

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 746 565**

51 Int. Cl.:

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.04.2013** E 16166865 (2)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.07.2019** EP 3093667

54 Título: **Procedimiento y kit para la detección inmunológica de complejo de Mycobacterium tuberculosis**

30 Prioridad:

05.04.2012 JP 2012086566

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

06.03.2020

73 Titular/es:

**TAUNS CO., LTD. (100.0%)
761-1, Kamishima
Izunokuni-shi, Shizuoka 410-2325, JP**

72 Inventor/es:

**NONAKA, URAO y
KITAGAWA, TOSHIYUKI**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 746 565 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 y kit para la detección inmunológica de complejo de *Mycobacterium tuberculosis*

Campo técnico

5 La presente divulgación se refiere a un procedimiento altamente seguro y a un kit para la detección inmunológica de un complejo de *Mycobacterium tuberculosis* que puede realizarse conveniente y rápidamente directamente a partir de una muestra biológica que contiene el complejo de *Mycobacterium tuberculosis* sin operación de cultivo por tratamiento térmico de la muestra biológica a una temperatura predeterminada y detectando inmunológicamente una proteína secretora específica del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* secretada extracelularmente de este modo.

Antecedentes de la técnica

10 La tuberculosis es actualmente una enfermedad infecciosa de gran importancia, que se dice que mata a miles de personas en Japón y millones de personas en todo el mundo cada año. En Japón, una persona que se sospecha que tiene infección por tuberculosis debe ser hospitalizada de acuerdo con la Ley de Enfermedades Infecciosas. El médico debe informar inmediatamente a la autoridad cuando haya diagnosticado a un paciente con tuberculosis y, por tanto, se requieren respuestas rápidas.

15 *Mycobacterium tuberculosis* (tipo humano de la bacteria de la tuberculosis), *Mycobacterium bovis* (tipo bovino de la bacteria de la tuberculosis), *Mycobacterium microti* (tipo murino de la bacteria de la tuberculosis) y *Mycobacterium africanum* (tipo africano de la bacteria de la tuberculosis), que pertenecen al complejo de *Mycobacterium tuberculosis*, son conocidas como bacterias ácidoresistentes patógenas para los seres humanos. *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium marinum* y similares se conocen como micobacterias no tuberculosas.

20 La infección humana con el complejo de *Mycobacterium tuberculosis* es provocada principalmente por *Mycobacterium tuberculosis* y, en algunos casos raros, por *Mycobacterium bovis*. Los casos de infección con *Mycobacterium avium*, entre las micobacterias no tuberculosas, han aumentado en los últimos años. Puesto que ambas infecciones presentan síntomas clínicos similares, la identificación del microbio causante también es importante para determinar las pautas de tratamiento.

25 Por tanto, la detección diferencial de la infección tuberculosa o la infección por micobacterias no tuberculosas también es importante para reducir las cargas en los pacientes y realizar un tratamiento temprano adecuadamente. En otro aspecto, la detección diferencial también es importante con el fin de evitar que una tercera persona tenga una infección secundaria desde el punto de vista de la salud pública.

30 Hasta ahora, se han puesto en práctica procedimientos de detección basados en el cultivo como procedimientos para detectar el complejo de *Mycobacterium tuberculosis*. Dichos procedimientos de cultivo se realizan inoculando una muestra biológica que se ha de someter a ensayo en un medio líquido o un medio sólido y detectando las células bacterianas cultivadas. El procedimiento que usa el medio líquido conlleva un alto riesgo de infección secundaria durante la operación y, por tanto, requiere una instalación y un aparato altamente seguros, aunque este procedimiento puede acortar el período de cultivo de la muestra biológica que se ha de someter a ensayo. El procedimiento que usa el medio sólido requiere un período tan largo como de aproximadamente 2 meses para obtener resultados de detección. El complejo de *Mycobacterium tuberculosis* debe cultivarse usando un aparato altamente seguro en un entorno altamente seguro, con gran cuidado para prevenir la infección secundaria.

