

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 664 335**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.12.2013 PCT/FI2013/051144**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.06.2014 WO14087055**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.12.2013 E 13814189 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.01.2018 EP 2929051**

54 Título: **Método para detectar ADN de Helicobacter pylori en una muestra de heces**

30 Prioridad:

05.12.2012 FI 20126271

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

19.04.2018

73 Titular/es:

**AMPLIDIAG OY (100.0%)
Viikinkaari 6
00790 Helsinki, FI**

72 Inventor/es:

**KIRVESKARI, JUHA y
RAUTELIN, HILPI**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 664 335 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

Método para detectar ADN de *Helicobacter pylori* en una muestra de heces

La presente invención se refiere al campo de los ensayos de diagnóstico basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Más específicamente, la presente invención proporciona un método basado en PCR para detectar las bacterias que causan gastritis crónica, concretamente *Helicobacter pylori*, en una muestra de heces. La presente invención se basa en el uso de cebadores y sondas oligonucleotídicos específicos para el gen de ARNr 23S de *H. pylori*.

Antecedentes de la invención

H. pylori es una bacteria gram- negativa y microaerofílica que causa gastritis crónica. Se estima que aproximadamente la mitad de la población mundial está infectada con esta bacteria. La mayor parte de los individuos infectados con *H. pylori* son asintomáticos a pesar de la gastritis, pero una minoría desarrollara secuelas graves. *H. pylori* es el factor clave en el desarrollo de úlceras duodenales o gástricas y el factor de riesgo único más común para cáncer gástrico no cardial. La erradicación exitosa de la infección por *H. pylori* da lugar a la curación de la enfermedad de úlcera péptica (Ford et al, 2003) y a un alivio a largo plazo de los síntomas dispépticos incluso en algunos pacientes sin úlceras (Ford et al., 2004). La terapia de erradicación de la infección por *H. pylori* también está recomendada como el tratamiento de primera línea para linfoma de tejido linfoide asociado a la mucosa (MALT) de grado bajo y sobre la base de estudios epidemiológicos la terapia de erradicación exitosa de *H. pylori* puede dar lugar a un número disminuido de casos de cáncer gástrico (Kosunen et al, 2011; Chey y Wong, 2007).

Los métodos de diagnóstico para la detección de la infección por *H. pylori* pueden dividirse en métodos invasivos (se requiere gastroscopia) y no invasivos. Aunque varios métodos proporcionan resultados altamente exactos, no existe un único estándar de oro para el diagnóstico de la infección por *H. pylori*, sino que la selección de los métodos depende de la situación clínica y si existe de otra manera la necesidad de una gastroscopia. Según la estrategia de ensayo y tratamiento, los pacientes con un riesgo bajo de cáncer gástrico pueden ensayarse para detectar *H. pylori* con métodos no invasivos y tratarse si se detecta *H. pylori*.

Aunque los métodos de diagnóstico no invasivos, tales como ensayos del aliento con urea y ensayos de antígeno en heces, muestran en general tasas de detección altamente exactas, estos métodos no proporcionan ninguna información sobre la susceptibilidad antimicrobiana del aislado infeccioso de *H. pylori*. Además, incluso si se toman biopsias gástricas por gastroscopia y se envían para cultivo, los resultados del ensayo de susceptibilidad antimicrobiana no están disponibles habitualmente en todos los casos positivos debido a la baja sensibilidad del cultivo. Sin embargo, está creciendo la necesidad del ensayo de susceptibilidad antimicrobiana de *H. pylori*. La terapia de erradicación de *H. pylori* consiste habitualmente en dos agentes antimicrobianos diferentes y un inhibidor de la bomba de protones. La claritromicina es un componente importante de la triple terapia clásica y en el caso de *H. pylori* resistente a claritromicina, el régimen basado en claritromicina resulta en un fallo en la erradicación en la gran mayoría de los casos (Fischbach y Evans, 2007).

Debido a las tasas crecientes de resistencia a claritromicina (Malfertheiner et al., 2012) las últimas directrices europeas recomiendan el uso de ensayos moleculares en la detección de *H. pylori* en biopsias gástricas y el ensayo de la susceptibilidad antimicrobiana si el cultivo no está disponible. Se han desarrollado métodos moleculares para la detección de *H. pylori* y el ensayo simultáneo para susceptibilidad a claritromicina de los aislados. La resistencia a claritromicina de *H. pylori* es muy conocida y se debe a mutaciones puntuales en la región peptidiltransferasa del gen de ARNr 23S.

La alta relevancia clínica de la infección por *H. pylori* en la mucosa gástrica ha estimulado el desarrollo de varios métodos de diagnóstico basados en PCR que detectan el ADN de *H. pylori* en muestras de heces. Sin embargo, ha surgido frecuentemente el problema de la baja sensibilidad. Estos resultados pueden haberse debido a una ausencia de ADN intacto de *H. pylori* en las heces. A diferencia de los patógenos bacterianos intestinales, que se encuentran en forma viable a altas concentraciones en las heces, el *H. pylori* vivo probablemente no esté presente en absoluto y, consecuentemente, su ADN puede estar presente solo en una forma degradada haciendo que la detección sea más exigente. Aunque algunos de los métodos basados en PCR han mostrado resultados exactos en la detección de *H. pylori* y en el ensayo de la susceptibilidad a claritromicina en biopsias gástricas, han surgido problemas cuando los métodos se han usado en muestras de heces. Debido a algunas limitaciones importantes, tales como inhibidores de PCR (Monteneiro, 1997) y bajas concentraciones de ADN de *H. pylori* en su mayor parte fragmentado en muestras fecales, ha sido difícil desarrollar métodos lo suficientemente sensibles. Los métodos basados en PCR solo han mostrado sensibilidades de aproximadamente un 60 % cuando se aplican a muestras de heces (Lottspeich, 2007 etc). El propósito del presente estudio fue desarrollar un método no invasivo altamente exacto para la detección de *H. pylori* y la susceptibilidad concomitante a claritromicina del aislado en muestras fecales.

Schabereiter-Gurtner et al. (2004) describieron un ensayo de PCR en tiempo real para la detección de la infección por *H. pylori* y el ensayo de susceptibilidad a claritromicina simultáneo en muestras de heces. En la práctica, los autores detectaron mutaciones puntuales en el gen de ARNr 23S de *H. pylori* asociadas con la resistencia a claritromicina. Sin embargo, Lottspeich et al. (2007) evaluaron el método y concluyeron que la detección del ADN de *H. pylori* en muestras de heces por PCR en tiempo real es una tarea difícil y que este método no puede reemplazar

el EIA de antígeno en heces para el diagnóstico exacto de infección por *H. pylori*. Posteriormente, Scaletsky et al. (2011) encontraron que el método se demostró apropiado para el ensayo de susceptibilidad a claritromicina de *H. pylori*, aunque debería tenerse en cuenta la posibilidad de perder algunos resultados positivos. Otras publicaciones que describen cebadores y/o sondas específicas para el gen del ARNr 23S de *H. pylori* son: Fontana et al., 2003; Noguchi et al., 2007; Dewhirst et al., 2005; Maeda et al., 1998; Khan et al., 2004; y Rimbara et al., 2005.

Los ensayos de PCR para la detección de *H. pylori* dirigidos a otros genes diana distintos del gen de ARNr 23S se describen en las siguientes publicaciones: Falsafi et al., 2009; Singh et al., 2008; Monteiro et al., 2001; Makristathis et al., 1998; Mishra et al., 2008; y Burucoa et al., 1999.

