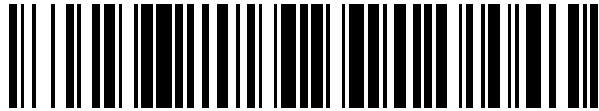


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 694 511**

51 Int. Cl.:

G01N 33/569 (2006.01)

C07K 16/12 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

C12Q 1/68 (2008.01)

G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.12.2010 PCT/JP2010/071652**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.06.2011 WO11068189**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.12.2010 E 10834639 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.08.2018 EP 2508887**

54 Título: **Procedimiento de detección de microorganismos pertenecientes a Mycoplasma pneumoniae y/o Mycoplasma genitalium**

30 Prioridad:

04.12.2009 JP 2009276115

04.02.2010 JP 2010023102

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

21.12.2018

73 Titular/es:

LSI MEDIENCE CORPORATION (100.0%)

**13-4, Uchikanda 1-chome, Chiyoda-ku
Tokyo 101-8517, JP**

72 Inventor/es:

**MINAGAWA ATSUKO;
HIROSHIMA TOYOMASA;
SHIMADA YASUSHI;
SUGIYAMA KAZUYUKI;
MITOBE YUKI y
ITAGAKI HATSUE**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones:

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

ES 2 694 511 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de detección de microorganismos pertenecientes a *Mycoplasma pneumoniae* y/o *Mycoplasma genitalium*

5 La presente divulgación se refiere a un procedimiento y a un kit de reactivos para detectar microorganismos que pertenecen a *Mycoplasma pneumoniae* que es, por lo general, un microorganismo patógeno de la neumonía y/o *Mycoplasma genitalium*, usando una molécula específica para la detección de los microorganismos como un indicador.

(1) Relación de paciente y síntomas de neumonía por *Mycoplasma pneumoniae*

10 Las infecciones por *Mycoplasma pneumoniae* se clasifican como una extrahospitalaria atípica y se dice que la proporción de infecciones por *Mycoplasma pneumoniae* en neumonía extrahospitalaria asciende del 30 al 40 % en adultos hasta incluso del 60 al 70 % cuando los adultos quedan limitados a adultos jóvenes de 15 a 25 años de edad. La vía de infección de *Mycoplasma pneumoniae* es una infección de tracto respiratoria y no resulta extraño que tales infecciones se propaguen en instalaciones tales como escuelas y en familias. Además, en las infecciones por *Mycoplasma pneumoniae*, la neumonía aparece en aproximadamente del 3 al 5 % de las infecciones y el resto es bronquitis, inflamación del tracto respiratorio superior o infección inaparente. Entre los síntomas característicos se incluyen una tos obstinada que no va acompañada de expectoración desde un período temprano de la infección y puede estar a veces acompañada por síntomas tales como fiebre, cefalea, dolor de la faringe, escalofríos o malestar general.

20 Se encontró que cuarenta y siete genes de *M. pneumoniae* se regulaban positivamente después de un choque térmico y entre esos genes se conservaban genes de choque térmico tales como *dnaK*, *lonA* y *clpB* (literatura de no-patente 1). Además, se han identificado fosfoproteínas en *M. pneumoniae* y *M. genitalium* que incluyen deshidrogenasa de piruvato E1 de subunidades alfa y beta, enolasa, proteínas de choque térmico DnaK y GroEL, Factor de elongación Tu, proteína accesoria de citoadherencia HMW3, P65 y varias proteínas hipotéticas (literatura de no-patente 2).

25 (2) Estado actual de detección de infecciones por *Mycoplasma pneumoniae*

El uso de anticuerpo monoclonales para la detección de *M. pneumoniae* en una muestra se describe en la literatura de patente 4. Un ensayo de detección del cultivo a partir de una muestra de hisopo faríngeo en pacientes y un ensayo de detección de anticuerpos usando suero de un paciente son ensayos de detección comunes para infecciones por *Mycoplasma pneumoniae*. Puesto que la *Mycoplasma pneumoniae* crece por se solo en un medio de cultivo especial, el cultivo resulta complicado de ejecutar y es necesario realizar un ensayo de PCR para la identificación final del *Mycoplasma pneumoniae*, la detección de cultivo puede llevarse solo a cabo en instalaciones limitadas y este es un estado actual del ensayo de detección del cultivo. Además, se ha pedido un ensayo de detección para obtener rápidamente los resultados, puesto que se necesitan varias semanas para el cultivo.

35 Por otra parte, puesto que el ensayo de detección de anticuerpos es generalmente fácil en su procedimiento y proporciona resultados más rápidamente en comparación con el ensayo de detección del cultivo, tal ensayo de detección de anticuerpos es un ensayo que se ha usado bien. Pero existen problemas de modo que es complicado determinar si la infección es una previa o una actual debido a que los títulos de anticuerpo IgM de *Mycoplasma* son duraderos y requiere mucho tiempo para aumentar los títulos de anticuerpos. Con el fin de resolver los problemas anteriores, se recomienda el criterio basado en el aclarado de los títulos de anticuerpos entre la fase aguda de la infección y la fase convaleciente de la infección con el tiempo, pero puesto que lleva mucho tiempo realizar un ensayo de anticuerpos hasta la fase convaleciente, la terapia se retrasa, de modo que su retraso puede causar la prolongación y empeoramiento de los síntomas, así como que puede causar el efecto adverso de la expansión de la infección debido a una infección secundaria.

45 Además, con el fin de resolver los problemas anteriores, se han desvelado anticuerpos y procedimiento de detección para detectar específicamente un microorganismo que pertenece a *Mycoplasma pneumoniae*, que son útiles para el diagnóstico de infecciones por *Mycoplasma pneumoniae*.

50 Por ejemplo, la literatura de patente 1 describe un procedimiento de inmunodetección que usa un anticuerpo monoclonal frente a un antígeno de proteína de membrana de *Mycoplasma pneumoniae* de aproximadamente 43 kilodaltons (kDa). Asimismo, la literatura de patente 2 describe que la detección de *Mycoplasma pneumoniae* puede llevarse a cabo con alta precisión usando un anticuerpo frente a una proteína ribosómica L7/L12. Además, la literatura de patente 3 describe que es posible un diagnóstico rápido y específico de infección por *Mycoplasma pneumoniae* usando un anticuerpo monoclonal frente a una proteína P1 de *Mycoplasma pneumoniae*, teniendo el anticuerpo monoclonal una reactividad cruzada de solo el 1 % o inferior a otras especies del género *Mycoplasma* u otras especies patógenas de flora coexistente.

55 Sin embargo, para detectar un microorganismo que pertenece a *Mycoplasma pneumoniae* en especímenes clínicos, el anticuerpo descrito anteriormente y el procedimiento de detección que usa el anticuerpo pueden requerir un tratamiento previo complicado de los especímenes que contienen el microorganismo y tener un problema de modo que son insuficientes para un diagnóstico específico de *Mycoplasma pneumoniae* por aún una baja especificidad y

sensibilidad.

(3) *Mycoplasma genitalium* y enfermedades

Las *Chlamydia trachomatis* se conocen como las bacterias causantes principales de uretritis gonocócica. Sin embargo, la *Chlamydia trachomatis* se detecta en aproximadamente del 30 al 40 % de pacientes con uretritis gonocócica y, en la mayoría de los casos, no está claro de dónde se originan sus síntomas. Además de la *Chlamydia trachomatis*, los microorganismos del género *Mycoplasma* y *Ureaplasma* han llamado la atención y el *Mycoplasma genitalium* en particular se muestra como una de las bacterias causantes de uretritis gonocócica y enfermedades de transmisión sexual.

(4) Estado actual de detección de infecciones por *Mycoplasma genitalium*

10 Informes sobre infecciones de *Mycoplasma genitalium* mediante el procedimiento de cultivo o el procedimiento de PCR se han publicado en estudios, pero puesto que no puede realizarse un rápido diagnóstico mediante estos procedimientos, se ha pedido un procedimiento para detectar rápidamente y específicamente un microorganismo que pertenece al *Mycoplasma genitalium* en especímenes clínicos.

Lista de citas

15 **Literatura de patente**

[Literatura de patente 1] Publicación de patente japonesa sin examinar (Kokai) n.º 63-298
 [Literatura de patente 2] Documento WO2001/057199
 [Literatura de patente 3] Publicación de patente japonesa sin examinar (Kokai) n.º 5-304990
 [Literatura de patente 4] Documento EP 0 537 497 A2

20 [Literatura de no patente 1] Nucleic Acids Research (2003) 31(21): 6306-6320
 [Referencia de no patente 2] BMC Microbiology (2007) 7(63): 1-15

25 De acuerdo con los procedimientos convencionales, los microorganismos que pertenecen al *Mycoplasma pneumoniae* y/o *Mycoplasma genitalium* no podrían detectarse fácilmente y específicamente. Por lo tanto, puesto que no es posible diagnosticar rápidamente las infecciones de *Mycoplasma pneumoniae* y/o *Mycoplasma genitalium*, la terapia se retrasa, y este retraso puede causar la prolongación y empeoramiento de los síntomas, así como el efecto adverso de la expansión de la infección debido a una infección secundaria. Esta es la situación actual. Si las infecciones con estos *Mycoplasmas* pueden detectarse/diagnosticarse rápidamente, se vuelve posible la administración de un antibiótico macrólido eficaz para los *Mycoplasmas* e iniciar el tratamiento correcto en la fase de infección temprana.

30 Además, *Mycoplasma pneumoniae* y *Mycoplasma genitalium* son conocidos por ser serológicamente muy cercanos entre sí, pero puesto que el sitio de infección (tal como tejidos y órganos) del *Mycoplasma pneumoniae* es distinto de del *Mycoplasma genitalium* tal como se ha mencionado anteriormente, es posible identificar una molécula capaz de detectar específicamente los dos microorganismos, se consideró que el diagnóstico de ambas enfermedades infecciosas se vuelve posible usando la molécula como indicador.

35 Se ha realizado la presente divulgación en vista de los problemas. El objeto de la presente divulgación es especificar una molécula para diagnosticar rápida y específicamente las infecciones por *Mycoplasma pneumoniae* y/o *Mycoplasma genitalium*, y proporcionar un procedimiento de detección y un kit de detección usando la molécula como un indicador.

40 En estas circunstancias, los presentes inventores han realizados estudios exhaustivos y han encontrado que el DnaK de microorganismos que pertenecen a *Mycoplasma pneumoniae* y/o *Mycoplasma genitalium* pueden usarse como un indicador para detectar rápida y específicamente infecciones por *Mycoplasma pneumoniae* y/o *Mycoplasma genitalium*. La proteína DnaK, que también se denomina Proteína de choque térmico 70 (Hsp70), se encontró como un grupo de proteínas la expresión de las cuales aumentó cuando las células se expusieron a condiciones de resistencia tal como calor para proteger las células y, se conoce actualmente, que participan en el transporte y repliegue (función de chaperona molecular) intracelular de proteínas traducidas. Las ventajas de usar la proteína de DnaK como índice en procedimientos de análisis inmunológico reside en los hechos de que:

- (1) la proteína de DnaK se expresa siempre, puesto que participa en el transporte o repliegue de proteínas,
- (2) la DnaK asciende aproximadamente al 1 % de proteínas totales y,
- (3) la DnaK está presente, no como un monómero, sino como un trímero, un hexámero o multímeros adicionales.

50 La presente divulgación se ha logrado basándose en estos hallazgos.

La invención se refiere a las realizaciones tal como se definen en las reivindicaciones.

Un aspecto de la invención se refiere a un procedimiento *in vitro* para detectar *Mycoplasma pneumoniae* o *Mycoplasma genitalium*, caracterizado por el uso de DnaK de *Mycoplasma pneumoniae* o *Mycoplasma genitalium*

como un indicador, en el que el procedimiento comprende el uso de un anticuerpo anti-DnaK específico de *Mycoplasma pneumoniae* y *Mycoplasma genitalium* para detectar *Mycoplasma pneumoniae* o *Mycoplasma genitalium*.

5 Un aspecto adicional de la invención se refiere a un uso *in vitro* de un anticuerpo de anti-DnaK específico de *Mycoplasma pneumoniae* y *Mycoplasma genitalium* para detectar *Mycoplasma pneumoniae* o *Mycoplasma genitalium*. La invención también comprende un uso *in vitro* de un kit para detectar *Mycoplasma pneumoniae* o *Mycoplasma genitalium*, en el que el kit comprende este anticuerpo anti-DnaK.

La presente divulgación proporciona lo siguiente:

- 10 [1] Un procedimiento para detectar *Mycoplasma pneumoniae* o *Mycoplasma genitalium*, caracterizado por el uso de DnaK de *Mycoplasma pneumoniae* o *Mycoplasma genitalium* como un indicador.
 [2] El procedimiento de [1], en el que la proteína de DnaK se analiza inmunológicamente.
 [3] Un anticuerpo de anti-DnaK específico de *Mycoplasma pneumoniae* o *Mycoplasma genitalium*.
 [4] Un kit para detectar *Mycoplasma pneumoniae* o *Mycoplasma genitalium*, que comprende el anticuerpo anti-DnaK de [3].
 15 [5] El procedimiento de [1], que usa un gen de DnaK como un indicador.
 [6] Un cebador o sonda específico de *Mycoplasma pneumoniae* o *Mycoplasma genitalium*.
 [7] Un kit para detectar *Mycoplasma pneumoniae* o *Mycoplasma genitalium*, que comprende el cebador o sonda de [6].

20 La expresión "los microorganismos" tal como se usa en el presente documento significa *Mycoplasma pneumoniae* o *Mycoplasma genitalium*, en particular, microorganismos que tiene patogenicidad y son significantes para ser diagnosticados como microorganismos causantes de enfermedades que se describen a continuación.

La expresión "anticuerpo que reacciona específicamente con los microorganismos" tal como se usa en el presente documento significa un anticuerpo que reacciona específicamente con la especie o el género de los microorganismos. Un anticuerpo que reacciona específicamente con la especie del microorganismo resulta particularmente útil en el diagnóstico de infecciones por microorganismos.

De acuerdo con el procedimiento para detectar microorganismos que pertenecen a *mycoplasma pneumoniae* y/o *mycoplasma genitalium* usando la molécula específica en la presente divulgación como un indicador, las infecciones de *Mycoplasma pneumoniae* y/o *Mycoplasma genitalium* causadas por los microorganismos pueden diagnosticarse rápida y específicamente.

30 **Breve descripción de los dibujos**

- La FIG. 1 ilustra una comparación de las secuencias de nucleótidos (1-720) de genes de DnaK (SEQ ID NO: 6) en cepas M129 de *Mycoplasma pneumoniae* (genotipo de P1: tipo I) y FH (genotipo de P1: tipo II).
 La FIG. 2 ilustra, después de la FIG. 1, una comparación de las secuencias de nucleótidos (721-1440) de los genes de DnaK en ambas cepas de *Mycoplasma pneumoniae*.
 35 La FIG. 3 ilustra, después de la FIG. 1 y FIG. 2, una comparación de las secuencias de nucleótidos (1441-1788) de los genes de DnaK en ambas cepas de *Mycoplasma pneumoniae*.
 La FIG. 4 ilustra una comparación de las secuencias de nucleótidos (1-717 para la cepa M129) de los genes de P1 (cepa M129: SEQ ID NO: 7 y cepa de FH: SEQ ID NO: 8) en cepas M129 de *Mycoplasma pneumoniae* (genotipo de P1: tipo I) y FH (genotipo de P1: tipo II).
 40 La FIG. 5 ilustra, después de la FIG. 4, una comparación de las secuencias de nucleótidos (718-1416 para la cepa M129) de los genes de P1 en ambas cepas de *Mycoplasma pneumoniae*.
 La FIG. 6 ilustra, después de la FIG. 4 y FIG. 5, una comparación de las secuencias de nucleótidos (1417-2136 para la cepa M129) de los genes de P1 en ambas cepas de *Mycoplasma pneumoniae*.
 La FIG. 7 ilustra, después de la FIG. 4 y FIG. 6, una comparación de las secuencias de nucleótidos (2137-2856 para la cepa M129) de los genes de P1 en ambas cepas de *Mycoplasma pneumoniae*.
 45 La FIG. 8 ilustra, después de la FIG. 4 y FIG. 7, una comparación de las secuencias de nucleótidos (2857-3564 para la cepa M129) de los genes de P1 en ambas cepas de *Mycoplasma pneumoniae*.
 La FIG. 9 ilustra, después de la FIG. 4 y FIG. 8, una comparación de las secuencias de nucleótidos (3565-4284 para la cepa M129) de los genes de P1 en ambas cepas de *Mycoplasma pneumoniae*.
 50 La FIG. 10 ilustra, después de la FIG. 4 y FIG. 9, una comparación de las secuencias de nucleótidos (4285-4884 para la cepa M129) de los genes de P1 en ambas cepas de *Mycoplasma pneumoniae*.

Descripción de las realizaciones

La presente divulgación se ilustrará ahora adicionalmente con detalle mediante, pero de ningún modo limitada a, las siguientes realizaciones de la presente divulgación como ejemplos típicos.

55 El procedimiento de la presente divulgación para detectar *Mycoplasma pneumoniae* o *Mycoplasma genitalium* se caracteriza por que la DnaK de los microorganismos se usa como un indicador para detectar *Mycoplasma pneumoniae* y/o *Mycoplasma genitalium* (es decir, cualquiera de *Mycoplasma pneumoniae* o *Mycoplasma*

genitalium, o ambos de *Mycoplasma pneumoniae* y *Mycoplasma genitalium*, lo más preferentemente, ambos de *Mycoplasma pneumoniae* y *Mycoplasma genitalium*). Las infecciones por *Mycoplasma pneumoniae* y/o *Mycoplasma genitalium* pueden diagnosticarse detectando estos microorganismos.

5 La infección por *Mycoplasma pneumoniae* que puede diagnosticarse mediante la presente divulgación es neumonía por micoplasma. La infección por *Mycoplasma genitalium* es uretritis o cervicitis no gonocócica y no clamídica.

10 En el diagnóstico de la infección por *Mycoplasma pneumoniae*, se puede usar una muestra en la que puede existir *Mycoplasma pneumoniae*. Ejemplos de la muestra incluyen hisopo faríngeo, hisopo nasofaríngeo, aspirado nasal, moco nasal, esputo y fluido de lavado broncoalveolar. Cuando se va a diagnosticar la infección por *Mycoplasma genitalium*, se puede usar una muestra en la que puede existir *Mycoplasma genitalium*. Ejemplos de la muestra incluye orina, especímenes de hisopo uretral y especímenes de hisopo cérvico. La identificación de las dos infecciones puede decidirse mediante el sitio de recogida de la muestra como una diana para la medición.

