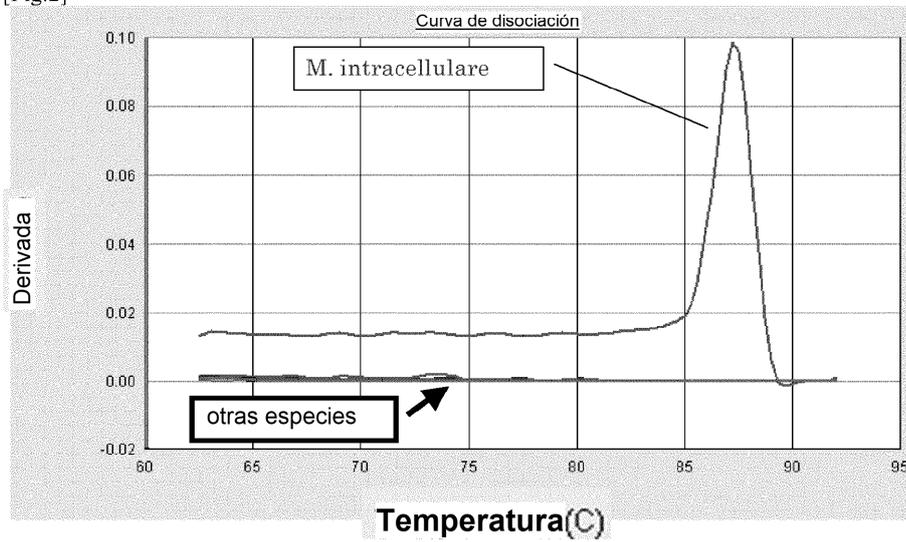
**REIVINDICACIONES**

1. Un oligonucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 6, o una secuencia complementaria a la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 6, en donde el oligonucleótido es capaz de hibridarse con una secuencia de nucleótidos del gen de *Mycobacterium intracellulare*.
- 5 2. Un cebador para detectar *Mycobacterium intracellulare*, que comprende un oligonucleótido que consiste en la secuencia de nucleótidos mostrada en cualquiera de SEQ ID NO: 40 a 47, o una secuencia complementaria a la secuencia de nucleótidos mostrada en cualquiera de SEQ ID NO: 40 a 47.
3. El cebador según la reivindicación 2, en donde el oligonucleótido está marcado con una sustancia marcadora, preferiblemente la sustancia marcadora se selecciona a partir de un radioisótopo, una enzima, una sustancia fluorescente, una sustancia luminiscente o una biotina.
- 10 4. Un método para detectar *Mycobacterium intracellulare*, que comprende el uso del cebador según la reivindicación 2.
5. El método según la reivindicación 4, que comprende:
  - llevar a cabo una reacción de amplificación del ácido nucleico usando el cebador y un ácido nucleico en una muestra como molde; y
  - 15 detectar un producto de extensión del cebador obtenido.
6. El método según la reivindicación 4, que comprende
  - llevar a cabo una PCR en tiempo real en presencia de una sonda que comprende un oligonucleótido que consiste en 15 a 40 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 6, o 15 a 40 nucleótidos de la secuencia complementaria a la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 6,
  - 20 en donde la sonda es capaz de hibridarse con el gen de *Mycobacterium intracellulare*.
7. El método según la reivindicación 6, en el que la sonda consiste en 15 a 40 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos mostrada en cualquiera de SEQ ID NO: 104 a 107, o 15 a 40 nucleótidos de la secuencia complementaria a la secuencia de nucleótidos mostrada en cualquiera de SEQ ID NO: 104 a 107, y
- 25 en donde el extremo 5'-terminal de la sonda se marca con un colorante fluorescente informador y el extremo 3'-terminal de la sonda se marca con un colorante extintor.
8. El método según la reivindicación 4, que comprende las siguientes etapas de:
  - (1) Llevar a cabo una reacción de amplificación del ácido nucleico usando el cebador y un ácido nucleico en una muestra como molde;
  - 30 (2) Llevar a cabo una electroforesis del producto de extensión del cebador obtenido en el apartado (1); y
 detectar *Mycobacterium intracellulare* basándose en el resultado obtenido de la electroforesis.
9. El método según la reivindicación 4, en el que el cebador se marca con una sustancia marcadora; y una reacción de amplificación del ácido nucleico se lleva a cabo usando el cebador mencionado anteriormente y usando un ácido nucleico en una muestra como molde; después de lo cual se mide una señal obtenida a partir del producto de extensión del cebador obtenido.
- 35 10. El método según la reivindicación 4, que comprende:
  - hibridar una sonda marcada con un ácido nucleico en una muestra, en donde la sonda marcada se prepara marcando la sonda según la reivindicación 4 con una sustancia marcadora;
  - eliminar una sonda marcada libre; y
  - 40 detectar una señal obtenida a partir de un complejo hibridado.
11. Un kit de reactivos para la detección de *Mycobacterium intracellulare*, que comprende el cebador según la reivindicación 2.

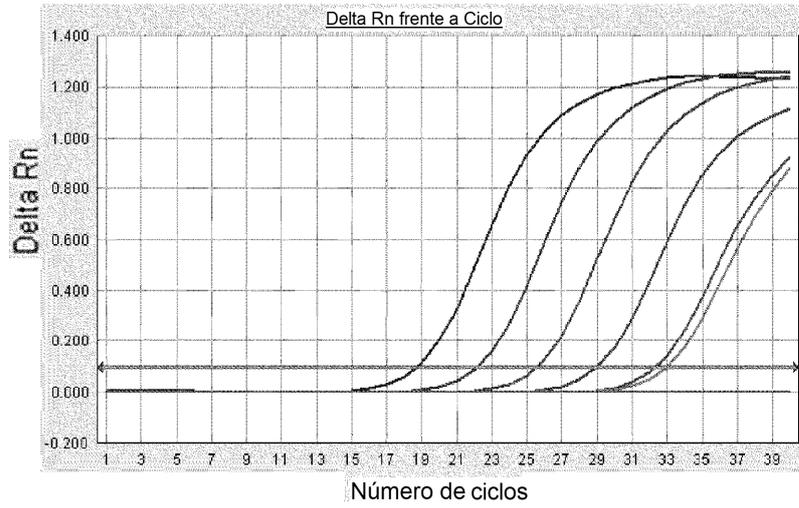
[Fig. 1]



[Fig.2]



[Fig. 3]



[Fig. 4]