En el desarrollo de los ensayos de PCR, uno de los factores más importantes es localizar las secuencias de oligonucleótido que permiten la amplificación, detección y cuantificación fiables específicas de especie. Tiene una importancia máxima que un conjunto dado de oligonucleótidos, diseñados para amplificar *H. pylori*, no reaccionen de manera cruzada con ADN que se origina de cualquier otra especie posiblemente presente en una muestra. El descubrimiento de dichas secuencias no es en absoluto trivial, al menos por las siguientes razones: 1) Muchas de las especies están relacionadas relativamente de cerca, haciendo que sea un reto localizar secuencias que son únicas para cada especie; 2) Las cepas de patógenos que se originan de una única especie pueden ser divergentes genéticamente, haciendo que sea difícil localizar secuencias que permitirían una amplificación igualmente eficiente de todas las cepas en una especie; 3) La muestra puede contener inhibidores de PCR o, como en este caso, la muestra contiene ADN diana principalmente fragmentado, ya que *H. pylori* se desarrolla típicamente en la mucosa gástrica y muy probablemente morirá y se deteriorará en el intestino grueso. Por lo tanto, la amplificación efectiva del ADN de patógenos de una muestra de heces requiere un diseño de oligonucleótidos que permita una alta eficiencia de la PCR (óptimamente, tan cerca del 100 % como sea posible).

Comparada con la técnica anterior, la presente invención proporciona al menos las siguientes ventajas principales: la diferencia de Tm de los cebadores externos e internos se optimiza para conseguir rutinas de reacción más simples, p. ej., la reacción de PCR anidada de la presente invención puede realizarse en un único recipiente. Rimbara et al., 2005, y Noguchi et al., 2007, describen métodos en los que la PCR anidada se realiza secuencialmente en dos reacciones separadas. La robustez de la reacción de PCR de la presente invención también está en el nivel en el que no es necesario aislar y purificar el ADN de una muestra de heces por extracción con fenol u homogeneización de la muestra como se hace en Rimbara et al., 2005, y Noguchi et al., 2007, respectivamente. Además, la longitud del amplicón que se amplifica en la segunda reacción de la PCR anidada en Rimbara et al., 2005, y Noguchi et al., 2007, es demasiado larga como para ser detectada de forma sensible en la PCR en tiempo real. La longitud del amplicón amplificado por los cebadores internos de la presente invención es 143 pb mientras que en Rimbara es 463 pb y en Noguchi es 367 pb.

Las descripciones por Fontana et al., 2003, JP 2005168474, y Booka et al., 2005 no están dirigidas a una reacción de PCR anidada y, consecuentemente, los cebadores descritos no son compatibles con reacciones anidadas sin modificación. Además, la longitud del amplicón amplificado en Fontana et al., 2003, es 991 pb y es así demasiado largo como para ser detectado en PCR en tiempo real. También es destacable que Fontana et al. están amplificando una región diferente del gen de ARNr 23S que Noguchi et al. Por lo tanto, está claro que la técnica anterior está enseñando que hay regiones alternativas en el ARNr 23S que son adecuadas como regiones diana para la detección basada en PCR de la presencia de cepas de *Helicobacter*. En JP 2005168474, parece que los cebadores no son específicos para *Helicobacter*, sino que también pueden reaccionar de manera cruzada con cepas de *Campylobacter*.

Aunque ya se han descrito numerosos ensayos basados en PCR para detectar *H. pylori*, todavía existe una necesidad en el campo de un ensayo de PCR que sea capaz de proporcionar alta especificidad y fiabilidad para la detección. Los presentes inventores han localizado ahora regiones de la secuencia de ADN en el gen del ARNr 23S de *H. pylori* que sorprendentemente son muy adecuadas para la amplificación específica y sensible del ADN de *H. pylori* de heces. Se han diseñado y validado cebadores óptimos y sondas de PCR cuantitativas para la identificación de la presencia de *H. pylori* en pacientes.

Resumen de la invención

La invención es como se muestra en las reivindicaciones. La presente descripción proporciona un método para detectar ADN de *H. pylori* en una muestra de heces, comprendiendo el método las etapas de:

a) realizar una reacción de PCR que comprende ADN aislado de una muestra de heces como un molde y un conjunto de cebadores oligonucleotídicos específico para amplificar una secuencia diana específica de *H. pylori* en un gen de ARNr 23S de *H. pylori* en una reacción de amplificación, en el que el conjunto de cebadores oligonucleotídicos comprende un oligonucleótido que consiste en al menos 10 nucleótidos contiguos presentes en una secuencia de nucleótidos como se muestra en SEQ ID NO: 1 y un oligonucleótido que consiste en al menos 10 nucleótidos contiguos presentes en una secuencia de nucleótidos como se muestra en SEQ ID NO: 2; y

b) detectar el ADN de *H. pylori* en dicha muestra de heces cuando se amplifica la secuencia diana específica de *H. pylori*.

La presente descripción también proporciona un conjunto de cebadores oligonucleotídicos que comprende un oligonucleótido que consiste en al menos 10 nucleótidos contiguos presentes en una secuencia de nucleótidos como se muestra en SEQ ID NO: 1 y un oligonucleótido que consiste en al menos 10 nucleótidos contiguos presentes en una secuencia de nucleótidos como se muestra en SEQ ID NO: 2, en el que el conjunto de cebadores oligonucleotídicos amplifica una secuencia diana en el gen del ARNr 23S de *H. pylori*.

La presente descripción está dirigida además a un kit para detectar el ADN de *H. pylori* en una muestra de heces, comprendiendo el kit el conjunto de cebadores oligonucleotídicos como se ha descrito anteriormente; y un reactivo para llevar a cabo la amplificación de un ácido nucleico en una reacción de PCR.

Descripción breve de los dibujos

Figura 1. Resultado positivo para *H. pylori* con una sonda de región conservada (JOE) y resultado positivo para la presencia de mutación de resistencia a claritromicina (ROX). Además, el control interno es positivo. La sonda de tipo salvaje (FAM) que detecta el genotipo de susceptibilidad a claritromicina es negativa.

Figura 2. Resultado positivo para *H. pylori* con una sonda de región conservada (JOE) y resultado positivo para la presencia de sonda de tipo salvaje (FAM) excluyendo la mutación de resistencia a claritromicina. Además, el control interno (CY5) es positivo. Las sondas de la mutación de resistencia que detectan resistencia a claritromicina (ROX) son negativas. Véase la Figura 2 para los resultados.

Figura 3. Resultado negativo para *H. pylori*: solo el control interno es positivo, no se detecta inhibición de PCR. Véase la Figura 3 para los resultados.