15 La DnaK que se usa como un indicador en la presente divulgación es una proteína de DnaK (número NCBI: NP_110122) o un gen de DnaK (número de NCBI: NC_000912 REGION: 521837..523624) derivado de *Mycoplasma pneumoniae*, o una proteína de DnaK (número de NCBI: AAC71527) o un gen de DnaK (número de NCBI: L43967 REGION: 374919..376706) derivado de *Mycoplasma genitalium*. Las proteínas y genes anteriormente mencionados son ejemplos de una cepa que pertenece a los microorganismos y las secuencias de DnaK de los microorganismos dentro del ámbito de la presente divulgación incluyen secuencias que se corresponden con las proteínas y genes de DnaK descritos anteriormente.

20 Como se muestra en el Ejemplo 8 que se describe a continuación, los genes de DnaK derivaban de distintas cepas de *Mycoplasma pneumoniae* completamente (100 %) acordados entre sí, incluso entre cepas en cuyos tipos de gen de P1 de *Mycoplasma pneumoniae* eran distintos y no se detectaron variaciones entre cepas recogidas a partir de diversos lugares y durante los últimos 50 años. A partir de esto, se considera que las secuencias del gen de DnaK y la proteína de DnaK de *Mycoplasma pneumoniae* son estables. Por lo tanto, es preferente referirse a las secuencias de nucleótidos o las secuencias de aminoácidos publicadas por NCBI tal como se han descrito anteriormente.

25 1. Procedimiento y kit para detectar microorganismos usando anticuerpo

30 La primera realización del procedimiento para detectar *Mycoplasma pneumoniae* o *Mycoplasma genitalium* de la presente divulgación se caracteriza por usar un anticuerpo anti-DnaK específico de los microorganismos. Cuando se selecciona el anticuerpo específico, la especificidad de los microorganismos es de al menos 10^5 UFC/ml o superior, preferentemente 10^4 UFC/ml o superior, y más preferentemente 10^3 UFC/ml, y la especificidad en los otros microorganismos es de al menos 10^7 UFC/ml o inferior, y preferentemente 10^8 UFC/ml o inferior.

El anticuerpo que puede usarse en la presente divulgación puede ser un anticuerpo policlonal o un anticuerpo monoclonal. Estos anticuerpos pueden obtenerse mediante los siguientes procedimientos y otros procedimientos similares, pero el procedimiento no está limitado al mismo.

35 Como primera realización del procedimiento para preparar el anticuerpo, la longitud completa de la proteína de DnaK o su péptido parcial puede usarse para preparar el anticuerpo. Con respecto a los microorganismos de los cuales se conoce la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos de la proteína de DnaK, puede sintetizarse un fragmento peptídico basándose en una región que muestra menos similitud con respecto a las secuencias de aminoácidos de proteínas de DnaK de otros microorganismos. La longitud del péptido para preparar el anticuerpo no queda limitada, pero en caso de que el anticuerpo frente a la proteína de DnaK, un péptido que tiene una longitud capaz de caracterizar la proteína, preferentemente 5 aminoácidos o más, y lo más preferente 8 aminoácidos o más, se puede usar. Este péptido o la longitud completa de la proteína sola o un conjugado de los mismos reticulados con una proteína portadora tal como KLH (hemocianina de lapa californiana) o BSA (albúmina de suero bovino), puede inocularse en un animal, opcionalmente junto con un adyuvante y se recoge un suero a partir del animal para obtener un antisuero que contenga un anticuerpo (anticuerpo policlonal) que reconozca la proteína de DnaK. Se puede usar anticuerpo que se purifica a partir del antisuero. Ejemplos del animal que puede inocularse incluyen una oveja, un caballo, una cabra, un conejo, un ratón y una rata y es preferente un conejo o una cabra para preparar un anticuerpo policlonal. Puede obtenerse un anticuerpo monoclonal de acuerdo con un procedimiento conocido para preparar células de hibridoma y es preferente un ratón en este caso.

50 Puede usarse una proteína de fusión de la secuencia de longitud completa o de aminoácidos que consiste en 5 restos o más (preferentemente 8 restos o más) de la proteína con glutatión S-transferasa o similar como un antígeno, después de la purificación de la proteína de fusión o sin purificación. El anticuerpo también puede prepararse mediante un anticuerpo genéticamente recombinante expresado en células de cultivo que usan un gen de inmunoglobulina aislado mediante un procedimiento de clonación de genes y diversos procedimientos descritos en la publicación: Antibodies; A laboratory manual, E. Harlow y col., Cold Spring Harbor Laboratory Press.

55 A partir de los anticuerpos preparados tal como se han descrito anteriormente, un anticuerpo que tiene una alta especificidad puede prepararse seleccionando un anticuerpo que reacciona específicamente con *Mycoplasma pneumoniae* y/o *Mycoplasma genitalium* (es decir, cualquiera de *Mycoplasma pneumoniae* o *Mycoplasma genitalium*, o ambos de *Mycoplasma pneumoniae* y *Mycoplasma genitalium*, lo más preferentemente, ambos de

Mycoplasma pneumoniae y *Mycoplasma genitalium*), y no reacciona con otros microorganismos patogénicos, de acuerdo con un procedimiento conocido.

El anticuerpo frente a la DnaK que puede usarse como el antígeno marcador de la presente divulgación puede obtenerse mediante los siguientes procedimientos u otros procedimientos similares, pero el procedimiento no está limitado al mismo.

a) Con respecto a los microorganismos de los cuales se conoce la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos de la proteína de DnaK, puede sintetizarse un fragmento peptídico basándose en una región que muestra menos similitud con respecto a las secuencias de aminoácidos de proteínas de DnaK de otros microorganismos, y puede prepararse un anticuerpo policlonal o monoclonal usando el fragmento peptídico como un antígeno para obtener el anticuerpo de interés.

La longitud completa de la secuencia de nucleótidos del gen puede obtenerse usando técnicas de ingeniería genéticas comunes, tal como amplificación génica mediante un procedimiento de PCR usando secuencias de ADN en ambas terminales del gen conocido como cebadores, o hibridación usando una secuencia homóloga tal como una sonda patrón.

A continuación, un antígeno de proteínas de interés puede obtenerse construyendo un gen de fusión con otros genes de proteínas, introduciendo el gen de fusión en un hospedador tal como *E. coli* mediante un procedimiento de introducción de genes conocido, sobreexpresando la proteína de fusión y purificando la proteína expresada mediante un procedimiento de cromatografía en columna de afinidad que usa un anticuerpo frente a la proteína usada para preparar la proteína de fusión. En este caso, puesto que la longitud completa de la proteína de DnaK se vuelve antígenos, si se obtiene un anticuerpo frente a una región de aminoácidos que se conserva entre los microorganismos fuera del ámbito, tal anticuerpo no puede usarse en la presente invención. Por lo tanto, con respecto a un antígeno obtenido mediante este procedimiento, el anticuerpo de interés puede obtenerse mediante la obtención de hibridomas que producen anticuerpos monoclonales y mediante la selección de un clon que produce un anticuerpo que reacciona específicamente con los microorganismos.

b) Con respecto a los microorganismos de los cuales no se conoce la secuencia de aminoácidos de la proteína de DnaK, puesto que las secuencias de aminoácidos de la proteína de DnaK tienen una homología del 80-100 %, preferentemente del 90-100 %, entre distintas especies, el gen de proteínas de interés puede obtenerse fácilmente usando técnicas de ingeniería genética comunes, tales como amplificación genética de una región de secuencia específica mediante un procedimiento de PCR basándose en una secuencia homóloga a la secuencia de aminoácidos o hibridación usando una secuencia homóloga como una sonda patrón.

El antígeno de proteínas de interés puede obtenerse construyendo un gen de fusión del gen de proteína con otros genes de proteínas, introduciendo el gen de fusión en un hospedador tal como *E. coli* mediante un procedimiento de introducción de genes conocido, sobreexpresando la proteína de fusión y purificando la proteína expresada mediante un procedimiento de columna de afinidad que usa un anticuerpo frente a la proteína usada para preparar la proteína de fusión. En este caso, puesto que la longitud completa de la proteína de DnaK se vuelve antígenos, si se obtiene un anticuerpo frente a una región de aminoácidos que se conserva entre los microorganismos fuera del ámbito, tal anticuerpo no puede usarse en la presente invención. Por lo tanto, con respecto a un antígeno obtenido mediante este procedimiento, el anticuerpo de interés puede obtenerse mediante la obtención de hibridomas que producen anticuerpos monoclonales y mediante la selección de un clon que produce un anticuerpo que reacciona específicamente con los microorganismos.

c) Como otro procedimiento en el caso de que no se conozca la secuencia de aminoácidos de la proteína de DnaK, se prepara un péptido sintético que consiste en 5-30 aminoácidos que se corresponde con una región de secuencia común que se conservan entre microorganismos en secuencias de aminoácidos conocidas de la proteína de DnaK, y se prepara un anticuerpo monoclonal o policlonal usando la secuencia peptídica de acuerdo con un procedimiento conocido. Puede obtenerse una proteína de DnaK altamente purificada mediante la purificación de un homogeneizado de células de un microorganismo de interés mediante cromatografía en columna de afinidad usando el anticuerpo. Cuando la pureza de la proteína no es suficiente, la pureza puede mejorarse mediante un procedimiento de purificación conocido, tal como cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrófoba o filtración de gel. El anticuerpo de interés puede obtenerse mediante la obtención de hibridomas usando el anticuerpo de proteína de DnaK purificado obtenido y mediante la selección de un hibridoma que produce un anticuerpo que reacciona específicamente con los microorganismos.

Como segunda realización del procedimiento para preparar el anticuerpo, puede usarse *Mycoplasma pneumoniae* como un antígeno para preparar un anticuerpo que reacciona con la proteína de DnaK y es específico de *Mycoplasma pneumoniae* y/o *Mycoplasma genitalium*, como se muestra en el Ejemplo 1.

De forma similar, puede usarse *Mycoplasma genitalium* como un antígeno para preparar el anticuerpo. En el caso de que el microorganismo se usa como un antígeno, el antígeno puede prepararse de acuerdo con un procedimiento conocido. Ejemplos del procedimiento incluyen sonicación, tratamiento térmico, tratamiento de tensioactivos, tratamiento de formalina, tratamiento de congelación y descongelación y tratamiento con ácido clorhídrico.

El anticuerpo de la presente divulgación que se obtiene mediante los procedimientos descritos anteriormente y es específico de los microorganismos puede usarse en diversos ensayos inmunológicos y pueden proporcionarse diversos reactivos y kits de detección específicos de microorganismos de interés.

5 El anticuerpo puede usarse en cualquiera de los ensayos inmunológicos conocidos, por ejemplo, un procedimiento de aglutinación que usa partículas de látex de poliestireno sobre las cuales se une el anticuerpo, un procedimiento ELISA llevado a cabo sobre una placa de microtítulos, inmunocromatografía o un procedimiento sándwich usando el anticuerpo marcado con partículas coloreadas, partículas capaces de desarrollar un color, partículas magnéticas, una enzima o una sustancia fluorescente, solo o como una combinación.

10 En el procedimiento de detección que usa DnaK como un indicador de la presente divulgación, puede detectarse específicamente *Mycoplasma pneumoniae* yo *Mycoplasma genitalium* sin alterar intencionadamente las células o puede usarse un procedimiento conocido para tratar microorganismos para llevar a cabo la detección con una alta sensibilidad. De manera más particular, un procedimiento de tratamiento que usa un reactivo de extracción que comprende diversos tensioactivos tales como Triton X-100, Tween-20 o SDS, un procedimiento de tratamiento enzimático que usa una enzima apropiada tal como una proteasa o un procedimiento conocido para alterar una estructura celular, tal como una alteración de las células del microorganismo mediante un procedimiento físico, se puede usar. Es preferente que se seleccionan condiciones óptimas para la extracción de cada microorganismo examinan la combinación de reactivos tales como tensioactivos.

15 El kit de reactivos para detectar el microorganismo que usa el anticuerpo de la presente divulgación se corresponde con el kit de reactivos para la detección usando el procedimiento de detección.

20 El kit no se limita, siempre y cuando contenga al menos un anticuerpo de la presente divulgación. El número, tipo y combinación de los anticuerpos usados puede cambiarse de forma apropiada de acuerdo con el ensayo inmunológico a usar. El kit puede contener un líquido para el tratamiento previo en el procedimiento de extracción descrito anteriormente, como un tratamiento previo de una muestra.

2. Procedimiento y kit para detectar microorganismos usando gen

25 Como procedimiento para extraer ADN, se puede usar un procedimiento conocido. Ejemplos del procedimiento incluyen una solubilización de una muestra con un tensioactivo o desproteización usando un agente de desproteización, para obtener ADN. Preferentemente, siempre y cuando el gen de DnaK tal como se describe a continuación pueda analizarse, por ejemplo, cuando el gen extraído se amplifica a continuación mediante un procedimiento de PCR, el ADN preferentemente no contiene inhibidores de reacción de PCR.

Como procedimiento para tratar previamente una muestra, se puede usar un enfoque similar tal como el descrito en el procedimiento para detectar los microorganismos que usan un anticuerpo.

30 La cantidad de ADN extraído no queda limitado siempre y cuando se extraiga una cantidad capaz de analizar el gen de DnaK. Cuando el ADN se somete a un procedimiento de PCR, la cantidad es de, por ejemplo, 5 a 50 fg o más por reacción.

35 El ADN extraído se usa para analizar el gen de DnaK. El análisis del gen de DnaK puede llevarse a cabo de acuerdo con un procedimiento conocido. Ejemplos del procedimiento incluyen un procedimiento para detectar la amplificación del gen de DnaK mediante un procedimiento de PCR y un procedimiento para especificar el gen de DnaK mediante un procedimiento de sonda. Por ejemplo, puede usarse cualquier procedimiento para amplificar el gen de DnaK mediante procedimiento de PCR, siempre y cuando la secuencia de nucleótidos de interés pueda amplificarse. Puede usarse cualquier procedimiento para especificar el gen de DnaK mediante procedimiento de sonda, siempre y cuando la secuencia de nucleótidos de interés pueda especificarse.

40 Para amplificar o especificar la secuencia de nucleótidos deseada del gen de DnaK, puede seleccionarse de forma adecuada una secuencia que tiene del 80-100 % de homología con respecto a *Mycoplasma pneumoniae* y/o *Mycoplasma genitalium* y que tiene una homología preferentemente del 60 % o inferior con respecto a los otros microorganismos patogénicos. El cebador o la sonda puede contener una o más variaciones, deleciones o adiciones en su secuencia de nucleótidos, siempre y cuando el fragmento de ADN de interés pueda amplificarse.

45 Por ejemplo, cuando el gen de DnaK de *Mycoplasma pneumoniae* va a ampliarse, los cebadores de amplificación de PCR pueden diseñarse basándose en la secuencia de genes de DnaK de *Mycoplasma pneumoniae* (número NCBI: NC_000912 REGION: 521837..523624) publicado en NCBI, como se describe en los Ejemplos a continuación. De manera más particular, el cebador de sentido MpDnaK_S y el cebador antisentido MpDnaK_A puede usarse para amplificar la longitud completa del gen de DnaK.

50 Cuando el gen de DnaK de *Mycoplasma genitalium* va a ampliarse, los cebadores de amplificación de PCR pueden diseñarse basándose en la secuencia de genes de DnaK de *Mycoplasma genitalium* (número NCBI: L43967 REGION: 374919..376706) publicado en NCBI.

55 Como se muestra en el Ejemplo 8, los genes de DnaK derivaban de distintas cepas de *Mycoplasma pneumoniae* completamente (100 %) concuerdan entre sí, incluso entre cepas en cuyos tipos de gen de P1 de *Mycoplasma pneumoniae* eran distintos y no se detectaron variaciones entre cepas recogidas a partir de diversos lugares y durante los últimos 50 años. A partir de esto, no es necesario tener en cuenta la diferencia entre cepas de *Mycoplasma pneumoniae* para detectar específicamente el gen de DnaK de *Mycoplasma pneumoniae*, y los

cebadores o sonda puede diseñarse teniendo en cuenta las diferencias entre las cepas distintas de *Mycoplasma pneumoniae*.

Además, puesto que se considera que la secuencia de la proteína de DnaK de *Mycoplasma pneumoniae* también es conservativa, los anticuerpos preparados usando la proteína de DnaK se considera que no muestran diferencia en la reactividad con respecto al genotipo, el lugar de recogida y el tiempo de recogida y, por lo tanto, puede usarse sobre una amplia zona y tiempo.

El kit de reactivos para detectar los microorganismos que usa el gen de la presente divulgación se corresponde con el kit de reactivos para la detección usando el procedimiento de detección. Esto es un kit que se usa para el procedimiento para detectar específicamente *Mycoplasma pneumoniae* y/o *Mycoplasma genitalium* y que se caracteriza por que comprende al menos dos tipos de cebadores para amplificar una secuencia de nucleótidos específica del gen de DnaK de interés.

Como otra realización, el kit se caracteriza por que comprende al menos un tipo de sonda para especificar una secuencia de nucleótidos específica del gen de DnaK de interés.

Estos kits pueden contener adicionalmente un líquido para el tratamiento previo en el procedimiento de extracción descrito anteriormente, como un tratamiento previo de una muestra.

Ejemplos

La presente divulgación se ilustrará ahora adicionalmente mediante, pero de ningún modo limitada a, los siguientes Ejemplos.

<<Ejemplo 1: Preparación de anticuerpos específicos de *Mycoplasma pneumoniae* y *Mycoplasma genitalium* e identificación de un antígeno específico>>

(1) Preparación de anticuerpos monoclonales específicos de *Mycoplasma pneumoniae* y *Mycoplasma genitalium*

(1-1) Cultivo de cepas para la inmunización y preparación de inmunógenos

Caldos de glucosa PPLO (que contenían suero de caballo, extracto de levadura fresca y acetato de talio) se inocularon por separado con una de las 6 cepas de *Mycoplasma pneumoniae* (FH, Bru, Mac, M52, P11428 y cepas M129-B7: adquiridos de ATCC) y se llevó a cabo el cultivo a 37 °C durante 7 días en condiciones aeróbicas. Cada cepa recogida por centrifugación se lavó y suspendió en PBS. Estas suspensiones se congelaron y descongelaron para preparar inmunógenos.