35 Como procedimiento para identificar el complejo de *Mycobacterium tuberculosis* a partir del cultivo de la muestra biológica cultivada anteriormente, se conoce un procedimiento de detección conveniente que implica analizar inmunológicamente una proteína específica del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* secretada en el medio.

40 La Patente japonesa abierta a inspección pública N.º 11-108931 desvela un procedimiento para detectar la presencia de un complejo de *Mycobacterium tuberculosis*, que comprende: inocular una muestra biológica recogida de un paciente con tuberculosis, a un medio sólido o un medio líquido; cultivar el complejo de *Mycobacterium tuberculosis* durante de algunos días a algunas semanas; y después detectar inmunológicamente una proteína secretora específica del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* MPB64 secretada en el medio. De acuerdo con esta referencia, este procedimiento permite la identificación y detección del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* inmediatamente después del cultivo y reduce el riesgo de infección secundaria durante la operación, en comparación con los procedimientos convencionales.

45 Sin embargo, este procedimiento implica cultivar el complejo de *Mycobacterium tuberculosis* contenido en la muestra biológica y usar los cultivos resultantes como muestra. Por tanto, el procedimiento requiere casi la misma cantidad de tiempo que el período de cultivo hasta que se detecta e identifica el complejo de *Mycobacterium tuberculosis* y, por tanto, requiere una enorme mano de obra y gasto.

50 Como se describe en la Patente japonesa abierta a inspección pública N.º 11-108931, MPB64 es una proteína

secretora específica del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* que es producida por *Mycobacterium bovis* BCG (*M. bovis* BCG) y se secreta extracelularmente. MPT64 es una proteína secretora específica del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* producida por *Mycobacterium tuberculosis* y se secreta extracelularmente. MPB64 y MPT64 se conocen como sustancias idénticas.

5 La Patente japonesa abierta a inspección pública N.º 2002-62299 indica que la proteína secretora específica del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* MPT64 puede detectarse mediante ensayo inmunológico sin cultivar un complejo de *Mycobacterium tuberculosis* contenido en una muestra biológica. Este procedimiento implica tratar una muestra biológica tal como el esputo y detectar MPT64 contenida en la muestra biológica de manera que se detecte la presencia del complejo de *Mycobacterium tuberculosis*.

10 Sin embargo, incluso si el complejo de *Mycobacterium tuberculosis* está presente en la muestra biológica, este procedimiento no puede detectar el complejo de *Mycobacterium tuberculosis* a menos que MPB64 se secrete extracelularmente por el complejo de *Mycobacterium tuberculosis* y esté contenida en la muestra biológica. Además, una pequeña abundancia de MPT64, aunque se secrete, requiere una gran cantidad de muestra biológica y complica la operación. Esto plantea mayores cargas para los sujetos de ensayo y las personas a cargo de los
15 ensayos. Al mismo tiempo, la infección con el complejo de *Mycobacterium tuberculosis* puede pasarse por alto, dando como resultado problemas de salud pública.

La Publicación internacional N.º WO 2009/084481 desvela un procedimiento para diagnosticar la infección por tuberculosis de forma más rápida y segura con mayor precisión que nunca, que comprende detectar específicamente MPB64 en una muestra biológica usando un anticuerpo contra un epítipo particular en MPB64. De
20 acuerdo con este procedimiento, una muestra aplicable puede ser cultivos obtenidos mediante el cultivo de una muestra biológica usando una pequeña cantidad de un medio líquido solo durante un tiempo antes de que las células bacterianas del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* comiencen sustancialmente a crecer.

Sin embargo, este procedimiento todavía exige un procedimiento para promover la secreción de MPB64 de las células bacterianas antes del crecimiento, de manera que se acumule una mayor cantidad de MPB64 en el medio.