Descripción detallada de la invención

Tal y como se usa en la presente memoria, una "secuencia diana" presente en una muestra de ácido nucleico es una cadena de ADN de *H. pylori* que se va a cebar y extender por un "cebador". Una secuencia diana puede ser monocatenaria o estar en un dúplex con su secuencia complementaria. En determinadas realizaciones, una secuencia diana puede no estar presente en una muestra de ácido nucleico, pero puede estar presente posteriormente como resultado de la transcripción de otro ácido nucleico presente en dicha muestra de ácido nucleico. Las secuencias diana pueden ser de varias fuentes sobre la base del propósito del ensayo que se está llevando a cabo. La secuencia diana de la presente invención se purifica en algún grado antes de las reacciones de amplificación descritas en la presente memoria.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "oligonucleótido" se refiere a cualquier polímero de dos o más de nucleótidos, nucleósidos, nucleobases o compuestos relacionados usados como un reactivo en los métodos de amplificación del ADN de la presente invención. El oligonucleótido puede ser ADN y/o ARN y/o análogos de estos. El término oligonucleótido no indica ninguna función particular para el reactivo; en lugar de esto, se usa genéricamente para abarcar todos estos reactivos descritos en la presente memoria. Los oligonucleótidos específicos de la presente invención se describen con más detalle más adelante. Tal y como se usa en la presente memoria, un oligonucleótido puede tener prácticamente cualquier longitud, limitada solo por su función específica en la reacción de amplificación del ADN. Los oligonucleótidos con una secuencia y estructura química definida pueden producirse por técnicas conocidas para los expertos en la técnica, tales como síntesis química o bioquímica, y por la expresión in vitro o in vivo de moléculas de ácido nucleico recombinantes, p. ej., vectores bacterianos o virales. Los oligonucleótidos pueden modificarse de cualquier manera, siempre que una modificación dada sea compatible con la función deseada de un oligonucleótido dado. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente si una modificación dada es adecuada o deseada para cualquier oligonucleótido dado de la presente invención. Las modificaciones incluyen, pero no están limitadas a, modificaciones de bases, modificaciones de azúcares o modificaciones de la estructura central. Aunque el diseño y secuencia de los oligonucleótidos para la presente invención dependen de su función como se describe más adelante, generalmente deben tenerse en cuenta varias variables. Entre las más críticas están: la longitud, contenido de G/C, temperatura de fusión (T_m), energía libre de Gibb (G), especificidad, auto-complementariedad y complementariedad con otros oligonucleótidos en el sistema, cadenas de polipirimidina (T, C) o polipurina (A, G) y la secuencia del extremo 3'. El control de estas y otras variables es un aspecto estándar y muy conocido del diseño de oligonucleótidos y están fácilmente disponibles varios programas informáticos para cribar grandes números de oligonucleótidos potenciales para encontrar los óptimos.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "amplificar por PCR" o "amplificación por PCR" se refiere generalmente a la amplificación exponencial cíclica mediada por polimerasa de ácidos nucleicos empleando cebadores que hibridan con cadenas complementarias, como se describe, por ejemplo, en Innis et al, PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press (1990). Se han desarrollado dispositivos que pueden realizar reacciones de ciclado térmico con composiciones que contienen indicadores fluorescentes que son capaces de emitir un haz de luz de una longitud de onda específica, leer la intensidad del marcador fluorescente y presentar la intensidad de la fluorescencia después de cada ciclo. El producto de la amplificación contiene una secuencia que tiene una identidad de secuencia con una secuencia de ácido nucleico diana o su complemento y puede detectarse, por ejemplo, con un marcador intercalante o una sonda de detección que tiene especificidad para una región de la secuencia de ácido nucleico diana o su complemento. La reacción de PCR de la presente invención se realiza preferiblemente como un ensayo de PCR en tiempo real. Tal y como se usa en la presente memoria, el

término "sonda" se refiere a cualquiera de una variedad de moléculas de señalización indicativas de la amplificación. Por ejemplo, SYBR® Green y otros marcadores que se unen al ADN son sondas detectoras. Algunas sondas detectoras pueden estar basadas en secuencia, por ejemplo, sondas de 5' nucleasa. En la técnica se conocen varias sondas detectoras, por ejemplo, sondas TaqMan® (Véase la Patente U.S. No. 5.538.848). La temperatura de fusión, T_m, de las sondas puede incrementarse por la adición de nucleótidos modificados. La cantidad de nucleótidos modificados en una sonda es 1, 2, 3, 4 o más. El nucleótido modificado puede ser un nucleótido LNA (Exiqon A/S), ligante del surco menor (MGB™), SuperBase o Ácido Nucleico Peptídico (PNA) o cualquier otra modificación que incremente la T_m de la sonda.

El ADN de *H. pylori* está presente solo en un nivel bajo en las heces, ya que *H. pylori* es un patógeno del tracto intestinal superior. Por lo tanto, la elección correcta de cebadores altamente específicos y sensibles tiene una importancia crucial con el fin de obtener resultados exactos de un ensayo basado en PCR usando un molde de ADN aislado de una muestra de heces. La presente invención proporciona un método y un conjunto de cebadores oligonucleotídicos para amplificar al menos una secuencia diana del gen de ARNr 23S de *H. pylori*. El ensayo desarrollado puede detectar infección por *H. pylori* con alta sensibilidad y evaluar simultáneamente la resistencia a claritromicina. El efecto de la invención está relacionado particularmente con la elección de los sitios diana para los cebadores exteriores, es decir, las SEQ ID NOS: 1 y 2.

De acuerdo con esto, la presente descripción está dirigida a un método para detectar ADN de *H. pylori* en una muestra de heces, comprendiendo el método las etapas de:

a) realizar una reacción de PCR que comprende ADN aislado de una muestra de heces como un molde y un conjunto de cebadores oligonucleotídicos específico para amplificar una secuencia diana específica de *H. pylori* en un gen de ARNr 23S de *H. pylori* en una reacción de amplificación, en el que el conjunto de cebadores oligonucleotídicos comprende un oligonucleótido que consiste en al menos 10 nucleótidos contiguos presentes en una secuencia de nucleótidos como se muestra en SEQ ID NO: 1 y un oligonucleótido que consiste en al menos 10 nucleótidos contiguos presentes en una secuencia de nucleótidos como se muestra en SEQ ID NO: 2; y

b) detectar el ADN de *H. pylori* en dicha muestra de heces cuando se amplifica la secuencia diana específica de *H. pylori* en la etapa a).

Como la PCR anidada generalmente incrementa la sensibilidad, dicha reacción de PCR es preferiblemente una reacción de PCR anidada. De acuerdo con esto, puede usarse un segundo conjunto de cebadores oligonucleotídicos en dicha reacción de PCR que comprende un oligonucleótido que consiste en al menos 10 nucleótidos contiguos presentes en una secuencia de nucleótidos como se muestra en SEQ ID NO: 3 y un oligonucleótido que consiste en al menos 10 nucleótidos contiguos presentes en una secuencia de nucleótidos como se muestra en SEQ ID NO: 4. Dicho segundo conjunto de cebadores oligonucleotídicos está dirigido a la amplificación de sitios de mutaciones puntuales asociadas con la resistencia a claritromicina de determinadas cepas de *H. pylori*. El método también está dirigido además a la detección de las mutaciones en el gen de ARNr 23S de *H. pylori* asociadas con la resistencia a claritromicina en *H. pylori*. La presencia de dichas mutaciones puede detectarse con una sonda o sondas que detectan la presencia de mutaciones en dicho gen, preferiblemente en las posiciones correspondientes a las posiciones 2514 y/o 2512 de SEQ ID NO: 13 (GenBank: U27270.1). Preferiblemente, dichas mutaciones se detectan con una sonda que consiste en al menos 10 nucleótidos contiguos presentes en una secuencia de nucleótidos como se muestra en SEQ ID NO: 7 y/o una sonda que consiste en al menos 10 nucleótidos contiguos presentes en una secuencia de nucleótidos como se muestra en SEQ ID NO: 8. Además, para la detección de dichas mutaciones puede usarse una sonda o sondas que consisten en al menos 10 nucleótidos contiguos presentes en una secuencia de nucleótidos como se muestra en SEQ ID NO: 5 y/o 6 o que comprenden o que consisten en la secuencia como se muestra en SEQ ID NO: 5 y/o 6.