(1-2) Inmunización

Se usaron ratones Balb/c hembra de seis semanas de edad (CREA Japan, Inc.) para la inmunización. Cada solución de inmunógeno derivada de una cepa se emulsionó con adyuvante completo de Freud (SIGMA). Cada emulsión (100 µg de antígeno) se inyectó por vía subcutánea en un ratón. Hasta que se observó un aumento en el título del anticuerpo frente al inmunógeno en cada ratón, 50 µg de cada antígeno emulsionado con adyuvante incompleto de Freud (SIGMA) se inyectó por vía subcutánea en el ratón cada dos semanas. Además, 25 µg de cada antígeno diluido con PBS se inyectó por vía intraperitoneal en el ratón tres días antes de la fusión celular.

(1-3) Preparación de hibridomas

Los siguientes procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo con un procedimiento convencional. Se fusionaron células del bazo asépticamente recogidas de ratones inmunizados con células de mieloma (P3U1) usando polietilenglicol 1500 (Roche) y se inocularon en pocillo de placas de 96 pocillos. Las células de hibridoma se cultivaron selectivamente usando un medio HAT y sus sobrenadantes de cultivo se analizaron según las siguientes condiciones ELISA. La inmovilización para el ELISA se llevó a cabo usando antígeno de *Mycoplasma pneumoniae* (1 µg/ml) derivado cada uno de las 6 cepas usadas como inmunógenos. Después de un tratamiento de bloqueo para los pocillos, cada sobrenadante de cultivo se añadió a los pocillos y se incubó a 4 °C durante la noche. Los pocillos se lavaron con un líquido de lavado tres veces y un anticuerpo Ig anti-ratón de conejo marcado con HRP diluido 2.000 veces (Dako) se añadió a los pocillos y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Los pocillos se lavaron con un líquido de lavado tres veces y una solución de sustrato (TMBZ) se añadió a los pocillos y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Una vez detenida la reacción, se midió una absorbancia a 450 nm. Los hibridomas seleccionados se analizaron adicionalmente mediante un procedimiento de dilución limitante para establecer cepas clon. Con respecto a los anticuerpos monoclonales producidos a partir de 16 cepas en las cepas clon establecidas, se llevaron a cabo los siguientes experimentos. Los anticuerpos monoclonales producidos a partir de las 16 cepas clon reaccionadas con todos los inmunógenos derivados de las 6 cepas.

(1-4) Determinación de peso molecular de proteínas reconocidas por anticuerpos monoclonales

El peso molecular de cada proteína reconocida por los 16 anticuerpos monoclonales se determinó mediante transferencia de Western. En primer lugar, 10 µg de antígeno de *Mycoplasma pneumoniae* (cepa FH) se sometió a

electroforesis mediante SDS-PAGE y se inmunotransfirió sobre membranas de nitrocelulosa. Se añadió cada sobrenadante de cultivo de los 16 clones a las membranas y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Las membranas se lavaron con un líquido de lavado tres veces y un anticuerpo Ig anti-ratón de conejo marcado con HRP diluido 1000 veces se añadió a las membranas y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Las membranas se lavaron con un líquido de lavado tres veces y una solución de sustrato (4-cloro-1-naftol) se añadió a las membranas y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Después del desarrollo, las membranas se lavaron con agua destilada para detener la reacción.

Como resultado, se encontró que 10 anticuerpos monoclonales reconocieron una molécula que tenía un peso molecular de 62-69 kDa y 6 anticuerpos monoclonales reconocieron una molécula que tenía un peso molecular de 40-45 kDa. A partir de este resultado, intentamos identificar el antígeno con respecto a la moléculas de 62-69 kDa que se consideró que tenía una elevada inmunogenicidad puesto que se obtuvieron muchos clones.

(1-5) Identificación de la subclase de los anticuerpos obtenidos

Se usó una cinta Iso (Roche) para determinar la subclase de 10 anticuerpos monoclonales que reconocieron la molécula de 62-69 kDa. Se encontró que 6 anticuerpos eran cadena H G1/L cadena k, 1 anticuerpo era cadena H G1/L cadena λ, 1 anticuerpo era cadena H 2b/L cadena k, 1 anticuerpo era cadena H 2b/L cadena λ, y 1 anticuerpo era cadena H 2a/L cadena λ.

(2) Identificación de antígeno específico de *Mycoplasma pneumoniae* y *Mycoplasma genitalium*

(2-1) Purificación de antígeno reconocido por anticuerpos monoclonales

(2-1-1) Cultivo de cepa

Una cepa M129-B7 de *Mycoplasma pneumoniae*, de la cual ya se ha determinada la secuencia génica completa, se usó para purificar un antígeno. Se inoculó *Mycoplasma pneumoniae* (cepa M129-B7) en caldo de glucosa PPLO (que contenían suero de caballo, extracto de levadura fresca y acetato de talio) y se cultivó a 37 °C durante 7 días en condiciones aeróbicas. La cepa recogida por centrifugación se lavó y suspendió en PBS. La suspensión se congeló.

(2-1-2) Purificación de antígeno reconocido mediante cromatografía de afinidad

El anticuerpo monoclonal MCM12 obtenido en (1) se unió a Sepharosa 4B activada con CnBr (GE healthcare) como un portador de columna para preparar una columna de afinidad para la purificación de antígeno. La unión al portador de columna se llevó a cabo haciendo reaccionar gel de 5 mg/ml de IgG en 0,1 mol/l de NaHCO₃-NaOH y 0,5 mol/l de NaCl (pH 8,3) a 4 °C durante la noche. Los grupos no reaccionados se bloquearon usando un tampón de glicina de 0,2 mol/l (pH 8).

Las proteínas extraídas de la cepa de *Mycoplasma pneumoniae* se aplicaron a la columna. Después de eluir una fracción no adsorbida, se eluyó una fracción adsorbida en columna usando 3 mol/l de tiocianato de sodio y se recogió. Esta fracción se dializó frente a 50 mmol/l de PBS (pH7) para obtener un producto purificado.

(2-2) Identificación de proteína reconocida por anticuerpos monoclonales obtenidos

(2-2-1) Determinación de peso molecular de proteína reconocida mediante SDS-PAGE

El antígeno purificado se analizó mediante SDS-PAGE y transferencia de Western. El antígeno purificado (0,1 µg) se sometió a electroforesis mediante SDS-PAGE y se inmunotransfirió sobre membranas de nitrocelulosa. El anticuerpo monoclonal MCM12 o anticuerpo monoclonal MCM19 (10 µg/ml de solución de IgG) se añadió por separado a las membranas y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Las membranas se lavaron con un líquido de lavado tres veces y un anticuerpo Ig anti-ratón de conejo etiquetado con HRP diluido 1000 veces se añadió a las membranas y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Las membranas se lavaron con un líquido de lavado tres veces y una solución de sustrato (4-cloro-1-naftol) se añadió a las membranas y se incubó a temperatura ambiente. Después del desarrollo, las membranas se lavaron con agua destilada para detener la reacción.

Se confirmó que ambos anticuerpos reconocieron el antígeno purificado.

(2-2-2) Análisis de secuencia de aminoácidos N-terminal de antígeno purificado

Los restos de 10 aminoácidos de N-terminal de la proteína de antígeno purificada se analizaron de acuerdo con un procedimiento convencional. El antígeno purificado se sometió a electroforesis mediante SDS-PAGE. Se lavó una membrana de PVDF sobre la cual se había sometido a inmunotransferencia con un 50 % de metanol/0,1 % de ácido trifluoroacético y metanol y se secó y se llevaron 10 ciclos de secuenciación de aminoácidos a partir del N-terminal. Se usó un secuenciador de proteínas PPSQ-23A (Shimadzu) y un analizador PTH SPD-10A (Shimadzu) como analizadores.

Como resultado, se obtuvo la siguiente secuencia: S T D N G L I I G I (SEQ ID NO: 1)

5 Se llevó a cabo una búsqueda usando la base de datos Swiss-Prot de acuerdo con un procedimiento convencional y la secuencia obtenida concordaba completamente con la secuencia que consistía en el 2° al 11° resto de aminoácido de la proteína de DnaK de chaperona de *Mycoplasma pneumoniae*. El peso molecular de la DnaK deducida a partir de su secuencia de aminoácidos era de 65 kDa, que casi concordó con el peso molecular del antígeno reconocido por anticuerpo determinado mediante transferencia de Western.

Como se ha descrito anteriormente, se confirmó que los anticuerpos obtenidos anteriormente eran anticuerpos anti-DnaK específicos de *Mycoplasma pneumoniae* y *Mycoplasma genitalium*.

<<Ejemplo 2: Examinación se sensibilidad y reactividad cruzada de anticuerpos obtenidos mediante procedimiento de ELISA>>

10 En los anticuerpos obtenidos en el Ejemplo 1, el anticuerpo monoclonal MCM12 y el anticuerpo monoclonal MCM19 se usaron para examinar la sensibilidad y reactividad cruzada de los anticuerpos.

(1) Cultivo y preparación de cepas a examinar (1-1) Cepas para ensayo de sensibilidad

15 Caldos de glucosa PPLO (que contenían suero de caballo, extracto de levadura fresca y acetato de talio) se inocularon por separado con una de las 8 cepas de *Mycoplasma pneumoniae* que se muestra en la Tabla 1 y el cultivo se llevó a cabo a 37 °C durante 4 días en condiciones aeróbicas. Se usaron las cepas en las que el caldo alcanzó un pH de 6,8 como cepas de ensayo. Para determinar el número de cada cepa en el caldo, se preparó una serie de diluciones de 10 etapas con PBS esterilizado y se inocularon 10 µl de cada dilución sobre PPLO (que contenía suero de caballo, extracto de levadura fresca y acetato de talio) medio de agar y se incubó a 37 °C durante 10 días. Las colonias de crecimiento sobre el medio de agar se recontaron con un microscopio óptico que tenía una
20 ampliación de 40 para calcular la unidad formadora de colonias de cada cepa.

Tabla 1

Cepa	N.º ATCC
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> FH	15531
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> Bru	15377
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> Mutante 22	39505
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> Mac	15492
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> M52	15293
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> P11428	29085
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> M129-B7	29342
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> UTMB-10P	49894

(1-2) Cepas para ensayo 1 de reactividad cruzada

25 Cepas que pertenecían al género *Mycoplasma* distinto de *Mycoplasma pneumoniae* que se muestra en (1-1), el género *Ureaplasma*, y el género *Acholeplasma* se cultivaron de acuerdo con los caldos y las condiciones de cultivo que se muestran en la Tabla 2. El cultivo se llevó a cabo a 37 °C. Los términos "aeróbico" y "anaeróbico" en la Tabla 2 significan cultivo aeróbico y cultivo anaeróbico, respectivamente. Para determinar el número de cada cepa en el caldo, se preparó una serie de diluciones de 10 etapas con PBS esterilizado y se inocularon 10 µl de cada dilución sobre PPLO (que contenía suero de caballo, extracto de levadura fresca y acetato de talio) agar y se incubó a 37 °C durante 10 días. Las colonias de crecimiento sobre el agar se recontaron con un microscopio óptico que tenía una
30 ampliación de 40 para calcular la unidad formadora de colonias de cada cepa. El ensayo se llevó a una cantidad de 10⁶ a 10⁷ ufc/ml.

Tabla 2

Cepa	N.º ATCC	Medio	Condiciones
<i>Mycoplasma genitalium</i>	33530	caldo de glucosa PPLO (talio ⁻)	4 días, aeróbico
<i>Mycoplasma fermentans</i>	19989	caldo de glucosa PPLO	4 días, aeróbico
<i>Acholeplasma laidlawii</i>	23206	caldo de glucosa PPLO	4 días, aeróbico
<i>Acholeplasma oculi</i>	51735	caldo de glucosa PPLO	4 días, aeróbico
<i>Mycoplasma penetrans</i>	55252	caldo de glucosa PPLO	4 días, aeróbico

(continuación)

Cepa	N.º ATCC	Medio	Condiciones
<i>Mycoplasma pirum</i>	25960	caldo de glucosa PPLO	4 días, aeróbico
<i>Mycoplasma hominis</i>	23114	caldo de arginina PPLO (talio)	3 días, aeróbico
<i>Mycoplasma orale</i>	23714	caldo de arginina PPLO	3 días, aeróbico
<i>Mycoplasma salivarium</i>	23064	caldo de arginina PPLO	3 días, aeróbico
<i>Mycoplasma arthritidis</i>	19611	caldo de arginina PPLO	3 días, aeróbico
<i>Mycoplasma buccale</i>	23636	caldo de arginina PPLO	3 días, aeróbico
<i>Mycoplasma faucium</i>	25293	caldo de arginina PPLO	3 días, anaeróbico
<i>Mycoplasma lipophilum</i>	27104	caldo de arginina PPLO	3 días, aeróbico
<i>Mycoplasma primatum</i>	25948	caldo de arginina PPLO	3 días, aeróbico
<i>Mycoplasma spermatophilum</i>	49695	caldo de arginina PPLO	3 días, anaeróbico
<i>Ureaplasma parvum</i>	700970	caldo T	2 días, aeróbico
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	27618	caldo T	2 días, aeróbico

(1-3) Cepas para ensayo 2 de reactividad cruzada

De la Tabla 3 a la Tabla 6 se muestran los microorganismos que se usaron en el ensayo de reactividad cruzada de bacterias y hongos distintos del género *Mycoplasma*, el género *Ureaplasma*, y el género *Acholeplasma* usados en (1-1) y (1-2) y las condiciones de cultivo. Se usaron como medio agar infusión de corazón (Difco), agar II de tripticasa de soja con 5 % de sangre de oveja (Becton, Dickinson and Company), agar chocolate (NISSUI), agar GAM modificado (NISSUI), medio de Skirrow (Becton, Dickinson and Company) y agar Sabouraud-dextrosa (Difco).

Estas cepas se cultivaron sobre agar y se suspendieron en PBS esterilizado a una concentración de 10^7 a 10^8 ufc/ml para preparar cepas de ensayo. Para determinar el número de cada cepa, cada suspensión de ensayo en la que cada cepa estaba suspendida en PBS se diluyó por etapas (10 etapas) con el mismo PBS, y 50 l de cada dilución se inocularon sobre medio de agar. Las colonias de crecimiento sobre el medio se recontaron a ojo.

Los espacios en blanco en la columna de "Cepa N.º" de las tablas significan cepas que se aislaron e identificaron a partir de especímenes clínicos.

Tabla 3

Cepa	Cepa N.º	Medio	Condiciones
<i>Branhamella catarrhalis</i>		agar infusión de corazón	37 °C, 18 horas, aeróbico
<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC 8090	agar infusión de corazón	37 °C, 18 horas, aeróbico
<i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC 13047	agar infusión de corazón	37 °C, 18 horas, aeróbico
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25932	agar infusión de corazón	37 °C, 18 horas, aeróbico
<i>Escherichia hermannii</i>	ATCC 33650	agar infusión de corazón	37 °C, 18 horas, aeróbico
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 27736	agar infusión de corazón	37 °C, 18 horas, aeróbico
<i>Leclercia adecarboxylate</i>		agar infusión de corazón	37 °C, 18 horas, aeróbico
<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC29906	agar infusión de corazón	37 °C, 18 horas, aeróbico
<i>Proteus vulgaris</i>	ATCC 6380	agar infusión de corazón	37 °C, 18 horas, aeróbico
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	agar infusión de corazón	37 °C, 18 horas, aeróbico
<i>Pseudomonas maltophilia</i>	IFO 12690	agar infusión de corazón	37 °C, 18 horas, aeróbico

15

ES 2 694 511 T3

(continuación)

Cepa	Cepa N.º	Medio	Condiciones
<i>Salmonella choleraesuis</i> subsp.choleraesuis serovar enteritidis	JCM 1652	agar infusión de corazón	37 °C, 18 horas, aeróbico
<i>Salmonella choleraesuis</i> subsp.choleraesuis serovar thyphimutium	JCM 6977	agar infusión de corazón	37 °C, 18 horas, aeróbico
<i>Serratia marcescens</i>	ATCC 13880	agar infusión de corazón	37 °C, 18 horas, aeróbico
<i>Staphylococcus aureus</i>	JCM 2151	agar infusión de corazón	37 °C, 18 horas, aeróbico
<i>Staphylococcus aureus</i>	JCM 2179	agar infusión de corazón	37 °C, 18 horas, aeróbico
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	JCM 2414 ^T	agar infusión de corazón	37 °C, 18 horas, aeróbico
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	ATCC29970	agar infusión de corazón	37 °C, 18 horas, aeróbico
<i>Staphylococcus hominis</i>	ATCC27844	agar infusión de corazón	37 °C, 18 horas, aeróbico
<i>Staphylococcus hyicus</i>	ATCC11249	agar infusión de corazón	37 °C, 18 horas, aeróbico
<i>Staphylococcus warneri</i>	ATCC27836	agar infusión de corazón	37 °C, 18 horas, aeróbico