25 **Documentos técnicos convencionales**

Documentos de patente

- Documento de Patente 1: Patente japonesa abierta a inspección pública N.º 11-108931
- Documento de Patente 2: Patente japonesa abierta a inspección pública N.º 2002-62299
- Documento de Patente 3: Publicación internacional N.º WO 2009/084481

30 El documento EP 2 226 635 A1 desvela un procedimiento para detectar específicamente antígeno de la proteína secretora específica del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* MPT64 en una muestra biológica. Se obtuvo un anticuerpo que reconoce un epítipo para MPB64, en particular un anticuerpo monoclonal. Por tanto, se proporciona un inmunoensayo que usa el anticuerpo, en particular un inmunoensayo de tipo sándwich que usa los anticuerpos primero y segundo contra MPB64, en particular un ensayo inmunocromatográfico y una tira de ensayo
35 inmunocromatográfica. La muestra biológica puede pretratarse por tratamiento para la inactivación de *Mycobacterium tuberculosis* o tratamiento por dispersión o solubilización.

El documento WO 97/34149 A1 desvela un procedimiento de diagnóstico de enfermedad micobacteriana provocada por *Mycobacterium tuberculosis* en un paciente. En una muestra de heces, esputo u orina de dicho paciente, se determina la presencia de un antígeno micobacteriano seleccionado entre el grupo que consiste en
40 lipoarabinomananos (LAM), arabinomananos (AM) y fragmentos de LAM y AM, por ejemplo, mediante el uso de anticuerpos policlonales o monoclonales dirigidos contra dicho antígeno micobacteriano, y un ensayo que detecta complejos antígeno/anticuerpo formados. La muestra de heces, esputo u orina puede pretratarse por esterilización térmica. El documento EP 0 273 333 A2 desvela un procedimiento de detección inmunológica de *Mycobacterium*.

Sumario de la invención

45 **Problemas que se han de resolver por la invención**

Como se ha descrito anteriormente, los procedimientos convencionales requieren mucho tiempo para detectar un complejo de *Mycobacterium tuberculosis* y también requieren una enorme mano de obra y gasto. Por estas razones, no pueden realizarse un diagnóstico definitivo y un inicio temprano del tratamiento para la tuberculosis. Por tanto, existe la demanda de un procedimiento más rápido. Además, la detección directa de una muestra biológica no
50 puede realizarse si la muestra biológica no contiene o contiene una cantidad muy pequeña de MPT64. Como resultado, la infección con el complejo de *Mycobacterium tuberculosis* puede pasarse por alto. Por tanto, existe la necesidad de un procedimiento de detección más fiable. Un objeto de la presente invención es resolver estos problemas proporcionando un procedimiento conveniente, rápido y más fiable para detectar un complejo de *Mycobacterium tuberculosis*.

55 **Medios para resolver los problemas**

Los presentes inventores han realizado estudios diligentes para resolver los problemas anteriores y, en consecuencia, descubrieron que los problemas pueden resolverse por tratamiento térmico de una muestra biológica que contiene un complejo de *Mycobacterium tuberculosis* para secretar extracelularmente una proteína secretora específica del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* tal como MPB64 y detectar la proteína secretada de este modo y, como resultado, completar la presente invención.

La presente invención proporciona el uso de un aparato de ensayo inmunológico para detectar una proteína secretora específica del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* secretada en un recipiente de tratamiento para la detección de un complejo de *Mycobacterium tuberculosis*, siendo dicho recipiente de tratamiento uno en el que una muestra biológica que puede contener el complejo de *Mycobacterium tuberculosis* se somete a tratamiento térmico a una temperatura de 40 °C a 55 °C durante al menos 15 minutos y como máximo 2,5 horas para secretar extracelularmente la proteína específica del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* del complejo de *Mycobacterium tuberculosis*.

Las realizaciones preferidas se definen en las reivindicaciones dependientes 2-8.