Una de las realizaciones más preferidas es realizar las etapas a) y b) del método en un único recipiente (p. ej., como se describe por Strauss et al., 2000). Esta estrategia disminuye el riesgo de contaminación. Para conseguir este objetivo, las temperaturas de fusión del primer y segundo conjunto de cebadores oligonucleotídicos deben diseñarse de manera que la diferencia de temperatura entre los conjuntos sea al menos 3 grados centígrados, preferiblemente 3,5 o 4 grados centígrados.

La secuencia diana en el gen de ARNr 23S de *H. pylori* para el primer conjunto de cebadores oligonucleotídicos que consiste en SEQ ID NOS: 1 y 2 corresponde a las posiciones 1937-2793 de SEQ ID NO: 13.

La secuencia diana en el gen de ARNr 23S de *H. pylori* para el segundo conjunto de cebadores oligonucleotídicos que consiste en SEQ ID NOS: 3 y 4 corresponde a las posiciones 2482-2624 de SEQ ID NO: 13.

Preferiblemente, la detección del ADN de *H. pylori* en la muestra de heces cuando se amplifica la secuencia diana específica de *H. pylori* se realiza usando un chip de ADN, electroforesis en gel, una medición de radiación, una medición de fluorescencia o una medición de fosforescencia. Un experto en la técnica puede usar los cebadores y sondas de la descripción también en otros métodos y plataformas que utilizan PCR.

La presente descripción también proporciona un conjunto de cebadores oligonucleotídicos que comprende un oligonucleótido que consiste en al menos 10 nucleótidos contiguos presentes en una secuencia de nucleótidos como

se muestra en SEQ ID NO: 1 y un oligonucleótido que consiste en al menos 10 nucleótidos contiguos presentes en una secuencia de nucleótidos como se muestra en SEQ ID NO: 2, en el que el conjunto de cebadores oligonucleotídicos amplifica una secuencia diana en un gen de ARNr 23S de *H. pylori*. Preferiblemente, el conjunto de cebadores oligonucleotídicos comprende o consiste en la secuencia de nucleótidos como se muestra en SEQ ID NO: 1 y la secuencia de nucleótidos como se muestra en SEQ ID NO: 2.

Preferiblemente, el conjunto de cebadores oligonucleotídicos comprende además un oligonucleótido que consiste en al menos 10 nucleótidos contiguos presentes en una secuencia de nucleótidos como se muestra en SEQ ID NO: 3 y un oligonucleótido que consiste en al menos 10 nucleótidos contiguos presentes en una secuencia de nucleótidos como se muestra en SEQ ID NO: 4. Más preferiblemente, dicho conjunto de cebadores oligonucleotídicos comprende o consiste en la secuencia de nucleótidos como se muestra en SEQ ID NO: 3 y la secuencia de nucleótidos como se muestra en SEQ ID NO: 4.

El conjunto de cebadores oligonucleotídicos puede comprender además una sonda que consiste en al menos 10 nucleótidos contiguos presentes en una secuencia de nucleótidos como se muestra en SEQ ID NO: 7 y/o una sonda que consiste en al menos 10 nucleótidos contiguos presentes en una secuencia de nucleótidos como se muestra en SEQ ID NO: 8. Más preferiblemente, dicho conjunto de cebadores oligonucleotídicos comprende o consiste en la secuencia de nucleótidos como se muestra en SEQ ID NO: 7 y la secuencia de nucleótidos como se muestra en SEQ ID NO: 8. Lo más preferiblemente, dicho conjunto de cebadores oligonucleotídicos comprende o consiste además en la secuencia de nucleótidos como se muestra en SEQ ID NO: 5 y la secuencia de nucleótidos como se muestra en SEQ ID NO: 6.

La presente descripción también proporciona un kit para detectar ADN de *H. pylori* en una muestra de heces, comprendiendo el kit al menos uno de los conjuntos de cebadores oligonucleotídicos como se ha descrito anteriormente; y un reactivo para realizar la amplificación de un ácido nucleico en una reacción de PCR. Preferiblemente, dicho reactivo se selecciona de un grupo que consiste en ADN polimerasa, dNTP y un tampón.

Sección experimental

El objetivo en la fase de diseño fue desarrollar una PCR altamente específica de *H. pylori* que no amplificaría otras especies muy relacionadas. El nuevo ensayo se desarrolla y optimiza usando cepas de *H. pylori* con secuenciación confirmada con y sin mutaciones de resistencia a claritromicina. Después, se ensayó la especificidad analítica frente a 50 especies bacterianas patogénicas y no patogénicas clínicamente relevantes, incluyendo tanto especies gram-negativas como gram-positivas. No se detectó una reactividad cruzada significativa. La sensibilidad analítica con un 95 % de confianza para réplicas positivas fue 10fg, lo que corresponde a dos copias genómicas o una bacteria. La sensibilidad y especificidad clínicas se analizaron usando biopsia gástrica, histología y cultivo de *Helicobacter* con ensayo de susceptibilidad antimicrobiana como un método de referencia estándar de oro. La identificación correcta se consiguió en el 94 % de las muestras y una susceptibilidad antimicrobiana correcta en el 90 % de un total de 80 muestras de pacientes estudiadas. Como un control, se usó un molde del gen *Ory* de flor terminal de *Oryza sativa*.

Extracción de ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos totales se extrajeron usando Kits bioMerieux NucliSens y el instrumento semiautomatizado easyMAG para la extracción. Se ensayó con éxito el protocolo B tanto genético como específico. El protocolo B específico fue ligeramente mejor en el rendimiento de la qPCR y se seleccionó para todos los experimentos. El contenido de un asa de inoculación de heces, aprox. disolución al 10 %, se inoculó en 2mL del tampón de lisis del kit, se mezcló vigorosamente durante 5s y se incubó al menos 15min a temperatura ambiente según las instrucciones del fabricante. El volumen de la extracción fue 25µl.

Configuración de la PCR y oligonucleótidos

El siguiente programa de PCR y conjunto de oligonucleótidos se utilizaron para todos los ensayos realizados con MxPro 3005P de Stratagene:

1. 95 °C 13min
2. 94 °C 60
3. 68 °C 90s
4. 2-3 x5 ciclos
5. 94 °C 30s
6. 68 °C 60s
7. 2-3 x 15 ciclos
8. 94 °C 25 s

ES 2 664 335 T3

9. 64 °C 25 s

10. 8-9 x40

Cebadores

Cebadores externos:

5 Hpy_sel_003_ F GCTAGTCTAAGGCGTAGATTGGAGGGAAG (SEQ ID NO: 1)

Hpy_sel_003_ R GCTTGTGCCATTACACTCAACTTGCGATTC (SEQ ID NO:2)

Cebadores internos:

F_Hpyin_06 GGTGAAAATTCCTCCTACC (SEQ ID NO:3)

R_Hpyin_06 CAAGGATGGCTCCATAAG (SEQ ID NO:4)

10 Control:

F_ORY_004 CTAATCCCAGCAACCCAACC (SEQ ID NO: 9)

R_ORY_004 CTAATCAATGTGAGACATATGATAGAAATC (SEQ ID NO: 10)

Sondas

P_Hpy2142wt_02_FAM CAAGACGGAAAGACCC (SEQ ID NO:5)