Tabla 4

Cepa	Cepa n.º	Medio	Condiciones
<i>Enterococcus avium</i>	JCM8722	Agar II de tripticasa de soja con 5 % de sangre de oveja	37 °C. 18 horas, aeróbico
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	JCM 5675	Agar II de tripticasa de soja con 5 % de sangre de oveja	37 °C, 18 horas, aeróbico
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	JCM 5675	Agar II de tripticasa de soja con 5 % de sangre de oveja	37 °C, 18 horas, aeróbico
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	JCM 5675	Agar II de tripticasa de soja con 5 % de sangre de oveja	37 °C, 18 horas, aeróbico
<i>Enterococcus durans</i>	JCM8725	Agar II de tripticasa de soja con 5 % de sangre de oveja	37 °C, 18 horas, aeróbico
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC51299	Agar II de tripticasa de soja con 5 % de sangre de oveja	37 °C, 18 horas, aeróbico
<i>Enterococcus faecalis</i>	JCM 5803	Agar II de tripticasa de soja con 5 % de sangre de oveja	37 °C, 18 horas, aeróbico
<i>Enterococcus faecium</i>	JCM 5804	Agar II de tripticasa de soja con 5 % de sangre de oveja	37 °C, 18 horas, aeróbico
<i>Enterococcus gallinarum</i>	JCM8728	Agar II de tripticasa de soja con 5 % de sangre de oveja	37 °C, 18 horas, aeróbico
<i>Enterococcus mundtii</i>	JCM8731	Agar II de tripticasa de soja con 5 % de sangre de oveja	37 °C, 18 horas, aeróbico
<i>Streptococcus agalactiae</i>	ATCC13813	Agar II de tripticasa de soja con 5 % de sangre de oveja	37 °C, 18 horas, aeróbico
<i>Streptococcus anginosus</i>		Agar II de tripticasa de soja con 5 % de sangre de oveja	37 °C, 18 horas, aeróbico
<i>Streptococcus bovis</i>	JCM5802 ¹	Agar II de tripticasa de soja con 5 % de sangre de oveja	37 °C, 18 horas, aeróbico
<i>Streptococcus constellatus</i>		Agar II de tripticasa de soja con 5 % de sangre de oveja	37 °C, 18 horas, aeróbico
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	JCM5673	Agar II de tripticasa de soja con 5 % de sangre de oveja	37 °C, 18 horas, aeróbico
<i>Streptococcus equinus</i>	JCM7879 ¹	Agar II de tripticasa de soja con 5 % de sangre de oveja	37 °C, 18 horas, aeróbico
<i>Streptococcus milleri</i>		Agar II de tripticasa de soja con 5 % de sangre de oveja	37 °C, 18 horas, aeróbico
<i>Streptococcus mitis</i>		Agar II de tripticasa de soja con 5 % de sangre de oveja	37 °C, 18 horas, aeróbico
<i>Streptococcus mutans</i>	JCM5705 ¹	Agar II de tripticasa de soja con 5 % de sangre de oveja	37 °C, 18 horas, aeróbico

(continuación)

Cepa	Cepa n.º	Medio	Condiciones
<i>Streptococcus oralis</i>		Agar II de tripticasa de soja con 5 % de sangre de oveja	37 °C, 18 horas, aeróbico
<i>Streptococcus pneumoniae</i>		Agar II de tripticasa de soja con 5 % de sangre de oveja	37 °C, 18 horas, aeróbico
<i>Streptococcus pyogenes</i>	ATCC 10389	Agar II de tripticasa de soja con 5 % de sangre de oveja	37 °C, 18 horas, aeróbico
<i>Streptococcus salivaris subsp. salivarius</i>	JCM5707 ¹	Agar II de tripticasa de soja con 5 % de sangre de oveja	37 °C, 18 horas, aeróbico
<i>Streptococcus sanguis</i>	JCM5708 ¹	Agar II de tripticasa de soja con 5 % de sangre de oveja	37 °C, 18 horas, aeróbico
<i>Streptococcus uberis</i>	JCM5709 ¹	Agar II de tripticasa de soja con 5 % de sangre de oveja	37 °C, 18 horas, aeróbico

Tabla 5

Cepa	Cepa N.º	Medio	Condiciones
<i>Haemophilus aphrophilus</i>	cultiloops	Agar chocolate	37 °C, 18 horas, 5 % de CO ₂
<i>Haemophilus haemolyticus</i>	T-30	Agar chocolate	37 °C, 18 horas, 5 % de CO ₂
<i>Haemophilus influenzae</i>	ATCC33391	Agar chocolate	37 °C, 18 horas, 5 % de CO ₂
<i>Haemophilus parahaemolyticus</i>	T-13	Agar chocolate	37 °C, 18 horas, 5 % de CO ₂
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	T-10	Agar chocolate	37 °C, 18 horas, 5 % de CO ₂
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	ATCC49981	Agar chocolate	37 °C, 18 horas, 5 % de CO ₂
<i>Neisseria meningitidis</i> Serogrupo B		Agar chocolate	37 °C, 18 horas, 5 % de CO ₂
<i>Lactococcus garvieae</i>	JCM10343	Agar GAM modificado	37 °C, 24 horas, anaeróbico
<i>Lactococcus lactis subsp. Lactis</i>	JCM5805	Agar GAM modificado	37 °C, 24 horas, anaeróbico
<i>Lactococcus raffinolactis</i>	JCM5706	Agar GAM modificado	37 °C, 24 horas, anaeróbico
<i>Leuconostoc mesenteroides subsp. dextranicum</i>	JCM9700	Agar GAM modificado	37 °C, 24 horas, anaeróbico
<i>Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides</i>	JCM6124	Agar GAM modificado	37 °C, 24 horas, anaeróbico
<i>Listeria monocytogenes</i>	4b	Agar GAM modificado	37 °C, 24 horas, anaeróbico
<i>Pediococcus acidilactici</i>	JCM8797	Agar GAM modificado	37 °C, 24 horas, anaeróbico
<i>Pediococcus damnosus</i>	JCM5886	Agar GAM modificado	37 °C, 24 horas, anaeróbico
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	JCM5890	Agar GAM modificado	37 °C, 24 horas, anaeróbico
<i>Peptostreptococcus micros</i>	ATCC33270	Agar GAM modificado	37 °C, 24 horas, anaeróbico
<i>Porphyromonas gingivalis</i>		Agar GAM modificado	37 °C, 24 horas, anaeróbico
<i>Prevotella intermedia</i>	NCTC9336	Agar GAM modificado	37 °C, 24 horas, anaeróbico
<i>Prevotella oris</i>	ATCC33573	Agar GAM modificado	37 °C, 24 horas, anaeróbico
<i>Flavobacterium meningosepticum</i>	KM 506	Agar GAM modificado	37 °C, 24 horas, anaeróbico
<i>Fusobacterium nucleatum subsp. Nucleatum</i>		Agar GAM modificado	37 °C, 24 horas, anaeróbico
<i>Acinetobacter baumannii</i>	ATCC23055	Agar GAM modificado	37 °C, 24 horas, anaeróbico

(continuación)

Cepa	Cepa N.º	Medio	Condiciones
<i>Actinomyces maeslundii</i>	ATCC19039	Agar GAM modificado	37 °C. 24 horas, anaeróbico
<i>Corynebacterium matruchotii</i>	ATCC14266	Agar GAM modificado	37 °C, 24 horas, anaeróbico

Tabla 6

Cepa	Cepa N.º	Medio	Condiciones
<i>Campylobacter jejuni</i>		medio de Skirrow	37 °C, 48 horas, microaeróbico
<i>Campylobacter coli</i>		medio de Skirrow	37 °C, 48 horas, microaeróbico
<i>Candida albicans</i> serotipo A	A207	Agar Sabouraud-dextrosa	25°C, 48 horas, aeróbico
<i>Candida albicans</i> serotipo B	B792	Agar Sabouraud-dextrosa	25°C, 48 horas, aeróbico
<i>Candida dubliniensis</i>		Agar Sabouraud-dextrosa	25°C, 48 horas, aeróbico
<i>Candida glabrata</i>		Agar Sabouraud-dextrosa	25°C, 48 horas, aeróbico
<i>Candida glabrata</i>		Agar Sabouraud-dextrosa	25°C, 48 horas, aeróbico
<i>Candida parapsilosis</i>		Agar Sabouraud-dextrosa	25°C, 48 horas, aeróbico
<i>Candida guilliermondii</i>		Agar Sabouraud-dextrosa	25°C, 48 horas, aeróbico
<i>Candida kefyr</i>		Agar Sabouraud-dextrosa	25°C, 48 horas, aeróbico
<i>Candida tropicalis</i>		Agar Sabouraud-dextrosa	25°C, 48 horas, aeróbico
<i>Candidakrusei</i>		Agar Sabouraud-dextrosa	25°C, 48 horas, aeróbico
<i>Cryptococcus neoformans</i>	ATCC24064	Agar Sabouraud-dextrosa	25°C, 48 horas, aeróbico

(2) Examinación de sensibilidad y reactividad cruzada mediante procedimiento ELISA

(2-1) Construcción de procedimiento ELISA

5 (2-1-1) Procedimiento de preparación de anticuerpo inmovilizado y procedimiento de inmovilización

El fluido de ascitis que contenía anticuerpo monoclonal MCM19 se aplicó a fraccionamiento de sulfato de amonio, se purificó IgG usando rProteinA Sepharose FF (GE healthcare) y se llevó a cabo un análisis de proteína mediante un procedimiento de BCA. El anticuerpo de IgG purificado (10 µg/ml) se inmovilizó sobre una microplaca de 96 pocillos.

10 (2-1-2) Procedimiento de preparación de un anticuerpo para marcar con fosfatasa alcalina y procedimiento para preparación de anticuerpo marcado

El fluido de ascitis que contenía anticuerpo monoclonal MCM12 se aplicó a fraccionamiento de sulfato de amonio y se purificó IgG usando MEP Hypercel (Pall Corporation). La IgG se digirió con pepsina para preparar F(ab')₂, y F(ab')₂ se reticuló con fosfatasa alcalina para preparar un anticuerpo marcado con fosfatasa alcalina.

(2-1-3) Procedimiento para llevar a cabo el procedimiento de ELISA

15 Se lavó la microplaca de 96 pocillos inmovilizada y se bloqueó con 0,1 mmol/l de TBA (pH 7,5) que contenía 1 % de BSA a temperatura ambiente durante 1 hora. Se añadió cada suspensión de cepa a someter a ensayo (100 µl) a la microplaca y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. La microplaca se lavó y el anticuerpo marcado con fosfatasa alcalina (10 µg/ml) se añadió e incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. La microplaca se lavó y se llevó a cabo el desarrollo usando una solución de sustrato (pNPP) durante 30 minutos. La reacción se detuvo y se midió la absorbancia a 405 nm.
20

(3) Ensayo de sensibilidad

Las cepas (1-1) se aplicaron al ELISA descrito anteriormente y una dilución de ensayo que mostró una absorbancia de 0,05 o superior y se usó una ampliación de dilución máxima para calcular el número de cada cepa. Los resultados se muestran en la Tabla 7.

25 Se encontró a partir de los resultados que se muestran en la Tabla 7 que la sensibilidad frente a *Mycoplasma pneumoniae* fue de 10³ a 10⁴ ufc/ml mediante el ELISA usando los anticuerpos monoclonales.

Tabla 7

Cepa	N.º ATCC	Número de cepa que muestra absorbancia de 0,05 o superior (DO) por ELISA
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> FH	15531	$3,1 \times 10^4$
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> Bru	15377	$9,8 \times 10^4$
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> Mutante 22	39505	$8,0 \times 10^4$
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> Mac	15492	$2,5 \times 10^4$
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> M52	15293	$2,5 \times 10^3$
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> PI1428	29085	$3,5 \times 10^3$
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> M129-B7	29342	$3,8 \times 10^4$
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> UTMB-10P	49894	$2,3 \times 10^3$

(4) Ensayo de reactividad cruzada

5 Cepas de ensayo (1-2) [el género *Mycoplasma* distinto de *Mycoplasma pneumoniae*, el género *Ureaplasma*, y el género *Acholeplasma* que se muestran en la Tabla 2] y las cepas de ensayo (1-3) [bacterias y hongos distintos que se muestran de la Tabla 3 a la Tabla 6] se aplicaron al ELISA descrito anteriormente.

Todos los microorganismos distintos de *Mycoplasma genitalium* mostraron una absorbancia inferior a 0,010. Con respecto a *Mycoplasma genitalium*, el número del mismo calculado a partir de una dilución de ensayo que mostró una absorbancia de 0,05 o superior y una ampliación de dilución máxima fue $6,9 \times 10^4$ ufc/ml.

10 Como muestran estos resultados, se encontró que el ELISA que usaba los anticuerpos monoclonales mostró una reactividad cruzada a *Mycoplasma genitalium*, pero no mostró una reactividad cruzada a los otros microorganismos.

Como se ha descrito anteriormente, se confirmó que el ELISA no mostró una reactividad cruzada a muchas bacterias y hongos que podrían alterar el diagnóstico de una infección por *Mycoplasma pneumoniae* o *Mycoplasma genitalium*.

15 <<Ejemplo 3: Examinación de sensibilidad y reactividad cruzada de anticuerpos obtenidos mediante inmunocromatografía>>

(1) Construcción de inmunocromatografía

(1-1) Preparación de oro coloidal conjugado a anticuerpo de *anti-Mycoplasma-pneumoniae*

20 A una solución de oro coloidal, a la cual se había ajustado el pH previamente añadiendo 2 ml de un tampón fosfato de 50 mmol/l (pH 11) a 18 ml de una solución de oro coloidal (Tanaka Kikinzoku) que tenía un diámetro de 40 nm, se añadieron y agitaron 2,5 ml de 100 µg/ml de anticuerpo monoclonal MCM12. Después de agitar la mezcla durante 1 hora, se añadió 1 ml de 1 % de masa de solución acuosa de polietilenglicol (Mw. 20000, Wako Pure Chemical Industries) y se agitó, y 2 ml de 10 % de masa de solución acuosa de BSA (SIGMA) se añadió y se agitó. Esta solución se centrifugó a 4 °C y 8.000 G durante 15 minutos y se retiró caso todo el sobrenadante de modo que se dejó aproximadamente 1 ml de sobrenadante. El oro coloidal se volvió a dispersar usando un generador ultrasónico.

25 El oro coloidal dispersado se dispersó en 20 ml de un tampón fosfato que contenía BSA y se centrifugó a 4 °C y 8.000 G durante 15 minutos. Se retiró casi todo el sobrenadante de modo que dejó aproximadamente 1 ml del sobrenadante, y se dispersó de nuevo oro coloidal usando un generador ultrasónico para preparar una solución de oro coloidal conjugado a anticuerpo.

(1-2) Preparación de almohadilla que porta oro coloidal

30 La solución de oro coloidal conjugada a anticuerpo en (1-1) se diluyó con el tampón fosfato que contenía BSA y se impregnó en una almohadilla de fibras de vidrio (Millipore) que se había cortado previamente en un tamaño de 20 mm x 300 mm. La almohadilla se secó a temperatura ambiente durante la noche para preparar una almohadilla que porta el anticuerpo de oro coloidal.

(1-3) Preparación de membrana inmovilizada por anticuerpo (portador para cromatografía)

35 Sobre una membrana de nitrocelulosa (Millipore) que se había cortado a un tamaño de 30 mm x 300 mm, se inmovilizó un anticuerpo de acuerdo con el siguiente procedimiento para preparar una membrana inmovilizada por anticuerpo. Se aplicó una solución de anticuerpo monoclonal MCM19 para la inmovilización (5 mg/ml) en una línea con una anchura de aproximadamente 1 mm, usando un revestidor (BioDot), en una posición de 16 mm desde uno

de los lados largos de la membrana como la parte inferior y se secó para preparar la membrana inmovilizada por anticuerpo.

(1-4) Construcción de kit para inmunocromatografía

5 La membrana inmovilizada por anticuerpo, la almohadilla que porta oro coloidal y una almohadilla absorbente (Pall corporation) se unieron a la lámina trasera adhesiva de modo que las piezas adyacentes se solapaban entre sí. La estructura solapada resultante se cortó a lo largo del lado largo con una anchura de 6 mm, usando un cortador, para preparar cintas de ensayo para la inmunocromatografía. Cada cinta de ensayo se puso en una carcasa de almacenamiento para preparar kits de ensayo para la inmunocromatografía.

(1-5) Procedimiento de ensayo

10 Se disolvieron cepas cultivadas, cepas lavadas con PBS, sobrenadantes de cultivo y sedimentos de cepas cultivadas con un tampón fosfato que contenía Triton X-100 para preparar antígeno (o cepa) de *Mycoplasma pneumoniae* para su ensayo a concentraciones predeterminadas. A cada kit inmunocromatográfico para ensayo, se añadió a gotas 100 µl de solución de antígeno (o cepa) de *Mycoplasma pneumoniae*. Después de los 15 minutos tras la adición, los
15 casos en los que se detectó un desarrollo a ojo en la posición sobre la cual se había revestido el anticuerpo de *anti-Mycoplasma-pneumoniae* de cada membrana inmovilizada por anticuerpo se consideraron como "positivo" y los casos en los que no se detectó desarrollo se consideraron como "negativo".

(2) Ensayo de sensibilidad

20 Las cepas de ensayo (1-1) en el Ejemplo 2 se aplicaron a la inmunocromatografía descrita anteriormente y una dilución de ensayo que mostró un desarrollo generado sobre la línea de ensayo y se usó una ampliación de dilución máxima para calcular el número de cada cepa. Los resultados se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8

Cepa	N.º ATCC	Número de cepa que muestra desarrollo por inmunocromatografía
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> FH	15531	3.1x10 ⁴
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> Bru	15377	9.8x10 ⁴
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> Mutante 22	39505	8.0x10 ⁴
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> Mac	15492	2.5x10 ⁴
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> M52	15293	2.5x10 ³
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> P11428	29085	3.5x10 ³
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> M129-B7	29342	3.8x10 ⁴
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> UTMB-10P	49894	2.3x10 ³

Se encontró a partir de los resultados que se muestran en la Tabla 8 que la sensibilidad frente a *Mycoplasma pneumoniae* fue de 10³ a 10⁴ ufc/ml mediante inmunocromatografía usando los anticuerpos monoclonales.

(3) Ensayo de reactividad cruzada

25 Cepas de ensayo (1-2) [el género *Mycoplasma* distinto de *Mycoplasma pneumoniae*, el género *Ureaplasma*, y el género *Acholeplasma* que se muestran en la Tabla 2] y las cepas de ensayo (1-3) [bacterias y hongos distintos que se muestran de la Tabla 3 a la Tabla 6] del Ejemplo 2 se aplicaron a la inmunocromatografía descrita anteriormente.

30 Todos los microorganismos distintos de *Mycoplasma genitalium* fueron negativos, es decir, no mostraron ningún desarrollo. Por el contrario, se detectó un desarrollo en *Mycoplasma genitalium*, y el número del mismo calculado a partir de una dilución de ensayo que mostró una ampliación de dilución máxima fue 6,9x10⁴ ufc/ml.

Como muestran estos resultados, se encontró que la inmunocromatografía que usaba los anticuerpos monoclonales mostró una reactividad cruzada a *Mycoplasma genitalium*, pero no mostró una reactividad cruzada a los otros microorganismos.

35 Como se ha descrito anteriormente, se confirmó que la inmunocromatografía no mostró una reactividad cruzada a muchas bacterias y hongos que podrían alterar el diagnóstico de una infección por *Mycoplasma pneumoniae* o *Mycoplasma genitalium*.