Sumario de otros aspectos desvelados

De acuerdo con un aspecto, la presente divulgación proporciona un procedimiento para detectar un complejo de *Mycobacterium tuberculosis*, que comprende someter una proteína específica del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* a un ensayo inmunológico, en el que dicha proteína se secreta extracelularmente sometiendo una muestra biológica que contiene el complejo de *Mycobacterium tuberculosis* a un tratamiento térmico. De acuerdo con otro aspecto, la presente divulgación también proporciona un kit para la detección de un complejo de *Mycobacterium tuberculosis*, que comprende al menos un recipiente de tratamiento en el que una muestra biológica que contiene el complejo de *Mycobacterium tuberculosis* se somete a un tratamiento térmico y un aparato de ensayo inmunológico para detectar una proteína secretora específica del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* secretada por el tratamiento térmico, como kit para la detección de un complejo de *Mycobacterium tuberculosis* con el fin de realizar el procedimiento anterior. El kit puede comprender adicionalmente un agente de tratamiento de muestra y/o un disolvente. El procedimiento de detección y el kit de la presente divulgación son capaces de detectar rápida y convenientemente el complejo de *Mycobacterium tuberculosis*. De acuerdo con un aspecto adicional, la presente divulgación también proporciona un procedimiento para secretar extracelularmente una proteína específica del complejo de *Mycobacterium tuberculosis*, que comprende someter una muestra biológica que contiene el complejo de *Mycobacterium tuberculosis* a un tratamiento térmico.

Breve explicación de los dibujos

La Figura 1 es un gráfico que muestra la relación entre la temperatura de tratamiento térmico y el efecto de promoción de la secreción extracelular de MPB64, cuando se usaron células bacterianas de una cepa de *M. bovis* BCG Tokio.

La Figura 2 es un gráfico que muestra la relación entre el tiempo de tratamiento térmico y el efecto de promoción de la secreción extracelular de MPB64, cuando se usaron células bacterianas de una cepa de *M. bovis* BCG Tokio.

Descripción de las realizaciones

La muestra biológica utilizada en la presente invención no se limita en particular a condición de que la muestra biológica pueda contener un complejo de *Mycobacterium tuberculosis*. Los ejemplos de la muestra biológica incluyen esputo, derrame pleural, secreción bronquial, jugo gástrico, sangre, líquido cefalorraquídeo, orina y heces. Preferentemente, el esputo se usa debido a su alta concentración bacteriana. Como alternativa, puede usarse el líquido de lavado bronquial recogido durante el examen respiratorio, un tejido recogido del bronquio o el pulmón, o similares, como muestra biológica. Estas muestras biológicas pueden usarse solas o pueden usarse como una mezcla de dos o más de las mismas.

El tratamiento térmico de la muestra biológica se realiza preferentemente colocando la muestra biológica en un recipiente herméticamente sellable y después sometiendo el recipiente en su conjunto a un tratamiento térmico porque la muestra biológica que se ha de tratar contiene un complejo de *Mycobacterium tuberculosis* altamente infeccioso. La operación de tratamiento térmico se realiza preferentemente dentro de una cámara de flujo laminar desde el punto de vista de garantizar la seguridad del operador. El recipiente para su uso en el tratamiento térmico no se limita en particular a condición de que el recipiente pueda mantener su estado herméticamente sellado y pueda resistir una temperatura de calentamiento predeterminada. El recipiente puede seleccionarse adecuadamente de acuerdo con la muestra biológica que se ha de tratar. El recipiente puede estar equipado, en su abertura, con una boquilla cuentagotas con un filtro para facilitar la descarga de la muestra biológica tratada de este modo desde el recipiente, para el análisis inmunológico. Se prefiere el uso de la boquilla cuentagotas con un filtro porque la boquilla cuentagotas con un filtro puede retirar materia sólida, tal como los componentes desnaturalizados contenidos en la muestra biológica tratada y, adicionalmente, puede colocar convenientemente gotas de la muestra biológica resultante en un aparato de ensayo inmunológico.

La muestra biológica puede someterse a un tratamiento tal como lisis con un agente de tratamiento de muestra de

5 acuerdo con sus propiedades antes del tratamiento térmico. Por ejemplo, cuando se usa esputo como muestra, puede lisarse con una sustancia alcalina, una sustancia reductora, una proteasa, un azúcar, un tensioactivo, un desnaturizante de proteínas o similares, lo que reduce la viscosidad del esputo, con el fin de mejorar la eficiencia del tratamiento térmico. En particular, es conveniente y se usa preferentemente un tratamiento que usa hidróxido de sodio como una sustancia alcalina y N-acetil-L-cisteína como una sustancia reductora en combinación.