15 P_Hpyall_02_JOE CAAAGCCTCCCACCTATCCTGCG (SEQ ID NO:6)

P_Hpy2143G_06_TEX CAAGACGGAGAGACCC (SEQ ID NO:7)

P_Hpy2142GG_05_TEX CAAGACGGGAAGACCC (SEQ ID NO:8)

P_Ory_4_Cy5 CCTGCACTGGTAAGCTATG (SEQ ID NO: 11)

20 Los nucleótidos subrayados en la lista anterior son nucleótidos LNA (Exiqon A/S) que incrementan la Tm de la sonda.

Molde Ory sintético

TGCTCCTAATCCCAGCAACCCAACCTTGAGGGAATACCTGCACTGGTAAGCTA
TGCTCTTGCAATTGTTGTGATTTCTATCATATGTCTCACATTGATTAGTGATCTA

(SEQ ID NO: 12)

25 Mezcla de la reacción

dH20 2,85 µl

Mezcla maestra Qiagen NoRox 12,5 µl

Hpy_sel_003_ F 0,125µM 0,15 µl

Hpy_sel_003_ R 0,125µM 0,15 µl

30 F_Hpyin_06 0,8µM 1 µl

R_Hpyin_06 0,8µM 1 µl

F_ORY_004 0,125µM 0,15 µl

R_ORY_004 0,125µM 0,15 µl

P_Hpy2142wt_02_

35 FAM 0,2µM 0,25 µl

P_Hpyall_02_JOE 0,28µM 0,35 µl

P_Hpy2143G_06_TEX 0,28µM 0,35 µl

P_Hpy2142GG_05_TEX 0,28µM 0,35 µl

P_Ory_4_Cy5	0,2µM	0,25 µl
Molde Ory sintético	10exp-11	0,5 µl
Molde		5 µl
Premezcla total		25 µl

5 Después de la desnaturalización y activación de la polimerasa inicial, se utilizaron 5 ciclos de tiempo de extensión larga para mejorar la eficacia de la amplificación de ADN genómico menos óptimo. Después de generar las pocas copias iniciales, la fase de amplificación específica larga se continuó 15 ciclos más, pero no más para maximizar la eficacia de la amplificación en las siguientes etapas (es decir, 8.-10.). Sorprendentemente, una primera fase más larga de 20 (5+15) ciclos disminuyó la sensibilidad y causó un riesgo para una amplificación demasiado temprana en la fase de la detección de la mutación de resistencia a claritromicina dando lugar a mayores problemas con el análisis de los datos. La temperatura de la hibridación se optimizó con cuidado de manera similar para todas las sondas que son capaces de detectar una mutación de un único nucleótido. Fue difícil diseñar sondas con alta sensibilidad debido a un requerimiento de temperatura de fusión bastante baja, que fue necesario para evitar la unión posible no pretendida de la sonda en la fase temprana de amplificación específica a alta temperatura.

15 **Ejemplo 1.**

Resultado positivo para *H. pylori* con una sonda de la región conservada (JOE) y resultado positivo para la presencia de mutación de resistencia a claritromicina (ROX). Además, el control interno es positivo. La sonda de tipo salvaje (FAM) que detecta susceptibilidad a claritromicina es negativa. Véase la Figura 1 para los resultados.

20 FAM (verde): genotipo de tipo salvaje en el punto caliente de la mutación de claritromicina. Cuando es positivo, no está presente ninguna mutación de resistencia. El tratamiento con una combinación basada en claritromicina es probablemente exitoso.

JOE (amarillo): región altamente conservada en la cadena retrasada, indica la presencia de *H. pylori* en la muestra independientemente de que estén presentes mutaciones de resistencia.

25 ¡Nota! Si aparece una nueva o una doble mutación, el JOE es la única sonda positiva además del control interno= el genotipo resistente a claritromicina está presente.

ROX (rojo): una mutación en la posición A2142G o A2143G ligada a resistencia a claritromicina. Se detectan los tipos más comunes.

CY5 (rojo lejano): control de inhibición.

Ejemplo 2.

30 Resultado positivo para *H. pylori* con una sonda de región conservada (JOE) y resultado positivo para la presencia de sonda de tipo salvaje (FAM) excluyendo la mutación de resistencia a claritromicina. Además, el control interno (CY5) es positivo. Las sondas de la mutación de resistencia que detectan resistencia a claritromicina (ROX) son negativas. Véase la Figura 2 para los resultados.

Ejemplo 3.

35 Resultado negativo para *H. pylori*: solo es positivo el control interno, no se detecta inhibición de PCR. Véase la Figura 3 para los resultados.

REFERENCIAS

- Booka et al, 2005, *Helicobacter*, 10:205-213
- Burucoa et al, 1999, *Journal Of Clinical Microbiology*, 37(12):4071-4080
- Chey y Wong, 2007, *Am J Gastroenterol*, 102: 1808-1825
- 5 Dewhirst et al, 2005, *Journal Of Bacteriology*, 187(17):6106-6118
- Falsafi et al, 2009, *World J Gastroenterol*, 15(4): 484-488
- Fischbach y Evans, 2007, *Aliment Pharmacol Ther* 2007;26:343e57
- Fontana et al.,2003, *Journal Of Clinical Microbiology*, 41(8):3636-3640
- Ford et al., 2003, *The Cochrane Database of Systematic Reviews* 2003, Número 4.
- 10 Ford et al., 2004, *Am J Gastroenterol*, 99: 1833-1855
- Khan et al., 2004, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(9):3567-3569
- Kosunen et al., 2011, *Int. J. Cancer*: 128:433-439
- Lottspeich, 2007, *Journal Of Clinical Microbiology*, 45(6): 1718-1722
- Maeda et al., 1998, *Gut*, 43:317-321
- 15 Makristathis et al., 1998, *Journal Of Clinical Microbiology*, 36(9):2772-2774
- Malferteiner et al., 2012, *Gut* 61:646e664
- Mishra et al, 2008, *J Infect Developing Countries*. 2(3): 206-210
- Monteiro et al., 2001, *Journal of Microbiological Methods*. 45:89-94
- Noguchi et al., 2007, *Journal of Medical Microbiology*, 56, 1174-1180
- 20 Rimbara et al., 2005, *Current Microbiology*, 51: 1-5
- Scaletsky et al.,2011, *Helicobacter*, 16: 311-315
- Schabereiter-Gurtner et al., 2004, *Journal Of Clinical Microbiology*, 42(10):4512-4518
- Singh et al., 2008, *Helicobacter*, 13(1): 30-34
- Strauss et al., 2000, *Diagnostic Molecular Pathology* 9(3): 151-157, 2000