<<EJEMPLO 4: Evaluación de especímenes clínicos>>

Se recogieron hisopos faríngeos de 3 pacientes que se sospechaba que padecía infección por micoplasma y 33

personas sanas y se llevó a cabo una detección de *Mycoplasma pneumoniae* de acuerdo con la inmunocromatografía del Ejemplo 3. Como resultado, se observó una reacción positiva en los 3 pacientes que se sospechaba que padecía una infección por micoplasma y las 33 personas sanas dieron negativo, tal como se muestra en la Tabla 9.

5 Se extrajeron los ADN de los mismos pacientes de acuerdo con un procedimiento convencional y se llevó a cabo una detección génica de *Mycoplasma pneumoniae* usando un procedimiento modificado derivado de procedimiento de PCR cualitativo de Jensen y col. (APMIS. 1989;97(11): 1046-8.), en el cual parte de un gen de P1 de *Mycoplasma pneumoniae* M. *pneumoniae* M129-B7 número NCBI: NC_000912) se amplificó y ambos se compararon entre sí. Tanto los resultados positivos como negativos concordaron entre sí, tal como se muestra en la Tabla 9.

10

Tabla 9

		Inmunocromatografía		Total
		Positivo	Negativo	
PCR	Positivo	3	0	3
	Negativo	0	33	33
Total		3	33	36
Tasa de acuerdo positivo: 100 % (3/3)				
Tasa de acuerdo negativo: 100 % (33/33)				
Tasa de acuerdo global: 100 % (36/36)				

A continuación, se usaron los ADN derivados de las muestras que se mostraron positivas tanto en la inmunocromatografía y el procedimiento de PCR cualitativo, y se llevó a cabo una detección génica de *Mycoplasma genitalium* usando un procedimiento modificado derivado a partir del procedimiento de PCR cualitativo de Yoshida y col. (J Clin Microbiol. 2002; 40(4): 1451-5.) for *Mycoplasma genitalium*, en el cual parte de una región de ARNr de 16s de *Mycoplasma genitalium* (*M. genitalium* G7 número NCBI: L43967) se amplificó. Como resultado, el gen derivado de *Mycoplasma genitalium* no se detectó en ninguna de las muestras, tal como se muestra en la Tabla 10.

15

De esta manera, se confirmó que el gen derivado de *Mycoplasma genitalium* podría ampliarse mediante este procedimiento.

Tabla 10

Espécimen clínico	PCR de <i>M. genitalium</i>
Muestra A	-
Muestra B	-
Muestra C	-

20 Como se ha descrito anteriormente, se ha mostrado que el anticuerpo de la presente divulgación se usó para detectar específicamente *Mycoplasma pneumoniae*, y puede diagnosticarse una infección por micoplasma.

<<Ejemplo 5: Amplificación del gen de DnaK de cepas de cultivo de *Mycoplasma pneumoniae*>>

Como muestras a medir, se adquirieron 8 cepas de *Mycoplasma pneumoniae* de ATCC (*M. pneumoniae* FH: N.º ATCC 15531, *M. pneumoniae* Bru: N.º ATCC 15377, *M. pneumoniae* Mac: N.º ATCC 15492, *M. pneumoniae* Mutante 22: ATCC No.39505, *M. pneumoniae* M52: ATCC No.15293, *M. pneumoniae* PI1428: N.º ATCC 29085, *M. pneumoniae* M129-B7: N.º ATCC 29342 y *M. pneumoniae* UTMB-10P: N.º ATCC 49894) se usaron. Estas 8 cepas de *Mycoplasma pneumoniae* se cultivaron en un medio de PPLO y se extrajeron los ADN.

25

La extracción de ADN se llevó a cabo usando un kit de EX-R&D (Medical & Biological Laboratories), y cada ADN se suspendió en 10 mmol/l de Tris-HCl, 1 mmol/l de tampón de EDTA pH 8,0 (Nippon Gene)(en lo sucesivo en el presente documento denominado tampón de TE) y se criopreservó a -40 °C.

30

Con respecto a los ADN extraídos, el número de copias génicas se determinó mediante un PCR cuantitativo de micoplasma común para la región de ARNr de 16s. Cada ADN se diluyó con tampón de TE para preparar preparaciones diluidas 10 veces a partir de 2×10^5 a 2×10^0 copias/ μ l. Estos se usaron en la detección del gen de DnaK.

35 El PCR cuantitativo de micoplasma común para la región de ARNr de 16s se llevó a cabo del siguiente modo.

Los cebadores que eran comunes el género *Mycoplasma* para amplificar la región de ARNr de 16s se designaron y el número de copias génicas en cada ADN de *M. pneumoniae* extraído se calculó mediante un procedimiento de

PCR de tiempo real usando un patrón. El PCR de tiempo real se llevó a cabo usando LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche Applied Science).

Se usaron las siguientes secuencias de cebadores.

- 5 Genoma completo de *M. pneumoniae* M129-B7 n.º de registro GenBank NC_000912
 FmY4: 5'-TGGGGAGCAAA(C/T)AGGATTAG-3' (SEQ ID NO: 2) nt 119,081-119,100 20mer
 MGSO-2: 5'-CACCATCTGTCACTCTGTAACTC-3' (SEQ ID NO: 3) nt 119,332-119,356 25mer

Con respecto a las condiciones de PCR, se llevó a cabo una reacción a 95 °C durante 10 minutos y un ciclo compuesto de reacciones a 94 °C durante 10 segundos para desnaturalizar, a 60 °C durante 2 segundos para recocer y a 72 °C durante 12 segundos se repitió 50 veces.

- 10 Como el patrón, una serie diluida (10^7 , 10^5 , 10^3 , 10^2 , y 10^1 copias/ensayo) de pT7Blue T-Vector (Takara Bio) en el que parte del ARNr de 16s (771 pb: 302-1072 para ARNr de 16s) e *M. pneumoniae* (cepa M129) se recombinó y se usó. El número de copias del patrón se calculó basándose en las siguientes ecuaciones:

$$\text{Concentración de ADN } (\mu\text{g/ml}) = \text{ABS (260 nm)} \times 50$$

1 pmol de 1 kbp de ADN = 0,66 μg

[Math. 1]

15
$$\text{copia(copias/ml)} = \frac{1}{0,66} \times \left\{ \frac{1000\text{bp}}{L_p + L_r} \times (A_{260} \times 50) \times (6,02 \times 10^{23}) \right\} \times 10^{-12}$$

Lp: Longitud de plásmido

Lr: Longitud de ADN recombinante

- A continuación, el gen de DnaK de *Mycoplasma pneumoniae* se amplificó mediante PCR del siguiente modo. Con respecto al líquido de reacción de PCR, 25 μl de Premix EX Taq Hot Start Version (TaKaRa), 1 μl de 10pmol/ μl de cebador de sentido MpDnaK_S, y 1 μl de 10 pmol/ μl cebador antisentido MpDnaK_A se añadieron a 18 μl de agua destilada de Otsuka (Otsuka Pharmaceutical) para preparar 45 μl de una mezcla maestra y 5 μl de cada ADN extraído se añadieron a la mezcla maestra para ajustar el volumen total a 50 μl . El tampón de TE usó como un control negativo de PCR. Para amplificar el gen de DnaK que tiene una longitud completa de 1.788 pb, el cebador de sentido se designó a 81 pb corriente arriba 5' del codón de partida del gen de DnaK y el cebador antisentido se designó a 53 pb corriente abajo de 3' del codón de detención. De manera más particular, el cebador de sentido MpDnaK_S se correspondía con la secuencia de nucleótidos 521,756-521,782 de *M. pneumoniae* M129 (N.º de referencia de GenBank NC_000912), y el cebador antisentido MpDnaK A se correspondía con la secuencia de nucleótidos 523,655-523,677.

- 30 MpDnaK_S: 5'-CTCAAACGCTAAAAGTGCTAACG-3' 23mer (SEQ ID NO: 4)
 MpDnaK_A: 5'-AAACCATTATTACAGGTCAAATAAGAC-3' 27mer (SEQ ID NO: 5)

- 35 En la reacción de PCR, usando un Mastercycler (Eppendorf), un ciclo compuesto de reacciones a 94 °C durante 30 segundos para desnaturalizar, a 50 °C durante 30 segundos para recocer y a 72 °C durante 2 minutos se repitió 50 veces y finalmente se llevó a cabo una reacción a 72 °C durante 5 minutos. Después de la reacción de PCR, 5 μl de cada producto de PCR se sometió a electroforesis de 2 % de agarosa y el gel de agarosa se tiñó con bromuro de etidio y se irradió con luz ultravioleta para confirmar una banda amplificada de aproximadamente 1.900 pb.

Las 8 cepas de *Mycoplasma pneumoniae* preparadas anteriormente se examinaron para confirmar que todas las 8 cepas podrían amplificarse hasta 10^2 copias/ensayo.

<<Ejemplo 6: Reactividad cruzada a cepas de cultivo de micoplasma aisladas de humano>>

- 40 Como muestras a medir, 17 cepas de micoplasma adquiridas de ATCC (*M. genitalium*: N.º ATCC 33530, *M. hominis*: ATCC No.23114, *Ureaplasma parvum*: N.º ATCC 700970, *U. urealyticum*: N.º ATCC 27618, *M. fermentans*: N.º ATCC 19989, *Acholeplasma laidlawii*: N.º ATCC 23206, *A. oculi*: N.º ATCC 51735, *M. penetrans*: N.º ATCC 55252, *M. pirum*: N.º ATCC 25960, *M. orale*: N.º ATCC 23714, *M. salivarium*: N.º ATCC 23064, *M. arthritidis*: N.º ATCC 19611, *M. buccale*: N.º ATCC 23636, *M. faucium*: N.º ATCC 25293, *M. lipophilum*: N.º ATCC 27104, *M. primum*: N.º ATCC 25948 y *M. spermatophilum*: N.º ATCC 49695) se usaron. Estas 17 cepas de micoplasma se cultivaron en un medio de PPLO. Similar al Ejemplo 5, se extrajeron ADN, se determinó el número de copias génicas mediante PCR cuantitativo para la región de ARNr de 16s y cada ADN se diluyó a 2×10^5 copias/ μl .

Se repitieron los procedimientos descritos en el Ejemplo 5, excepto que las 17 cepas de *Mycoplasma* se usaron como muestras a medir, para llevar a cabo el PCR para el gen de DnaK de *Mycoplasma pneumoniae*, y no se detectó ninguna banda amplificada en ninguna de las 17 cepas. Puesto que no se detectó reactividad cruzada

cuando la concentración de la muestra de ADN era 10.000 veces de la del ADN capaz de amplificar el gen de DnaK de *M. pneumoniae*, se encontró que el PCR para el gen de DanK de *Mycoplasma pneumoniae* tenía una especificidad extremadamente alta.

<<Ejemplo 7: Amplificación del gen de DnaK de *Mycoplasma pneumoniae* a partir de especímenes clínicos>>

5 Como muestras a medir, ADN extraídos de 46 casos de especímenes clínicos positivos (40 casos de hisopos faríngeos, 2 casos de moco nasal, 1 caso de aspirados nasofaríngeos, y 3 casos de hisopos nasofaríngeos) y 30 casos de especímenes negativos (10 casos de hisopos nasofaríngeos de personas sanas, 10 casos de hisopo faríngeo de especímenes clínicos, 4 casos de moco nasal, 3 casos de aspirados nasofaríngeos y 3 casos de hisopos nasofaríngeos) se sometieron a ensayo mediante un PCR anidado para la región de gen de P1 de *Mycoplasma pneumoniae*, descrito en el apartado de "Mycoplasma pneumonia" del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, "Pathogen Detection Manual" pág. 1309-1344.

El PCR para el gen de DnaK de *Mycoplasma pneumoniae* se llevó a cabo para confirmar que el gen de DnaK se amplificó en todos los 46 casos del PCR de gen de P1 positivo. Por el contrario, el gen de DnaK no se amplificó en ninguno de los 30 casos del PCR de gen P1 negativo.

15

Tabla 11

		PCR de gen de DnaK		Total
		Positivo	Negativo	
PCR de gen de P1	Positivo	46	0	46
	Negativo	0	30	30
Total		46	30	76

<<Ejemplo 8: Análisis de la secuencia de nucleótidos del gen de DnaK a partir de cepas de cultivo y especímenes clínicos>>

20 Las secuencias de nucleótidos de productos de PCR a partir de las cepas de ATCC 8 del Ejemplo 5 y los 8 especímenes clínicos (7 casos de hisopos faríngeos y 1 caso de hisopos nasofaríngeos) del Ejemplo 7, en el cual se detectó la amplificación mediante el PCR del gen de DnaK, se determinaron usando BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems) y un 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

25 Como resultado, con respecto al gen de DnaK 1.788 pb, SEQ ID NO: 6), los productos de PCR de las 8 cepas de ATCC y los 8 especímenes clínicos concordaron absolutamente (100 %) entre sí y también concordaron absolutamente (100 %) con la cepa M129 (N.º de registro NC_000912) y cepa FH (N.º de registro CP002077) registrado en GenBank. El alineamiento entre la cepa M129 y la cepa FH se muestra en las Figuras 1 a 3.

30 Con respecto al gen de P1, se llevó a cabo una tipificación diferencial mediante un procedimiento de PCR-RLFP de acuerdo con la referencia: JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, 1996, pág. 447-449, Vol. 34, N.º 2, y las 8 cepas de ATCC del Ejemplo 5 se clasificaron en dos grupos. De manera más particular, 4 cepas que incluían M129-B7, M52, P11428 y Mutante 22 se clasificaron en Tipo I y las 4 cepas que incluían FH, Bru, Mac y UTMB-10P se clasificaron en Tipo II. El alineamiento entre la cepa M129 (SEQ ID NO: 7) y la cepa FH (SEQ ID NO: 8) como cepas típicas se muestra en las Figuras 4 a 10.

35 Se consideró a partir de estos resultados que los anticuerpos obtenidos no muestran diferencia en reactividad con respecto al genotipo, el lugar de recogida y el tiempo de recogida, puesto que los genes de DnaK que concuerdan absolutamente (100 %) entre sí, incluso entre cepas en las que los tipos del gen de P1 eran distintas y no se detectaron variaciones entre cepas recogidas a partir de diversos lugares y durante los últimos 50 años.

Aplicabilidad Industria

40 De acuerdo con la presente divulgación, Puede detectarse específicamente *Mycoplasma pneumoniae* y/o *Mycoplasma genitalium* con alta sensibilidad en especímenes tales como especímenes de hisopos orales, especímenes de hisopos de cavidad nasal, muestras de orina, tisulares o fluidos corporales o muestras derivadas de cultivo. En particular, la presente divulgación resulta importante para el diagnóstico de neumonía atípica causada por *Mycoplasma pneumoniae* o el diagnóstico de uretritis gonocócica y enfermedades de transmisión sexual causadas por *Mycoplasma genitalium*, y es industrialmente aplicable a la fabricación de productos farmacéuticos.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Mitsubishi Chemical Medience Corporation
- 45 <120> Procedimiento de detección de microorganismos que pertenecen a *Mycoplasma pneumoniae* y/o *Mycoplasma genitalium*

<130> MCM-867
 <150> JP 2009-276115
 <151> 04/12/2009
 5 <150> JP 2010-023102
 <151> 04/02/2010
 <160> 8
 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 10
 10 <212> PRT
 <213> Mycoplasma pneumoniae
 <400> 1

Ser	Thr	Asp	Asn	Gly	Leu	Ile	Ile	Gly	Ile
1				5					10

 15 <210> 2
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Mycoplasma pneumoniae
 <400> 2
 tggggagcaa ayaggattag 20
 20 <210> 3
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Mycoplasma pneumoniae
 <400> 3
 25 caccatctgt cactctgtta acctc 25
 <210> 4
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Mycoplasma pneumoniae
 30 <400> 4
 ctcaaacgct aaaagtgcta acg 23
 <210> 5
 <211> 27
 <212> ADN
 35 <213> Mycoplasma pneumoniae
 <400> 5
 aaaccattat tacaggtcaa ataagac 27
 <210> 6
 <211> 1788
 <212> ADN
 <213> Mycoplasma pneumoniae
 40 <400> 6

ES 2 694 511 T3

atgagtacag ataacggctt aattatcggc attgaccttg gtaccactaa ctccctgtgtg 60
 tcggatcatgg agaatggacg cccagtagtg ttggaaaacc ctgaaggtaa acgcaccacc 120
 ccttcgattg tttcttacia gaacaacgaa attattgtgg gtgatgctgc gaaacggcaa 180
 atggtaacta accctaatac tattgtttcc attaagcgtt taatgggtac ctccaataag 240
 gtaaccgta agaatcctga tggttctacc aaagagttaa ctccctgaaga ggtatcagcg 300
 caaatcttga gctacctcaa ggactatgcg gaaaagaaga ttggtaaaac gatttcccgt 360
 gctgttatta ccgtacctgc ttactttaac gatgcagaac ggaacgctac taaaaccgct 420
 ggtaagattg ctggtttaaa cgttgagcgg attattaacg aacctaccgc cgctgcattg 480
 gcttatggga tcgacaagtc taaccgagaa atgaaagtct tgggtgtacga ccttgggtggt 540
 ggtacctttg acgtttcctt acttgacatt gctgaaggta ccttcgaagt attagccact 600
 gctggggaca accgtttggg tggatgatgc tgggacaaca agattattga gttcatctta 660
 gcgcacattg cccaagaaca caatgggctt aacttgtcca atgacaagat ggctatgcaa 720
 cgcttaaag aagcggctga acgtgctaag attgaacttt ccgcccaact agaagcaatt 780
 atctctttac cgttcttaac ggttaccgaa aagggtccgg taaacggtga acttaagcta 840
 acccgtgcta agtttgaaga aattaccaa caattactag aacgtactcg caacccaatt 900
 tcggatgttt tacgtgaagc caagattaaa ccagaagaaa ttaatgaaat cttgttggtg 960
 ggtggatcga cccggatgcc agcagtgcaa aaactagtgg aatcaatggt accaggacac 1020
 agtccaaacc gctcaattaa cccggatgag gtggtagcca ttgggtgctgc catccaaggg 1080
 ggtgtgttac gcggtgatgt aaaggacgtg ttactgttgg acgttactcc tttaacgctc 1140
 tcgattgaaa cccttgggtg ttagcaact ccgttaatta agcgtaacac caccattcct 1200
 gtaagtaaga gtcaaatctt ctctacagcg caagacaacc aagaatcagt ggatgtggtg 1260
 gtttgtcaag ggaacgccc aatggcacgt gacaacaagt ctttgggtcg ctttaactta 1320
 gggggcatcc aaccagcacc caagggtaaa ccccaaattg aaattacctt tagcttggac 1380
 gccaacggga tcttaaacgt gaaggctaaa gatttaacca ctcaaaagga aacagatt 1440
 actattagt acaacggcaa ctgtccgaa gaggaatcc aaaagatgat tcgtgatgcg 1500
 gaagccaaca aggagcgtga caatgtgatt cgtgaacgca ttgagctccg taacgaaggt 1560
 gaaagcatcg tgagcacgat taaggagatt ctccaaagtc ccgaagcgaa ggacttcct 1620
 aaagaagaga aggaaaaact cgacaagatt accggtggta ttgatgcagc aattaaggcc 1680
 aatgactaca ccaagttaaa agccgaaatc gaaaacttca agaagtgaag ggaagaaatg 1740
 gccaaagaat acaaccctaa cggggatcaa ggtcaaccag cacaataa 1788