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Amplidiag Oy

<120> Método para detectar ADN de Helicobacter pylori en una muestra de heces

5 <130> 52442

<150> FI 20126271

<151> 05-12-2012

10 <160> 13

<170> PatentIn version 3.1

15 <210> 1
<211> 30
<212> ADN
<213> Helicobacter pylori

20 <400> 1
gctagtctaa gggcgtagat tggaggaag 30

<210> 2
<211> 31

25 <212> ADN
<213> Helicobacter pylori

<400> 2
gctgtgcca ttactcaa cttgcgatt c 31

30 <210> 3
<211> 19
<212> ADN
<213> Helicobacter pylori

35 <400> 3
ggtgaaaatt cctctacc 19

<210> 4

40 <211> 18
<212> ADN
<213> Helicobacter pylori

<400> 4

45 caaggatggc tccataag 18

<210> 5
<211> 16
<212> ADN

50 <213> Helicobacter pylori

<400> 5
caagacggaa agaccc 16

55 <210> 6
<211> 23
<212> ADN
<213> Helicobacter pylori

60 <400> 6
caaagcctcc cacctatcct gcg 23

<210> 7
<211> 16

ES 2 664 335 T3

<212> ADN
 <213> Helicobacter pylori

 <400> 7
 5 caagacggag agaccc 16

 <210> 8
 <211> 16
 <212> ADN
 10 <213> Helicobacter pylori

 <400> 8
 caagacggga agaccc 16

 15 <210> 9
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Oryza sativa

 20 <400> 9
 ctaatcccag caaccaacc 20

 <210> 10
 <211> 30
 25 <212> ADN
 <213> Oryza sativa

 <400> 10
 30 ctaatcaatg tgagacatat gatagaaatc 30

 <210> 11
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Oryza sativa
 35
 <400> 11
 cctgcactgg taagctatg 19

 <210> 12
 <211> 108
 <212> ADN
 <213> Oryza sativa

 <400> 12
 tgctcctaat cccagcaacc caaccttgag ggaatacctg cactggtaag ctatgctctt 60

 45 gcaattggtg tgatttctat catatgtctc acattgatta gtgatcta 108

 <210> 13
 <211> 3857
 <212> ADN
 50 <213> Helicobacter pylori

 <400> 13

ES 2 664 335 T3

aaagcttcat ccaccccccc catcccatca tttccaatca cttttatcca tttctttcaa 60
 acccaaaaac ttaagcaaa cttaagcat gtctataatt acatttcggt ttaaagacaa 120
 gctttaaaag tctttaattg aaccactcaa acaagttcta caagctaaag ctttaaataa 180
 aaccaccag ctggtaaaac ttgagtgtta taaaaagatt agggatcaag catttttagt 240
 cttctttaag ggtttaacat taagagtgat tatagcaagt ttttaaagaa aaacgaagtt 300
 atttgattta acattgtaa tagcctatgt aaaagtaaag taaaactaca ataactctgt 360
 cttatattca ttaaggcagt ggtagcgtg aagaatgttc gtgcaattgt cgttattcat 420
 tataaaaggg cgggttttaa aggatatttt aaaatttaa acaagctttt aagagcagat 480
 ggcggatgcc ttgccaaaga gaggcgatga aggacgtact agactgcat aagctatgag 540
 gagctgtcaa ggagctttga tgcgtagatg tccgaatggg gcaaccaac taatagagat 600
 attagttact ctaacagaga gcgaacctag tgaagtgaaa catctcagta actagaggaa 660
 aagaaatcaa cgagattccc taagtagtgg cgagcgaacg gggaaaaggg caaaccgagt 720
 gcttgcatc ggggttgagg actgcaacat ccaagagaac gctttagcag agttacctgg 780
 aaaggtaac catagaaagt gatagccttg tatgcgacaa ggcgttttta ggtagcagta 840
 tccagagtag gccaggacac gaggaatcca ggttgaagcc ggggagacca ctctccaact 900
 ctaaatacta ctctttgagc gatagcgaac aagtaccgtg agggaaaggt gaaaagaacc 960
 gcagtgagcg gagtgaata gaacctgaaa ccatctgctt acaatcattc agagccctat 1020
 gatttatcag ggtgatggac tgccttttgc ataatgatcc tgcgagttgt ggtatctggc 1080
 aaggttaagc gaatgcgaag ccgtagcga aacgagttctt aatagggcga acaagtcaga 1140
 tgctgcagac ccgaagctaa gtgatctatc catggccaag ttgaaacgag tgtaaatagcg 1200
 cgtggaggac tgaactccta ccattgaaa cgggttggga tgagctgtgg ataggggtga 1260
 aaggccaaac aaacttagtg atagctggtt ctcttcgaaa tatatttagg tatagcctca 1320
 agtgataata aaaggggta gagcgtgat tgggctaggg ctgctcgccg cggtagcaaa 1380
 ccctatcaaa cttcgaatac cttttatcgt atcttgggag tcaggcgggt ggtgataaaa 1440
 tcaatcgtca aaaggggaac aaccagact accaaataag gtccctaagt tctattctga 1500
 gtggaaaaag atgtgtggct actaaaacaa ccaggaggtt ggcttagaag cagccatcct 1560
 ttaaagaaag cgtaacagct cactggtcta gtggctatgc gctgaaaata taacggggct 1620
 aagatagaca ccgaatttgt agattgtgtt aaacacagtg gtagaagagc gttcatacca 1680
 gcggtgaagg tataccggtg aggagtgtg gagcgggatg aagtgagcat gcaggaatga 1740

ES 2 664 335 T3

gtaacgataa gatatatgag aattgtatcc gccgtaaate taaggtttcc tacgcgatgg 1800
 tcgtcatcgt agggtagtc gggcctaag ccgagtcga aagggtagg tgatggcaaa 1860
 ttggtaata ttccaatacc gactgtggag cgtgatgggg ggacgcatag ggtaagcga 1920
 gctagctgat ggaagcgcta gtctaagggc gtagattgga ggaagcaa atccacctct 1980
 gtatttgaaa cccaacagg ctctttgagt ctttttagga caaaggaga atcgctgata 2040
 ccgtcgtgcc aagaaaagcc tctaagcata tccatagtcg tccgtaccgc aaaccgacac 2100
 aggtagatga gatgagtatt ctaaggcgcg tgaaagaact ctggtaagg aactctgcaa 2160
 actagcaccg taagttcgcg ataaggtgtg ccacagcgcg gtggtctcag caaagagtc 2220
 ctcccgactg tttaccaaaa acacagcact ttgccaactc gtaagaggaa gtataaggtg 2280
 tgacgcctgc ccggtgctcg aaggtaaga ggatgcgtca gtcgcaagat gaagcgttga 2340
 attgaagccc gagtaaaccg cggccgtaac tataacggtc ctaaggtagc gaaattcctt 2400
 gtcggtaaaa taccgacctg catgaatggc gtaacgagat gggagctgtc tcaaccagag 2460
 attcagtga attgtagtgg aggtgaaat tcctcctacc cgcggcaaga cggaaagacc 2520
 ccgtggacct ttactacaac ttagcactgc taatgggaat atcatgcgca ggataggtgg 2580
 gaggcttga agtaagggtc ttggctctta tggagtcac cttgagatac cacccttgat 2640
 gtttctgtta gctaactggc ctgtgttatc cacaggcagg acaatgcttg gtggtagtt 2700
 tgactggggc ggtcgtcct aaaaagtaac ggaggcttc aaaggttggc tcattgcggt 2760
 tggaaatcgc aagttgagtg taatggcaca agccagcctg actgtaagac atacaagtca 2820
 agcagagacg aaagtgggtc atagtgatcc ggtggttctg tgtggaaggg ccatcgctca 2880
 aaggataaaa ggtaccccg ggataacagg ctgatctccc ccaagagctc acatcgacgg 2940
 ggaggtttg cacctcgatg tcggctcatc gcatcctggg gctggagcag gtcccaaggg 3000
 tatggctgtt cgccatttaa agcggtagc gagctgggtt cagaacgtcg tgagacagtt 3060
 cggccctat ctgcccggg cgtaggaaag ttgaggagag ctgtccctag tacgagagga 3120
 ccgggatgga cgtgtcactg gtgcaccagt tgtctgcaa gagcatcgtc gggtagcaca 3180
 cacggatgtg ataactgctg aaagcatcta agcaggaacc aactccaaga taaactttcc 3240
 ctgaagctcg cacaaagact atgtgcttga taggtagat gtgtgagcgc agtaatgcgt 3300
 ttagctgact actactaata gagcgtttgg cttgtttttt gctttttgat aagataacgg 3360
 caataagcgc gaatgggtta cactgcctt actgagtgtg agagagttgg agttttatga 3420
 agacttttat aagattaaac ttaatgagg aatgagatac catctcaatg gtttaagtt 3480
 aaaggctatt aacgatcttc tttgttaaaa acagctcccc tataaagaga aaggggagtt 3540
 aagggtaat gcgtttttat ctttagctcc cttttccttg tgcctttaga gaagaggaac 3600
 taccagtta accattccga acctggaagt caagctcttc atcgctgata atactgctct 3660