<210> 7

ES 2 694 511 T3

<211> 4884
 <212> ADN
 <213> Mycoplasma pneumoniae

<400> 7

atgcaccaaaa ccaaaaaaaaaac tgccttgtcc aagtccactt ggatttctcat cctcaccgcc 60
 accgcctccc tcgcgacggg actcaccgta gtgggacact tcacaagtac caccacgacg 120
 ctcaagcgcc agcaatttag ctacaccgcg cctgacgagg tcgcgctgcg ccacaccaat 180
 gccatcaacc cgcgcttaac cccgtgaacg tatcgtaaca cgagcttttc ctccctcccc 240
 ctcacgggtg aaaatcccgg ggcgtgggcc ttagtgcgcg acaacagcgc taagggcatc 300
 actgccggca gtggcagtca acaaaccacg tatgatccca cccgaaccga agcggctttg 360
 accgcatcaa ccacctttgc gttacgccgg tatgacctcg ccggggcgcg cttatacgac 420
 ctcgattttt cgaagttaa cccgcaaacg cccacgcgcg accaaaccgg gcagatcacc 480
 ttttaaccctt ttggcggctt tggtttgagt ggggctgcac cccaacagtg aaacgaggtc 540
 aaaaacaagg tccccgtcga ggtggcgcaa gaccctcca atccctaccg gtttgccggt 600
 ttactcgtgc cgcgcagcgt ggtgtactat gagcagttgc aaagggggtt gggcttacca 660
 cagcagcgaa ccgagagtgg tcaaaatact tccaccaccg gggcaatggt tggcttgaag 720
 gtgaagaacg ccgagggcga caccgcaag agcaatgaaa aactccaggg cgctgaggcc 780
 actggttctt caaccacatc tggatctggc caatccacc aacgtggggg ttcgctcaggg 840
 gacaccaaag tcaaggcttt aaaaatagag gtgaaaaaga aatcggactc ggaggacaat 900
 ggtcagctgc agttagaaaa aatgatctc gccaacgctc ccattaagcg gagcgaggag 960
 tcgggtcagt ccgtccaact caaggcggac gattttggta ctgccctttc cagttcggga 1020
 tcaggcggca actccaatcc cggttcccc accccctgaa ggccgtggct tgcgactgag 1080
 caaattcaca aggacctccc caaatgatcc gcctcgatcc tgattctgta cgatgcgcct 1140
 tatgcgcgca accgtaccgc cattgaccgc gttgatcact tggatcccaa ggccatgacc 1200
 gcgaactatc cgcccagttg aagaacgccc aagtgaaacc accacggttt gtgggactga 1260
 aaggcgcgcg atgttttgct ccaaaccacc gggttcttca acccgcgccg ccaccccgag 1320
 tggtttgatg gcgggcagac ggtcgcggat aacgaaaaga ccggggttga tgtggataac 1380
 tctgaaaaaca ccaagcaggg ctttcaaaag gaagctgact ccgacaagtc ggccccgatc 1440
 gccctcccgt ttgaagcgta cttcgccaac attggcaacc tcacctggtt cgggcaagcg 1500
 cttttggtgt ttggtggcaa tggccatggt accaagtcgg cccacaccgc gcctttgagt 1560
 ataggtgtct ttagggtgcy ctataatgca actggtacca gtgctactgt aactggttga 1620
 ccatatgcct tactgttctc aggcattggtc aacaacaaa ctgacggggtt aaaggatcta 1680

5

ES 2 694 511 T3

ccctttaaca ataaccgctg gtttgaatat gtaccacgga tggcagttgc tggcgctaag 1740
 ttcgttggta gggaaactcgt tttagcgggt accattacca tgggtgatac cgctaccgta 1800
 cctcgcttac tgtacgatga acttgaaagc aacctgaact tagtagcgca aggccaaggt 1860
 cttttacgcg aagacttgca actcttcaca ccctacggat gagccaatcg tccggattta 1920
 ccaatcgggg cttgaagtag tagtagtagt agtagtcaca acgcacccta ctacttcac 1980
 aataaccccg attgacaaga ccgtccaatc caaatgtgg ttgatgcctt tattaagccc 2040
 tgagaggaca agaacggtaa ggatgatgcc aaatacatct acccttaccg ttacagtggc 2100
 atgtgagctt gacaggtata caactggtcc aataagctca ctgaccaacc attaagtgtc 2160
 gactttgtca atgagaatgc ttaccaacca aactccttgt ttgctgctat tctcaatccg 2220
 gaattgtag cagctcttcc cgacaagggt aaatacggta aggaaaacga gtttgctgct 2280
 aacgagtacg agcgctttaa ccagaagtta acggtagctc ctaccaagc aacaaactga 2340
 tcccacttct cccccacgct tccccgttc tccaccgggt tcaaccttgt ggggtcggtg 2400
 ctcgaccagc tgttggatta tgtgccctgg attgggaatg ggtacaggta tggcaataac 2460
 caccggggcg tggatgatat aaccgcgct caaaccagc cggggtcgct cagcgggaatt 2520
 agtacgaaca caagtggttc gcgttccttt ctcccagcgt tttccaacat cggcgtcggc 2580
 ctcaaagcga atgtccaagc caccctcggg ggcagtcaga cgatgattac aggcggttcg 2640
 cctcgaagaa ccctcgacca agccaacctc cagctctgaa cgggggcggg gtgaaggaat 2700
 gataaggctt caagtggaca aagtacgaa aaccacacca agttcacgag cgctacgggg 2760
 atggaccagc agggacaatc aggtacctcc gcggggaatc ccgactcgtt aaagcaggat 2820
 aatattagta agagtgggga tagtttaacc acgcaggacg gcaatgcgat cgatcaacaa 2880
 gaggccacca actacaccaa cctccccccc aacctcacc ccaccgctga ttgaccgaac 2940
 gcgctgtcat tcaccaacaa gaacaacgcg cagcgcgccc agctcttct cgcgggcttg 3000
 ttgggcagca tcccgggtgtt ggtgaatcga agtgggtccg attccaacaa attccaagcc 3060
 accgacaaa aatggtccta caccgactta cattcgacc aaaccaaact gaacctcccc 3120
 gcttacggtg aggtgaatgg gttgttgaat ccggcgttgg tggaaaccta ttttgggaac 3180
 acgcgagcgg gtggttcggg gtccaacacg accagttcac ccggtatcgg ttttaaaatt 3240
 cccgaacaaa ataatgattc caaagccacc ctgatcacc ccgggttggc ttgaacgccc 3300
 caggacgtcg gtaacctcgt tgtcagtggc accacggtga gcttccagct cggcgggtgg 3360
 ctggtcacct tcacggactt tgtcaaacc cgcgcgggtt acctcggctt ccagttaacg 3420
 ggcttgatg caagtgatgc gacgcagcgc gccctcattt gggccccccg gccctgagcg 3480
 gcctttcgtg gcagttgggt caaccggtt ggccgcgtgg agagtgtgtg ggatttgaag 3540
 ggggtgtggg cggatcaagc tcagtcagc tcgcaaggat ctaccaccac cgcaacaagg 3600
 aacgccttac cggagcacc gaatgctttg gcctttcagg tgagtgtggt ggaagcgagt 3660

ES 2 694 511 T3

gcttacaagc caaacacgag ctccggccaa acccaatcca ctaacagttc cccctacctg 3720
 cacttggtga agcctaagaa agttacccaa tccgacaagt tagacgacga tcttaaaaac 3780
 ctggttgacc ccaaccaggt tcgcaccaag ctgcgccaaa gctttggtac agaccattcc 3840
 acccagcccc agccccaatc gctcaaaaca acgacaccgg tatttgggac gagtagtggt 3900
 aacctcagta gtgtgcttag tgggtgggggt gctggagggg gttcttcagg ctccaggtcaa 3960
 tctggcgtgg atctctcccc cgttgaaaaa gtgagtgggt ggcttgtggg gcagttacca 4020
 agcagcagtg acggaaacac ctctccacc aacaacctcg cgcctaatac taatacgggg 4080
 aatgatgtgg tgggggttgg tcgactttct gaaagcaacg ccgcaaagat gaatgacgat 4140
 gttgatggta ttgtacgcac cccactcgct gaactgtag atggggaagg acaaacagct 4200
 gacactggtc cacaaagcgt gaagttcaag tctcctgacc aaattgactt caaccgcttg 4260
 tttaccacc cagtcaccga tctgtttgat ccggttaacta tgttggtgta tgaccagtac 4320
 ataccgctgt ttattgatat ccagcaagt gtgaacccta aaatggttcg tttaaaggtc 4380
 ttgagctttg acaccaacga acagagctta ggtctccgct tagagttctt taaacctgat 4440
 caagataccc aaccaaacia caacgttcag gtcaatccga ataacgggta cttcttacca 4500
 ctgttaacgg cctccagtca aggtcccaa accttgttta gtccgtttaa ccagtgcact 4560
 gattacgtgt tgccgtagc gatcactgta cctattgttg tgattgtgct cagtgttacc 4620
 ttaggacttg ccattggaat cccaatgcac aagaacaaac aggcttgaa ggctggggtt 4680
 gcgctatcaa accaaaagg t gatgtggtg accaaagcgg ttggtagtgt ctttaaggaa 4740
 atcattaacc gcacaggtat cagtcaagcg ccaaacgct tgaacaaac cagtgcggct 4800
 aaaccaggag caccccgcc accagtacca ccaaagccag gggctcctaa gccaccagtg 4860
 caaccaccta aaaaaccgc ttag 4884

<210> 8
 <211> 4905
 <212> ADN
 <213> Mycoplasma pneumoniae
 <400> 8

5

ES 2 694 511 T3

atgcaccaaa ccaaaaaaac tgccttgcc aagtccactt ggattctcat cctcaccgcc	60
accgcctccc tcgcgacggg actcaccgta gtgggacact tcacaagtac caccacgacg	120
ctcaagcgcc agcaatttag ctacaccgac cctgacgagg tcgcgctgcg ccacaccaat	180
gccatcaacc cgcgcttaac cccgtgaacg tatcgtaaca cgagcttttc ctccctcccc	240
ctcacgggtg aaaatcccgg ggcgtgggcc ttagtgcgcg acaacagcgc taagggcatc	300
actgccggca gtggcagtca acaaccacg tatgatccca cccgaaccga agcggctttg	360
accgcatcaa ccacctttgc gttacgccgg tatgacctcg ccgggcgcg cttatacgac	420
ctcgatTTTT cgaagttaaa cccgcaaacg cccacgcgcg accaaaccgg gcagatcacc	480

ES 2 694 511 T3

ttttaaccct ttggcggctt tggtttgagt ggggctgcac cccaacagtg aaacgaggtc 540
 aaaaacaagg tccccgtcga ggtggcgcaa gaccctcca atccttatcg gtttgccggt 600
 ttactcgtgc cgcgtagcgt ggtgtactat gagcagttgc agcgggggtt agcgcctccct 660
 aaccaaggga gttcgtcagg ctcagacagc actaaccaaa caggcgcaat gtttggttg 720
 aaggtgaagg atgcaaccgt ggatagttcg aagcaatcaa cggaaagctt aaagggcgaa 780
 gaatcgagtt ccagttccac cacatcttcc acctccacca cccaacgtgg gggttcgtca 840
 aatgaaaaca aagtcaaggc gttgcaggtg gcggtgaaaa agaaatccgg gagtcagggc 900
 aactccggtg accaaggcac cgaacaggtg gaacttgaat ctaatgattt agccaacgcc 960
 ccgattaaac ggggctccaa taacaaccag caagtccaac tcaaggcgga cgattttggt 1020
 actgcccctt ccagttcggg atcaggcacc caagatggca cccccacccc ctgaacgccg 1080
 tggttaacga ctgagcaaat tcacaacgac cccgccaaat tcgccgcctc gatcctgatt 1140
 ctgtacgatg cgccttatgc gcgcaaccgt accgccattg accgcggtga tcaacttgat 1200
 cccaaggcca tgaccgcgaa ctatccgccc agttgaagaa cgcccaagtg aaaccaccac 1260
 ggtttgtggg actgaaaggc gcgcgatggt ttgctccaaa ccaccgggtt cttcaaccgg 1320
 cgccgccacc ccgagtgggt tgatggcggg cagacggtcg cggataacga aaagaccggg 1380
 tttgatgtgg ataactctga aaacaccaag cagggtttc aaaaggaagc tgactccgac 1440
 aagtccggccc cgatcgccct cccgtttgaa gcgtacttcg ccaacattgg caacctcacc 1500
 tggttcgggc aagcgctttt ggtgtttggg ggcaatggcc atgttacca gtcggccac 1560
 accgcgctt tgagtatagg tgtctttagg gtgcgctata atgcaactgg taccagtgt 1620
 actgtaactg gttgaccata tgccctactg ttctcaggca tggccaacaa acaaactgac 1680
 gggttaaaga atctaccctt taacaataac cgctggtttg aatatgtacc acggatggca 1740
 gttgctggcg ctaagttcgt tggtagggaa ctcgttttag cgggtaccat taccatgggt 1800
 gataccgcta ccgtacctcg cttactgtac gatgaacttg aaagcaacct gaacttagta 1860
 gcgcaaggcc aaggtctttt acgcaagac ttgcaactct tcacacccta cggatgagcc 1920
 aatcgtccgg atttaccat cggggcttga agtagtagta gtagtagtca caacgcaccc 1980
 tactacttcc acaataaccc cgattgacaa gaccgtccaa tccaaagtgt ggttgatgcc 2040
 tttattaagc cctgagagga caagaacggg aaggatgatg ccaataacat ctacccttac 2100
 cgttacagtg gcatgtgagc ttgacaggtg tacaactggt ccaataagct cactgaccaa 2160
 ccattaagtg ctgactttgt caatgagaat gcttaccac caaactcctt gtttgctgct 2220
 attctcaatc cggaattggt agcagctctt cccgacaagg ttaaatacgg taaggaaaac 2280
 gagtttgctg ctaacgagta cgagcgcttt aaccagaagt taacggtagc tcctacccaa 2340
 ggaacaaact gatcccactt ctccccacg ctttccggtt tctccaccgg gttcaacctt 2400

ES 2 694 511 T3

gtggggtcgg tgctcgacca ggtgttgat tatgtgccct ggattgggaa tgggtacagg 2460
 tatggcaata accaccgggg cgtggatgat ataaccgcgc ctcaaaccag cgcggggtcg 2520
 tccagcggaa ttagtacgaa cacaagtggg tcgcgttcct ctctcccgac gttttccaac 2580
 atcggcgtcg gcctcaaagc gaatgtccaa gccaccctcg ggggcagtca gacgatgatt 2640
 acagggcgtt cgctcgaag aaccctcgac caagccaacc tccagctctg aacggggggcg 2700
 ggggtgaagga atgataaggc ttcaagtgga caaagtgacg accacaccaa gttcacgagc 2760
 gctacgggga tgggccagca ggaacaatca ggtacctccg cggggaatcc cgactcgta 2820
 aagcaggata agattagtaa gagtggggat agtttaacca cgcaggacgg caatgcatg 2880
 gatcaacaag aggccaccaa ctacaccaac ctcccccca acctacccc caccgctgat 2940
 tgaccgaacg cgctgtcatt caccaacaag aacaacgcgc agcgcgcca gctgttcctg 3000
 cggggcctgt tgggcagcat cccggtgttg gttaataagt cgggccaaga tgataacagt 3060
 aagtttaagg cggaggacca aaaatggtcc tacaccgact tacagtcgga ccaaaccaaa 3120
 ctgaacctcc ccgcttacgg tgaggtgaat ggggtgttga atccggcgtt ggtggaaacc 3180
 tattttggga acacgcgagc gagtggttcg gggccaaca cgaccagttc acccggatc 3240
 ggttttaaaa ttcccgaaca aagtggcaca aacacaacgt cgaaggctgt gctgatcacc 3300
 cccgggttgg cttgaacgcc gcaagacgtt ggtaacctcg ttgtcagtgg caccagcttc 3360
 agcttccagc tcggcgggtg gttagttacg ttcacggact ttatcaaacc ccgcgctggt 3420
 tacctcgggc tccagttaac gggcttggat gcaagtgatg cgacgcagcg cgctctcatt 3480
 tgggcccccc ggccctgagc ggcctttcgt ggcagttggg tcaaccggtt gggccgcgtg 3540
 gagagtgtgt gggatttgaa ggggtgtgg gcgatcaag ctcagtcgga ctcgcaagga 3600
 tctaccacca ccgcaacaag ggacgcctta ccggagcacc cgaatgcttt ggcctttcag 3660
 gtgagtgtgg tggaaagcag tgcttacaag ccaaacacga gctccggcca aaccaatcc 3720
 actaacagtt cccctacct gcacttgggt aagcctaaga aagttatcca atccgacaag 3780
 ttagacgacg atcttaaaaa cctgttggac cccaaccagg ttcgcaccaa gctgcgcaa 3840
 agctttggtg cagaccattc caccagccc cagcccaat cgctcaaac aacgacaccg 3900
 gtatttggga cgagtagtgg taacctcagt agtgtgctta gtggtggggg tgctggaggg 3960
 ggttcttcag gctcaggtca atctggcgtg gatctctccc ccggtgaaaa agtgagtggg 4020
 tggcttgtgg ggcagttacc aagcacgagt gacggaaca cctcctccac caacaacctc 4080
 ggcctaata ctaatacggg gaatgatgtg gtgggggttg gtcgactttc tgaaagcaac 4140
 gccgcaaaga tgaacgacga tgttgatggt attgtacgca cccactcgc tgaactgta 4200
 gatggggaag gacaaacagc tgacactggt ccacaaagcg tgaagttcaa gtctcctgac 4260
 caaattgact tcaaccgctt gttaccac ccagtcaccg atctgtttga tccggtaact 4320
 atgttgggtg atgaccagta cataccgctg tttattgata tcccagcaag tgtgaaccct 4380

ES 2 694 511 T3

aaaatggttc gtttaaaggt cttgagcttt gacaccaacg aacagagctt aggtctccgc	4440
ttagagttct ttaaacctga tcaagatacc caaccaaaca acaacgttca ggtcaatccg	4500
aataacggtg acttcttacc actgttaacg gcctccagtc aaggtcccca aaccttgttt	4560
agtccgttta accagtgacc tgattacgtg ttgccgtag cgatcactgt acctattggt	4620
gtgattgtgc tcagtgttac cttaggactt gccattgga tcccaatgca caagaacaaa	4680
caggccttga aggctgggtt tgcgctatca aaccaaaggt ttgatgtggt gaccaaagcg	4740
gttggtagtg tctttaagga aatcattaac cgcacaggta tcagtcaagc gccaaaacgc	4800
ttgaaacaaa ccagtgcggc taaaccagga gcaccccgcc caccagtacc accaaagcca	4860
ggggctccta agccaccagt gcaaccacct aaaaaacccg cttag	4905

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento *in vitro* para detectar *Mycoplasma pneumoniae* o *Mycoplasma genitalium*, **caracterizado por** el uso de DnaK de *Mycoplasma pneumoniae* o *Mycoplasma genitalium* como un indicador, en el que el procedimiento comprende el uso de un anticuerpo anti-DnaK específico de *Mycoplasma pneumoniae* y *Mycoplasma genitalium* para detectar *Mycoplasma pneumoniae* o *Mycoplasma genitalium*.
2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que la proteína de DnaK se analiza inmunológicamente.
3. Un uso *in vitro* de un anticuerpo de anti-DnaK específico de *Mycoplasma pneumoniae* y *Mycoplasma genitalium* para detectar *Mycoplasma pneumoniae* o *Mycoplasma genitalium*.
- 10 4. Un uso *in vitro* de un kit para detectar *Mycoplasma pneumoniae* o *Mycoplasma genitalium*, en el que el kit comprende el anticuerpo anti-DnaK según la reivindicación 3.