ES 2 664 335 T3

tttcaagagt gggaatgtag gtcggtgcag ggatagggaa atgttttttt agtcttgctt	3720
ttttatttga tttcattatt gactcattgt tttgtttggt taggtggttt attggggttt	3780
ggttgttttg ttgatttagt tttcatgctc taaaccgatg aaaggttggt tgaagtcttc	3840
tctgttcata aacttgc	3857

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar ADN de *Helicobacter pylori* en una muestra de heces, comprendiendo el método:

5 a) realizar una reacción de PCR anidada que comprende ADN aislado de una muestra de heces como un molde y un primer y segundo conjunto de cebadores oligonucleotídicos específicos para amplificar secuencias diana específicas de *H. pylori* en un gen de ARNr 23S de *H. pylori* en una reacción de amplificación,

10 en el que el primer conjunto de cebadores oligonucleotídicos comprende un cebador oligonucleotídico que comprende la secuencia de nucleótidos como se muestra en SEQ ID NO: 1 o que consiste en al menos 10 nucleótidos contiguos presentes en la secuencia de nucleótidos como se muestra en SEQ ID NO: 1 y un cebador oligonucleotídico que comprende la secuencia de nucleótidos como se muestra en SEQ ID NO: 2 o que consiste en al menos 10 nucleótidos contiguos presentes en la secuencia de nucleótidos como se muestra en SEQ ID NO: 2,

15 en el que el segundo conjunto de cebadores oligonucleotídicos comprende un cebador oligonucleotídico que comprende la secuencia de nucleótidos como se muestra en SEQ ID NO: 3 o que consiste en al menos 10 nucleótidos contiguos presentes en la secuencia de nucleótidos como se muestra en SEQ ID NO: 3 y un cebador oligonucleotídico que comprende la secuencia de nucleótidos como se muestra en SEQ ID NO: 4 o que consiste en al menos 10 nucleótidos contiguos presentes en la secuencia de nucleótidos como se muestra en SEQ ID NO:4,

20 en el que la secuencia diana específica de *H. pylori* del primer conjunto de cebadores oligonucleotídicos es una región de nucleótidos de un gen de ARNr 23S de *H. pylori* que corresponde a las posiciones 1937-2793 de SEQ ID NO: 13 y al menos parte de dicha región de nucleótidos se amplifica en la reacción de PCR por el primer conjunto de cebadores oligonucleotídicos, y

25 en el que la secuencia diana específica de *H. pylori* del segundo conjunto de cebadores oligonucleotídicos es una región de nucleótidos de un gen de ARNr 23S de *H. pylori* que corresponde a las posiciones 2482-2624 de SEQ ID NO: 13 y al menos parte de dicha región de nucleótidos se amplifica en la reacción de PCR por el segundo conjunto de cebadores oligonucleotídicos

b) detectar ADN de *H. pylori* en dicha muestra de heces cuando se amplifican las secuencias diana específicas de *H. pylori*.

30 2. El método según la reivindicación 1, en el que las mutaciones en el gen de ARNr 23S de *H. pylori* asociadas con resistencia a claritromicina en *H. pylori* se detectan además por una primera sonda que consiste en al menos 10 nucleótidos contiguos presentes en una secuencia de nucleótidos como se muestra en SEQ ID NO: 7 y una segunda sonda que consiste en al menos 10 nucleótidos contiguos presentes en una secuencia de nucleótidos como se muestra en SEQ ID NO: 8 o en el que dicha primera sonda comprende la secuencia de nucleótidos como se muestra en SEQ ID NO: 7 y dicha segunda sonda comprende la secuencia de nucleótidos como se muestra en SEQ ID NO: 8.

35 3. El método según la reivindicación 1 o 2, en el que la detección del ADN de *H. pylori* en la muestra de heces cuando se amplifican las secuencias diana específicas de *H. pylori* se realiza usando un chip de ADN, electroforesis en gel, una medición de radiación, una medición de fluorescencia o una medición de fosforescencia.

40 4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que las etapas a) y b) se realizan en un único recipiente.

5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho método se realiza como un ensayo de PCR en tiempo real.

45 6. Un conjunto de cebadores oligonucleotídicos que comprende un oligonucleótido que consiste en al menos 10 nucleótidos contiguos presentes en una secuencia de nucleótidos como se muestra en SEQ ID NO: 1 o que comprende la secuencia de nucleótidos como se muestra en SEQ ID NO: 1, un oligonucleótido que consiste en al menos 10 nucleótidos contiguos presentes en una secuencia de nucleótidos como se muestra en SEQ ID NO: 2 o que comprende la secuencia de nucleótidos como se muestra en SEQ ID NO: 2, un oligonucleótido que consiste en al menos 10 nucleótidos contiguos presentes en una secuencia de nucleótidos como se muestra en SEQ ID NO: 3 o que comprende la secuencia de nucleótidos como se muestra en SEQ ID NO: 3 y un oligonucleótido que consiste en al menos 10 nucleótidos contiguos presentes en una secuencia de nucleótidos como se muestra en SEQ ID NO: 4 o que comprende la secuencia de nucleótidos como se muestra en SEQ ID NO: 4, en el que el conjunto de cebadores oligonucleotídicos amplifica una secuencia diana en un gen de ARNr 23S de *H. pylori*.

7. El conjunto de cebadores oligonucleotídicos según la reivindicación 6, que comprende además una sonda que consiste en al menos 10 nucleótidos contiguos presentes en una secuencia de nucleótidos como se muestra en SEQ ID NO: 7 y una sonda que consiste en al menos 10 nucleótidos contiguos presentes en una secuencia de nucleótidos como se muestra en SEQ ID NO: 8.
- 5 8. Un kit para detectar ADN de *H. pylori* en una muestra de heces, comprendiendo el kit: el conjunto de cebadores oligonucleotídicos de la reivindicación 6 o 7; y un reactivo para realizar la amplificación de un ácido nucleico en una reacción de PCR, en el que el reactivo se selecciona del grupo que consiste en: ADN polimerasa, dNTP y un tampón.

Figura 1.