Figura 1

M129_DnaK	ATGAGTACAGATAACGGCTTAATTATCGGCATTGACCTTGGTACCACTAACTCCTGTGTG	60
FH_DnaK	ATGAGTACAGATAACGGCTTAATTATCGGCATTGACCTTGGTACCACTAACTCCTGTGTG	60

M129_DnaK	TCGGTCATGGAGAATGGACGCCAGTAGTGTGGAAAACCTGAAGGTAACGCACCACC	120
FH_DnaK	TCGGTCATGGAGAATGGACGCCAGTAGTGTGGAAAACCTGAAGGTAACGCACCACC	120

M129_DnaK	CCTTCGATTGTTTCTTACAAGAACAACGAAATTATTGTGGGTGATGCTGCGAAACGGCAA	180
FH_DnaK	CCTTCGATTGTTTCTTACAAGAACAACGAAATTATTGTGGGTGATGCTGCGAAACGGCAA	180

M129_DnaK	ATGGTAACTAACCCCTAATACTATTGTTCCATTAAGCGTTAATGGGTACCTCCAATAAG	240
FH_DnaK	ATGGTAACTAACCCCTAATACTATTGTTCCATTAAGCGTTAATGGGTACCTCCAATAAG	240

M129_DnaK	GTAACCGTTAAGAATCCTGATGGTCTACCAAAGAGTAACTCCTGAAGAGGTATCAGCG	300
FH_DnaK	GTAACCGTTAAGAATCCTGATGGTCTACCAAAGAGTAACTCCTGAAGAGGTATCAGCG	300

M129_DnaK	CAAATCTTGAGCTACCTCAAGGACTATGCGGAAAAGAAGATTGGTAAAACGATTTCCCGT	360
FH_DnaK	CAAATCTTGAGCTACCTCAAGGACTATGCGGAAAAGAAGATTGGTAAAACGATTTCCCGT	360

M129_DnaK	GCTGTTATTACCGTACCTGCTTACTTTAACGATGCAGAACGGAACGCTACTAAAACCGCT	420
FH_DnaK	GCTGTTATTACCGTACCTGCTTACTTTAACGATGCAGAACGGAACGCTACTAAAACCGCT	420

M129_DnaK	GGTAAGATTGCTGGTTTAAACGTTGAGCGGATTATTAACGAACCTACCGCCGCTGCATTG	480
FH_DnaK	GGTAAGATTGCTGGTTTAAACGTTGAGCGGATTATTAACGAACCTACCGCCGCTGCATTG	480

M129_DnaK	GCTTATGGGATCGACAAGTCTAACCGAGAAATGAAAGTCTTGGTGTACGACCTTGGTGGT	540
FH_DnaK	GCTTATGGGATCGACAAGTCTAACCGAGAAATGAAAGTCTTGGTGTACGACCTTGGTGGT	540

M129_DnaK	GGTACCTTTGACGTTTCCTTACTTGACATTGCTGAAGGTACCTTCGAAGTATTAGCCACT	600
FH_DnaK	GGTACCTTTGACGTTTCCTTACTTGACATTGCTGAAGGTACCTTCGAAGTATTAGCCACT	600

M129_DnaK	GCTGGGGACAACCGTTTGGGTGGTGTACTGGGACAACAAGATTATTGAGTTCATCTTA	660
FH_DnaK	GCTGGGGACAACCGTTTGGGTGGTGTACTGGGACAACAAGATTATTGAGTTCATCTTA	660

M129_DnaK	GCGCACATTGCCAAGAACACAATGGGCTTAACTTGCCAATGACAAGATGGCTATGCAA	720
FH_DnaK	GCGCACATTGCCAAGAACACAATGGGCTTAACTTGCCAATGACAAGATGGCTATGCAA	720

Figura 2

M129_DnaK	CGCTTAAAGGAAGCGGCTGAACGTGCTAAGATTGAACTTTCGCCCCAACTAGAAGCAATT	780
FH_DnaK	CGCTTAAAGGAAGCGGCTGAACGTGCTAAGATTGAACTTTCGCCCCAACTAGAAGCAATT	780

M129_DnaK	ATCTCTTACC GTTCTTAACGGTTACCGAAAAGGGTCCGGTAAACGTTGAACTTAAGCTA	840
FH_DnaK	ATCTCTTACC GTTCTTAACGGTTACCGAAAAGGGTCCGGTAAACGTTGAACTTAAGCTA	840

M129_DnaK	ACCCGTGCTAAGTTTGAAGAAATTACCAAACAATTACTAGAACGTA CTGCAACCCAATT	900
FH_DnaK	ACCCGTGCTAAGTTTGAAGAAATTACCAAACAATTACTAGAACGTA CTGCAACCCAATT	900

M129_DnaK	TCGGATGTTTTACGTGAAGCCAAGATTAACCAGAAGAAATTAATGAAATCTTGTGGTG	960
FH_DnaK	TCGGATGTTTTACGTGAAGCCAAGATTAACCAGAAGAAATTAATGAAATCTTGTGGTG	960

M129_DnaK	GGTGGATCGACCCGGATGCCAGCAGTGCAAAAAGTGGAAATCAATGGTACCAGGACAC	1020
FH_DnaK	GGTGGATCGACCCGGATGCCAGCAGTGCAAAAAGTGGAAATCAATGGTACCAGGACAC	1020

M129_DnaK	AGTCCAAACCGCTCAATTAACCCGGATGAGGTGGTAGCCATTGGTGTGCCATCCAAGGG	1080
FH_DnaK	AGTCCAAACCGCTCAATTAACCCGGATGAGGTGGTAGCCATTGGTGTGCCATCCAAGGG	1080

M129_DnaK	GGTGTGTTACGCGGTGATGTAAGGACGTGTACTGTTGGACGTTACTCCTTTAACGCTC	1140
FH_DnaK	GGTGTGTTACGCGGTGATGTAAGGACGTGTACTGTTGGACGTTACTCCTTTAACGCTC	1140

M129_DnaK	TCGATTGAAACCCCTTGGTGGTGTAGCAACTCCGTTAATTAAGCGTAACACCACCATTCT	1200
FH_DnaK	TCGATTGAAACCCCTTGGTGGTGTAGCAACTCCGTTAATTAAGCGTAACACCACCATTCT	1200

M129_DnaK	GTAAGTAAGAGTCAAATCTTCTCTACAGCGCAAGACAACCAAGAATCAGTGGATGTGGTG	1260
FH_DnaK	GTAAGTAAGAGTCAAATCTTCTCTACAGCGCAAGACAACCAAGAATCAGTGGATGTGGTG	1260

M129_DnaK	GTTTGTCAAGGGGAACGCCCAATGGCACGTGACAACAAGTCTTTGGGTCGCTTTAACTTA	1320
FH_DnaK	GTTTGTCAAGGGGAACGCCCAATGGCACGTGACAACAAGTCTTTGGGTCGCTTTAACTTA	1320

M129_DnaK	GGGGGCATCCAACAGCACCCAAGGTAACCCCAAATTGAAATTACCTTTAGCTTGGAC	1380
FH_DnaK	GGGGGCATCCAACAGCACCCAAGGTAACCCCAAATTGAAATTACCTTTAGCTTGGAC	1380

M129_DnaK	GCCAACGGGATCTTAAACGTGAAGGCTAAAGATTTAACCACTCAAAGGAAAACAGTATT	1440
FH_DnaK	GCCAACGGGATCTTAAACGTGAAGGCTAAAGATTTAACCACTCAAAGGAAAACAGTATT	1440

Figura 3

M129_DnaK	ACTATTAGTGACAACGGCAACTTGTCGGAAGAGGAAATCCAAAAGATGATTCGTGATGCG	1500
FH_DnaK	ACTATTAGTGACAACGGCAACTTGTCGGAAGAGGAAATCCAAAAGATGATTCGTGATGCG	1500

M129_DnaK	GAAGCCAACAAGGAGCGTGACAATGTGATTCGTGAACGCATTGAGCTCCGTAACGAAGGT	1560
FH_DnaK	GAAGCCAACAAGGAGCGTGACAATGTGATTCGTGAACGCATTGAGCTCCGTAACGAAGGT	1560

M129_DnaK	GAAAGCATCGTGAGCACGATTAAGGAGATTCTCAAAGTCCCGAAGCGAAGGACTCCCT	1620
FH_DnaK	GAAAGCATCGTGAGCACGATTAAGGAGATTCTCAAAGTCCCGAAGCGAAGGACTCCCT	1620

M129_DnaK	AAAGAAGAGAAGGAAAACTCGACAAGATTACCGGTGGTATTGATGCAGCAATTAAGGCC	1680
FH_DnaK	AAAGAAGAGAAGGAAAACTCGACAAGATTACCGGTGGTATTGATGCAGCAATTAAGGCC	1680

M129_DnaK	AATGACTACACCAAGTTAAAAGCCGAAATCGAAACTTCAAGAAGTGAAGGAAGAAATG	1740
FH_DnaK	AATGACTACACCAAGTTAAAAGCCGAAATCGAAACTTCAAGAAGTGAAGGAAGAAATG	1740

M129_DnaK	GCCAAGAAGTACAACCCTAACGGGGATCAAGGTCAACCAGCACAATAA	1788
FH_DnaK	GCCAAGAAGTACAACCCTAACGGGGATCAAGGTCAACCAGCACAATAA	1788

ES 2 694 511 T3

Figura 4

M129_P1	ATGCACCAAACCAAAAAAAGCTGCCTGTGCCAAGTCCACTTGGATTCTCATCCTCACCGCC	60
FH_P1	ATGCACCAAACCAAAAAAAGCTGCCTGTGCCAAGTCCACTTGGATTCTCATCCTCACCGCC	60

M129_P1	ACCGCCTCCCTCGCGACGGGACTCACCGTAGTGGGACACTTACAAGTACCACCACGACG	120
FH_P1	ACCGCCTCCCTCGCGACGGGACTCACCGTAGTGGGACACTTACAAGTACCACCACGACG	120

M129_P1	CTCAAGCGCCAGCAATTTAGCTACACCCGCCCTGACGAGGTGCGGCTGCGCCACACCAAT	180
FH_P1	CTCAAGCGCCAGCAATTTAGCTACACCCGCCCTGACGAGGTGCGGCTGCGCCACACCAAT	180

M129_P1	GCCATCAACCCGCGCTTAACCCCGTGAACGTATCGTAACACGAGCTTTCTCCCTCCCC	240
FH_P1	GCCATCAACCCGCGCTTAACCCCGTGAACGTATCGTAACACGAGCTTTCTCCCTCCCC	240

M129_P1	CTCACGGGTGAAAATCCCGGGCGTGGGCCTTAGTGGCGACAACAGCGCTAAGGGCATC	300
FH_P1	CTCACGGGTGAAAATCCCGGGCGTGGGCCTTAGTGGCGACAACAGCGCTAAGGGCATC	300

M129_P1	ACTGCCGGCAGTGGCAGTCAACAAACCACGTATGATCCACCCGAACCGAAGCGGCTTTG	360
FH_P1	ACTGCCGGCAGTGGCAGTCAACAAACCACGTATGATCCACCCGAACCGAAGCGGCTTTG	360

M129_P1	ACCGCATCAACCACCTTTGCGTTACGCCGTATGACCTCGCCGGGCGCGCCTTATACGAC	420
FH_P1	ACCGCATCAACCACCTTTGCGTTACGCCGTATGACCTCGCCGGGCGCGCCTTATACGAC	420

M129_P1	CTCGATTTTTCGAAGTTAAACCCGCAAACGCCACGCGGACCAAAACCGGGCAGATCACC	480
FH_P1	CTCGATTTTTCGAAGTTAAACCCGCAAACGCCACGCGGACCAAAACCGGGCAGATCACC	480

M129_P1	TTTAACCCCTTTGGCGGCTTTGGTTTGAGTGGGGCTGCACCCCAACAGTAAAACGAGGTC	540
FH_P1	TTTAACCCCTTTGGCGGCTTTGGTTTGAGTGGGGCTGCACCCCAACAGTAAAACGAGGTC	540

M129_P1	AAAAACAAGGTCCCGTCGAGGTGGCGCAAGACCCCTCCAATCCCTACCGGTTGCGGTT	600
FH_P1	AAAAACAAGGTCCCGTCGAGGTGGCGCAAGACCCCTCCAATCCCTACCGGTTGCGGTT	600
***** ** *****		
M129_P1	TTACTCGTGCCGCGCAGCGTGGTGTACTATGAGCAGTTGCAAAGGGGGTTGGGCTTACCA	660
FH_P1	TTACTCGTGCCGCGTAGCGTGGTGTACTATGAGCAGTTGCAAGGGGGTTAGCGCTCCCT	660
***** * * * *		
M129_P1	CAGCAGCGAACCGAGAGTGGTCAAATACTTCCACC---ACCGGGCAATGTTGGGCTTG	717
FH_P1	AACCAAGGGAGTTCGTAGGCTCAGACAGCACTAACCAAACAGGCGCAATGTTGGGCTTG	720
* * * * * * * * * * * * * * * * * *		

Figura 5

M129_P1	AAGGTGAAGAACGCCGAGGCGACACCGGAAG—AGCAATGAAAACTCCA—GGGCGCT	774
FH_P1	AAGGTGAAGGATGCAACCGTGGATAGTTCAAGCAATCAACGGAAAGCTTAAAGGGCGAA	780
	***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
M129_P1	GAGGCCACTGGTCTTCAACCACATCTGGATCTGGCCAATCCACCAACGTGGGGGTTCTG	834
FH_P1	GAATCGAGTTCAGTTCACCACATCT—TCCACCTCCACCACCAACGTGGGGGTTCTG	837
	* *	
M129_P1	TCAGGGACACCAAAGTCAAGGCTTTAAAAATAGAGGTGAAAAAGAAATC—GGACTCGG	892
FH_P1	TCAAATGAAAACAAAGTCAAGGCGTTCAGTGGCGGTGAAAAAGAAATCCGGGAGTCAG	897
	** *	
M129_P1	AG—————GACAATGGTCAGTGCAGTTAGAAAAAATGATCTCGCCAAC	936
FH_P1	GGCAACTCCGGTGACCAAGGCACCGAACAGTGGAACTGAATCTAATGATTTAGCCAAC	957
	* *	
M129_P1	GCTCCATTAAGCGGAGCGAGGAGTGGGTCAGTCCGTCCTCAACTCAAGCGGACGATTTT	996
FH_P1	GCCCCGATTAACGGGGCTCCAATAACAACCAGCAAGTCCAACTCAAGCGGACGATTTT	1017
	* *	
M129_P1	GGTACTGCCCTTCCAGTTCGGGATCAGGCGCAACTCCAATCCCGTTCACCCACCCC	1056
FH_P1	GGTACTGCCCTTCCAGTTCGGGATCAGGCA—————CCCAAGATGGCACCCCAACCCC	1071
	***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
M129_P1	TGAAGCCGTGGCTTGGGACTGAGCAAATTCACAAGGACCTCCCAATGATCCGCCTCG	1116
FH_P1	TGAACGCGTGTTAACGACTGAGCAAATTCACAAGCAGCGCAATTCGCGCCTCG	1131
	***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
M129_P1	ATCCTGATTCTGTACGATGCGCCTTATGCGCGCAACCGTACCGCCATTGACCGGTTGAT	1176
FH_P1	ATCCTGATTCTGTACGATGCGCCTTATGCGCGCAACCGTACCGCCATTGACCGGTTGAT	1191
	***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
M129_P1	CATTGGATCCCAAGGCCATGACCGCAACTATCCGCCCAGTTGAAGAAGCAGTGAAGTGA	1236
FH_P1	CATTGGATCCCAAGGCCATGACCGCAACTATCCGCCCAGTTGAAGAAGCAGTGAAGTGA	1251
	***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
M129_P1	AACCACCACGGTTGTGGGACTGAAAGGCGCGGATGTTTTGCTCCAACACCCGGGTTT	1296
FH_P1	AACCACCACGGTTGTGGGACTGAAAGGCGCGGATGTTTTGCTCCAACACCCGGGTTT	1311
	***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
M129_P1	TTCAACCGCGCCGCCACCCGAGTGGTTTGTGGGGCAGACGGTCGCGGATAACGAA	1356
FH_P1	TTCAACCGCGCCGCCACCCGAGTGGTTTGTGGGGCAGACGGTCGCGGATAACGAA	1371
	***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
M129_P1	AAGACCGGTTTGTGTTGATAACTCTGAAAACACCAAGCAGGCTTTCAAAGGAAGCT	1416
FH_P1	AAGACCGGTTTGTGTTGATAACTCTGAAAACACCAAGCAGGCTTTCAAAGGAAGCT	1431
	***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	

Figura 6

M129_P1	GACTCCGACAAGTCGGCCCCGATCGCCCTCCCGTTTGAAGCGTACTTCGCCAACATTGGC	1476
FH_P1	GACTCCGACAAGTCGGCCCCGATCGCCCTCCCGTTTGAAGCGTACTTCGCCAACATTGGC	1491

M129_P1	AACCTCACCTGGTTCGGGCAAGCGCTTTTGGTGTGGTGGCAATGGCCATGTTACCAAG	1536
FH_P1	AACCTCACCTGGTTCGGGCAAGCGCTTTTGGTGTGGTGGCAATGGCCATGTTACCAAG	1551

M129_P1	TCGGCCACACCGCGCCTTTGAGTATAGGTGTCTTTAGGGTGGCTATAATGCAACTGGT	1596
FH_P1	TCGGCCACACCGCGCCTTTGAGTATAGGTGTCTTTAGGGTGGCTATAATGCAACTGGT	1611

M129_P1	ACCAGTGCTACTGTAAGTGGTTGACCATATGCCTTACTGTTCTCAGGCATGGTCAACAAA	1656
FH_P1	ACCAGTGCTACTGTAAGTGGTTGACCATATGCCTTACTGTTCTCAGGCATGGTCAACAAA	1671

M129_P1	CAAAGTACCGGTTAAAGGATCTACCCTTTAACAATAACCGCTGGTTTGAATATGTACCA	1716
FH_P1	CAAAGTACCGGTTAAAGAATCTACCCTTTAACAATAACCGCTGGTTTGAATATGTACCA	1731

M129_P1	CGGATGGCAGTTGCTGGCGCTAAGTTCGTTGGTAGGGAACCGTTTTAGCGGGTACCATT	1776
FH_P1	CGGATGGCAGTTGCTGGCGCTAAGTTCGTTGGTAGGGAACCGTTTTAGCGGGTACCATT	1791

M129_P1	ACCATGGGTGATACCGCTACCGTACCTCGCTTACTGTACGATGAACTTCAAAGCAACCTG	1836
FH_P1	ACCATGGGTGATACCGCTACCGTACCTCGCTTACTGTACGATGAACTTCAAAGCAACCTG	1851

M129_P1	AACTTAGTAGCGCAAGGCCAAGGTCTTTACGCGAAGACTTGCAACTCTTACACCCTAC	1896
FH_P1	AACTTAGTAGCGCAAGGCCAAGGTCTTTACGCGAAGACTTGCAACTCTTACACCCTAC	1911

M129_P1	GGATGAGCCAATCGTCCGATTACCAATCGGGGCTTGAAGTAGTAGTAGTAGTAGT	1956
FH_P1	GGATGAGCCAATCGTCCGATTACCAATCGGGGCTTGAAGTAGTAGTAGTAGTA---GT	1968
***** **		
M129_P1	CACAACGCACCCTACTACTTCCACAATAACCCCGATTGACAAGACCGTCCAATCCAAAAT	2016
FH_P1	CACAACGCACCCTACTACTTCCACAATAACCCCGATTGACAAGACCGTCCAATCCAAAGT	2028
***** *		
M129_P1	GTGGTTGATGCCTTTATTAAGCCCTGAGAGGACAAGAACGGTAAGGATGATGCCAAATAC	2076
FH_P1	GTGGTTGATGCCTTTATTAAGCCCTGAGAGGACAAGAACGGTAAGGATGATGCCAAATAC	2088

M129_P1	ATCTACCCTTACCGTTACAGTGGCATGTGAGCTTGACAGGTATAACAAGTGGTCCAATAAG	2136
FH_P1	ATCTACCCTTACCGTTACAGTGGCATGTGAGCTTGACAGGTATAACAAGTGGTCCAATAAG	2148

Figura 7

M129_P1	CTCACTGACCAACCATTAAGTGTGACTTTGTCAATGAGAATGCTTACCAACCAAACTCC	2196
FH_P1	CTCACTGACCAACCATTAAGTGTGACTTTGTCAATGAGAATGCTTACCAACCAAACTCC	2208

M129_P1	TTGTTTGTGCTATTCTCAATCCGGAATTGTTAGCAGCTCTTCCCACAAGGTTAAATAC	2256
FH_P1	TTGTTTGTGCTATTCTCAATCCGGAATTGTTAGCAGCTCTTCCCACAAGGTTAAATAC	2268

M129_P1	GGTAAGGAAAACGAGTTTGTGCTAACGAGTACGAGCGCTTTAACAGAAGTTAACGGTA	2316
FH_P1	GGTAAGGAAAACGAGTTTGTGCTAACGAGTACGAGCGCTTTAACAGAAGTTAACGGTA	2328

M129_P1	GCTCCTACCCAAGGAACAAACTGATCCCACTTCTCCCCACGCTTCCCGTTTCTCCACC	2376
FH_P1	GCTCCTACCCAAGGAACAAACTGATCCCACTTCTCCCCACGCTTCCCGTTTCTCCACC	2388

M129_P1	GGGTTCAACCTTGTGGGGTCGGTCTCGACCAGGTGTTGGATTATGTGCCCTGGATTGGG	2436
FH_P1	GGGTTCAACCTTGTGGGGTCGGTCTCGACCAGGTGTTGGATTATGTGCCCTGGATTGGG	2448

M129_P1	AATGGGTACAGGTATGGCAATAACCACCGGGCGTGGATGATATAACCGGCCTCAAACC	2496
FH_P1	AATGGGTACAGGTATGGCAATAACCACCGGGCGTGGATGATATAACCGGCCTCAAACC	2508

M129_P1	AGCGCGGGTTCGTCCAGCGGAATTAGTACGAACACAAGTGGTTCGCGTTCCTTCTCCCG	2556
FH_P1	AGCGCGGGTTCGTCCAGCGGAATTAGTACGAACACAAGTGGTTCGCGTTCCTTCTCCCG	2568
***** *****		
M129_P1	ACGTTTCCAACATCGGGCTCGGCCTCAAAGCGAATGTCCAAGCCACCCTCGGGGCAGT	2616
FH_P1	ACGTTTCCAACATCGGGCTCGGCCTCAAAGCGAATGTCCAAGCCACCCTCGGGGCAGT	2628

M129_P1	CAGACGATGATTACAGGCGGTTGCCTCGAAGAACCCTCGACCAAGCCAACCTCCAGCTC	2676
FH_P1	CAGACGATGATTACAGGCGGTTGCCTCGAAGAACCCTCGACCAAGCCAACCTCCAGCTC	2688

M129_P1	TGAACGGGGCGGGGTGAAGGAATGATAAGGCTTCAAGTGGACAAAGTGACGAAAACCAC	2736
FH_P1	TGAACGGGGCGGGGTGAAGGAATGATAAGGCTTCAAGTGGACAAAGTGACGA—CCAC	2745
***** ****		
M129_P1	ACCAAGTTCACGAGCGCTACGGGGATGGACCAGCAGGACAATCAGGTACCTCCGCGGGG	2796
FH_P1	ACCAAGTTCACGAGCGCTACGGGGATGGGCCAGCAGGAACAATCAGGTACCTCCGCGGGG	2805
***** ***** *****		
M129_P1	AATCCCGACTCGTTAAAGCAGGATAATATTAGTAAGAGTGGGGATAGTTTAAACCACGCAG	2856
FH_P1	AATCCCGACTCGTTAAAGCAGGATAAGATTAGTAAGAGTGGGGATAGTTTAAACCACGCAG	2865
***** *****		

Figura 8

M129_P1	GACGGCAATGCGATCGATCAACAAGAGGCCACCAACTACACCAACCTCCCCCAACCTC	2916
FH_P1	GACGGCAATGCGATGGATCAACAAGAGGCCACCAACTACACCAACCTCCCCCAACCTC	2925

M129_P1	ACCCCACCGCTGATTGACCGAACGCGCTGTCATTACCAACAAGAACAACGCGCAGCGC	2976
FH_P1	ACCCCACCGCTGATTGACCGAACGCGCTGTCATTACCAACAAGAACAACGCGCAGCGC	2985

M129_P1	GCCCAGCTCTTCTCCGCGGCTTGTGGGCAGCATCCCGGTGTTGGTGAATCGAAGTGGG	3036
FH_P1	GCCCAGCTGTTCTCGCGGCTTGTGGGCAGCATCCCGGTGTTGGTGAATCGAAGTGGG	3045

M129_P1	TCCGATTCCAACA--AATCCAAGCCACCGACCAAAAATGGTCTACACCGACTTACAT	3093
FH_P1	CAAGATGATAACAGTAAGTTAAGGCGGAGGACCAAAAATGGTCTACACCGACTTACAG	3105
	*** ** * * * ** *****	
M129_P1	TCGGACCAACCAACTGAACCTCCCGCTTACGGTGAGGTGAATGGGTTGTTGAATCCG	3153
FH_P1	TCGGACCAACCAACTGAACCTCCCGCTTACGGTGAGGTGAATGGGTTGTTGAATCCG	3165

M129_P1	GCGTTGGTGGAAACCTATTTTGGGAACACGCGAGCGGGTGGTTCGGGGTCCAACACGACC	3213
FH_P1	GCGTTGGTGGAAACCTATTTTGGGAACACGCGAGCGAGTGGTTCGGGGTCCAACACGACC	3225

M129_P1	AGTTCACCCGGTATCGGTTTTAAATTCCCGAACAAAATA-----ATGAT-TCCAAA	3264
FH_P1	AGTTCACCCGGTATCGGTTTTAAATTCCCGAACAAAGTGGCACAAACACAACGTGGAAG	3285
	***** * * * **	
M129_P1	GCCACCCTGATCACCCCGGGTTGGCTTGAACGCCAGGACGTCGGTAACCTCGTTGTC	3324
FH_P1	GCTGTGCTGATCACCCCGGGTTGGCTTGAACGCCAGGACGTCGGTAACCTCGTTGTC	3345
	** *****	
M129_P1	AGTGGCACCACGGTGAGCTTCCAGCTCGGCGGGTGGCTGGTCACCTTACGGACTTTGTC	3384
FH_P1	AGTGGCACCAGCTTCCAGCTCGGCGGGTGGTACGTTACGTTACGGACTTTATC	3405
	***** * *****	
M129_P1	AAACCCCGCGGGTTACCTCGGTCTCAGTTAACGGGCTTGGATGCAAGTATGCGACG	3444
FH_P1	AAACCCCGCGTGGTTACCTCGGGCTCAGTTAACGGGCTTGGATGCAAGTATGCGACG	3465

M129_P1	CAGCGCGCCCTCATTTGGGCCCGGCCCTGAGCGGCCTTTCGTGGCAGTTGGGTC AAC	3504
FH_P1	CAGCGCGCTCATTTGGGCCCGGCCCTGAGCGGCCTTTCGTGGCAGTTGGGTC AAC	3525

M129_P1	CGGTTGGGCCGCGTGGAGAGTGTGTGGGATTTGAAGGGGTGTGGGCGGATCAAGCTCAG	3564
FH_P1	CGGTTGGGCCGCGTGGAGAGTGTGTGGGATTTGAAGGGGTGTGGGCGGATCAAGCTCAG	3585

Figura 9

M129_P1	TCCGACTCGCAAGGATCTACCACCACCGCAACAAGGAACGCCTTACCGGAGCACCCGAAT	3624
FH_P1	TCCGACTCGCAAGGATCTACCACCACCGCAACAAGGGACGCCTTACCGGAGCACCCGAAT	3645

M129_P1	GCTTTGGCCTTTCAGGTGAGTGTGGTGGGAAGCGAGTGCTTACAAGCCAAACACGAGCTCC	3684
FH_P1	GCTTTGGCCTTTCAGGTGAGTGTGGTGGGAAGCGAGTGCTTACAAGCCAAACACGAGCTCC	3705

M129_P1	GGCCAAACCCAATCCACTAACAGTTCGCCCTACCTGCACCTGGTGAAGCCTAAGAAAGTT	3744
FH_P1	GGCCAAACCCAATCCACTAACAGTTCGCCCTACCTGCACCTGGTGAAGCCTAAGAAAGTT	3765

M129_P1	ACCCAATCCGACAAGTTAGACGACGATCTTAAAAACCTGTTGGACCCCAACCAGGTTGCG	3804
FH_P1	ATCCAATCCGACAAGTTAGACGACGATCTTAAAAACCTGTTGGACCCCAACCAGGTTGCG	3825
	* *****	
M129_P1	ACCAAGCTGCGCCAAAGCTTTGGTACAGACCATTCCACCCAGCCCAGCCCAATCGCTC	3864
FH_P1	ACCAAGCTGCGCCAAAGCTTTGGTACAGACCATTCCACCCAGCCCAGCCCAATCGCTC	3885

M129_P1	AAAAACACGACACCGGTATTTGGGACGAGTAGTGGTAACCTCAGTAGTGTGCTTAGTGGT	3924
FH_P1	AAAAACACGACACCGGTATTTGGGACGAGTAGTGGTAACCTCAGTAGTGTGCTTAGTGGT	3945

M129_P1	GGGGGTGCTGGAGGGGTTCTTCAGGCTCAGGTCAATCTGGCGTGGATCTCTCCCCGTT	3984
FH_P1	GGGGGTGCTGGAGGGGTTCTTCAGGCTCAGGTCAATCTGGCGTGGATCTCTCCCCGTT	4005

M129_P1	GAAAAAGTGAGTGGGTGGCTTGTGGGGCAGTTACCAAGCAGAGTGACGGAAACACCTCC	4044
FH_P1	GAAAAAGTGAGTGGGTGGCTTGTGGGGCAGTTACCAAGCAGAGTGACGGAAACACCTCC	4065

M129_P1	TCCACCAACAACCTCGGCCTAATACTAATAACGGGAATGATGTGGTGGGGGTTGGTCTGA	4104
FH_P1	TCCACCAACAACCTCGGCCTAATACTAATAACGGGAATGATGTGGTGGGGGTTGGTCTGA	4125

M129_P1	CTTCTGAAAGCAACGCCGCAAAGATGAATGACGATGTTGATGGTATTGTACGCACCCCA	4164
FH_P1	CTTCTGAAAGCAACGCCGCAAAGATGAACGACGATGTTGATGGTATTGTACGCACCCCA	4185

M129_P1	CTCGCTGAACTGTTAGATGGGGAAGGACAAACAGCTGACACTGGTCCACAAAGCGTGAAG	4224
FH_P1	CTCGCTGAACTGTTAGATGGGGAAGGACAAACAGCTGACACTGGTCCACAAAGCGTGAAG	4245

M129_P1	TTCAAGTCTCCTGACCAAATTGACTTCAACCGCTTGTTACCCACCCAGTCACCGATCTG	4284
FH_P1	TTCAAGTCTCCTGACCAAATTGACTTCAACCGCTTGTTACCCACCCAGTCACCGATCTG	4305

Figura 10

M129_P1	TTTGATCCGGTAACTATGTTGGTGTATGACCAGTACATACCGCTGTTTATTGATATCCCA	4344
FH_P1	TTTGATCCGGTAACTATGTTGGTGTATGACCAGTACATACCGCTGTTTATTGATATCCCA	4365

M129_P1	GCAAGTGTGAACCCCTAAAATGGTTCGTTTAAAGGTCTTGAGCTTTGACACCAACGAAACAG	4404
FH_P1	GCAAGTGTGAACCCCTAAAATGGTTCGTTTAAAGGTCTTGAGCTTTGACACCAACGAAACAG	4425

M129_P1	AGCTTAGGTCTCCGCTTAGAGTTCCTTTAAACCTGATCAAGATACCCAACCAAAACAACAAC	4464
FH_P1	AGCTTAGGTCTCCGCTTAGAGTTCCTTTAAACCTGATCAAGATACCCAACCAAAACAACAAC	4485

M129_P1	G TTCAGGTCAATCCGAATAACGGTGACTTCTTACCACTGTTAACGGCCTCCAGTCAAGGT	4524
FH_P1	G TTCAGGTCAATCCGAATAACGGTGACTTCTTACCACTGTTAACGGCCTCCAGTCAAGGT	4545

M129_P1	CCCCAAACCTTGTTTAGTCCGTTTAAACCAGTGACCTGATTACGTGTTGCCGTTAGCGATC	4584
FH_P1	CCCCAAACCTTGTTTAGTCCGTTTAAACCAGTGACCTGATTACGTGTTGCCGTTAGCGATC	4605

M129_P1	ACTGTACCTATTGTTGTGATTGTGCTCAGTGTTACCTTAGGACTTGCCATTGGAATCCCA	4644
FH_P1	ACTGTACCTATTGTTGTGATTGTGCTCAGTGTTACCTTAGGACTTGCCATTGGAATCCCA	4665

M129_P1	ATGCACAAGAACAACAGGCCTTGAAGGCTGGGTTTGCCTATCAAACCAAAAAGGTTGAT	4704
FH_P1	ATGCACAAGAACAACAGGCCTTGAAGGCTGGGTTTGCCTATCAAACCAAAAAGGTTGAT	4725

M129_P1	GTGTTGACCAAAGCGGTTGGTAGTGTCTTTAAGGAAATCATTAAACCGCACAGGTATCAGT	4764
FH_P1	GTGTTGACCAAAGCGGTTGGTAGTGTCTTTAAGGAAATCATTAAACCGCACAGGTATCAGT	4785

M129_P1	CAAGCGCCAAAACGCTTGAACAACACAGTGCGGCTAAACCAGGAGCACCCCGCCACCA	4824
FH_P1	CAAGCGCCAAAACGCTTGAACAACACAGTGCGGCTAAACCAGGAGCACCCCGCCACCA	4845

M129_P1	GTACCACCAAAGCCAGGGGCTCCTAAGCCACCAGTGCAACCACCTAAAAAACCCGCTTAG	4884
FH_P1	GTACCACCAAAGCCAGGGGCTCCTAAGCCACCAGTGCAACCACCTAAAAAACCCGCTTAG	4905