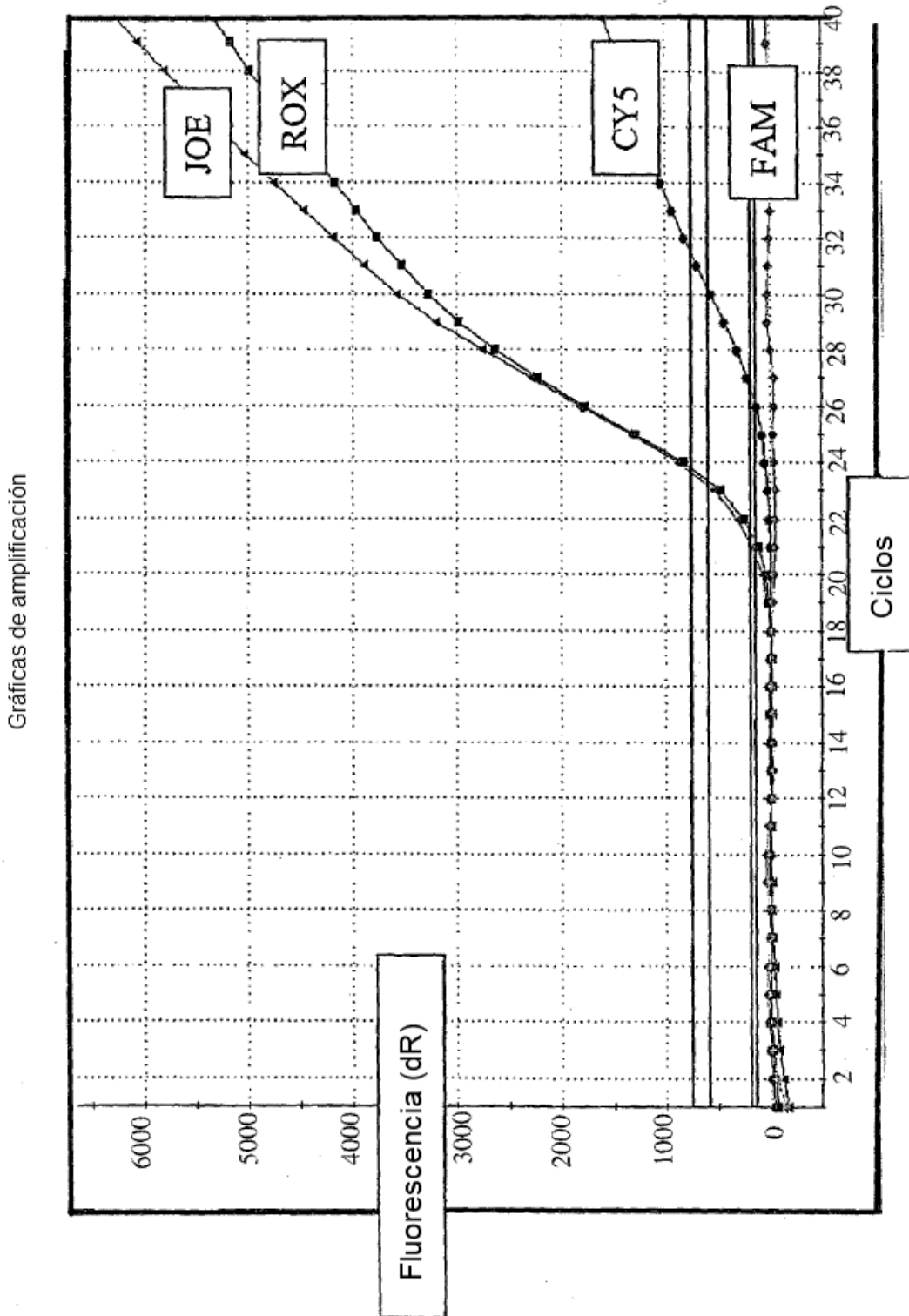


Figura 2.

Gráficas de amplificación

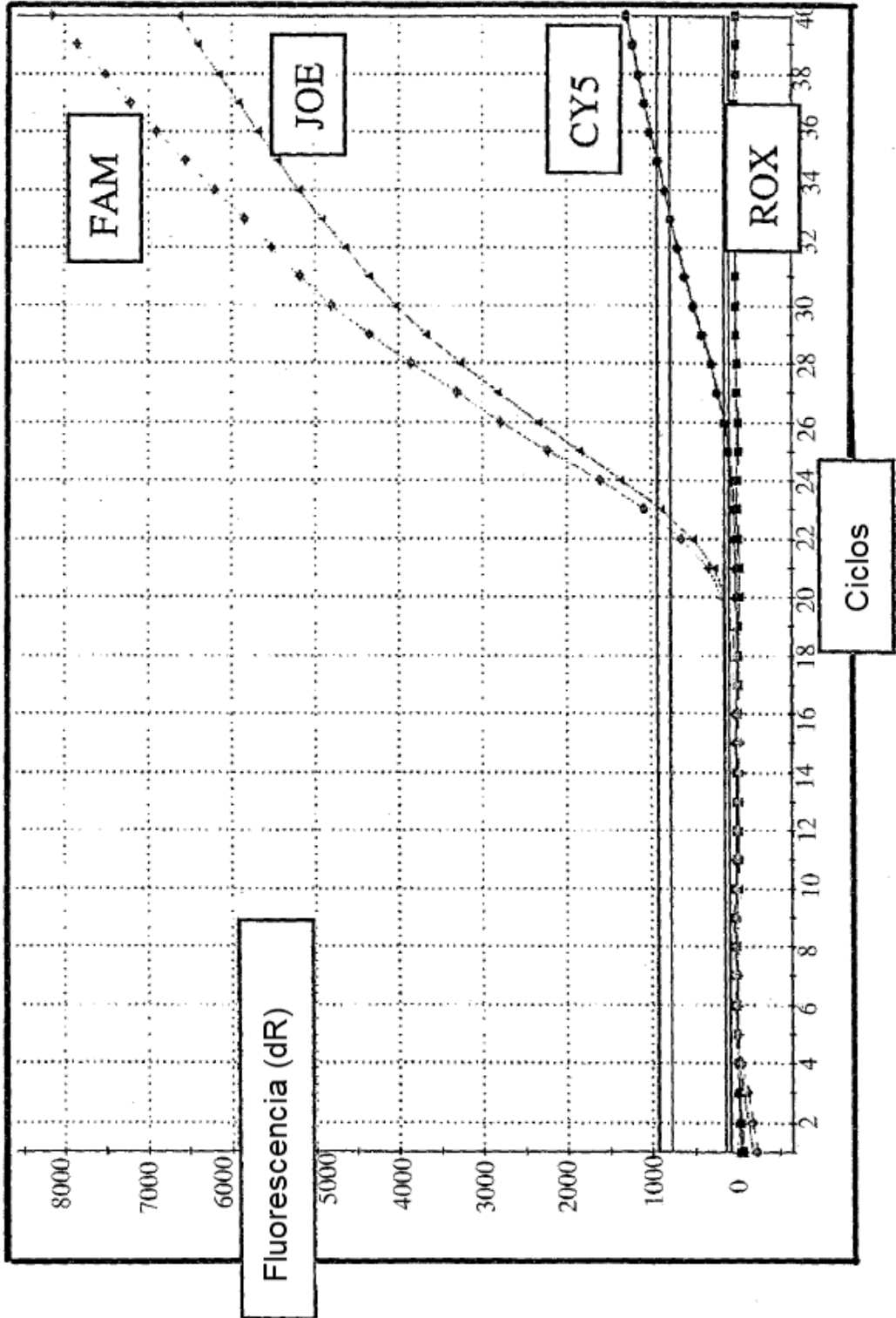


Figura 3.

Gráficas de amplificación