10 De acuerdo con otra realización, la muestra biológica puede dispersarse o disolverse en un disolvente y después someterse a un tratamiento térmico. El disolvente puede ser, por ejemplo, cualquier disolvente que pueda mantener vivo el complejo de *Mycobacterium tuberculosis* contenido en la muestra biológica. Puede usarse una solución tampón, tal como solución salina tamponada con fosfato o un medio líquido para su uso en cultivos de aislamiento de bacterias acidorresistentes, tal como Middlebrook 7H9. En particular, se usa preferentemente un medio líquido porque es necesario que se secreta la proteína extracelularmente por el tratamiento térmico sin alterar la actividad del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* y porque la muestra tratada de este modo puede someterse directamente a un ensayo inmunológico. Como alternativa, la muestra biológica lisada con el agente de tratamiento de muestra puede redispersarse en el disolvente.

15 La temperatura de calentamiento de la muestra biológica puede ser cualquier temperatura a la que la proteína pueda secretarse extracelularmente en la muestra biológica o el disolvente por el complejo de *Mycobacterium tuberculosis* y está en el intervalo de 40 °C a 55 °C. En particular, la temperatura que promueve eficazmente la secreción está en el intervalo de 45 °C a 50 °C.

20 El tiempo de tratamiento para la muestra biológica puede ser suficiente para secretar extracelularmente una cantidad detectable de la proteína secretora específica del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* mientras la temperatura del tratamiento se mantiene dentro del intervalo anterior. El tiempo de tratamiento es de 15 minutos o más y de 2,5 horas o menos, más preferentemente de 15 minutos o más y de 1,5 horas o menos, mucho más preferentemente de 30 minutos o más y de 1 hora o menos.

25 La muestra tratada térmicamente de este modo puede someterse al tratamiento de inactivación del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* simplemente aumentando la temperatura de calentamiento. La temperatura para el tratamiento de inactivación del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* no se limita en particular, pero es preferentemente de 100 °C. La inactivación del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* contenido en la muestra permite que el ensayo inmunológico se realice de forma segura sin el riesgo de infección secundaria.

30 El aparato de calentamiento para su uso en el tratamiento térmico no se limita en particular a condición de que el aparato sea capaz de mantener la temperatura constante. Puede usarse un baño termostático, un bloque calentador, una incubadora o similar. Se prefiere en particular un pequeño aparato de calentamiento porque todos los procedimientos para detectar el complejo de *Mycobacterium tuberculosis* pueden completarse dentro de una cámara de flujo laminar.

35 De acuerdo con la presente invención, la proteína específica del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* puede secretarse extracelularmente mediante el tratamiento térmico de la muestra biológica. Por tanto, la presencia del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* puede detectarse fácilmente mediante un ensayo inmunológico o similar usando la muestra biológica tratada de este modo.

40 En la presente invención, la proteína específica del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* que se ha de secretar extracelularmente no se limita en particular a condición de que la proteína secrete extracelularmente. Los ejemplos de la proteína que es secretada extracelularmente por el complejo de *Mycobacterium tuberculosis* incluyen muchas proteínas tales como MPT64, MPB64, MPB70, ESAT-6 y CFP-10. De estas proteínas, se prefiere una proteína que secrete extracelularmente en una gran cantidad en poco tiempo como proteína utilizada como índice para indicar la presencia del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* en el ensayo inmunológico utilizado en la presente invención. Por ejemplo, MPB64, es decir, MPT64, se secreta o libera extracelularmente en una gran cantidad mediante el tratamiento térmico de la muestra biológica de acuerdo con la presente invención sin cultivo, es decir, antes de que las células bacterianas comiencen a crecer. Desde un punto de vista de este tipo, se usa preferentemente MPB64, es decir, MPT64, como diana para la detección de la presencia del complejo de *Mycobacterium tuberculosis*. La MPB64, es decir, MPT64, secretada extracelularmente puede someterse a ensayo inmunológicamente para determinar la presencia o ausencia del complejo de *Mycobacterium tuberculosis*.

45 50 En el procedimiento de detección de la presente invención, el ensayo inmunológico no se limita en particular y es preferentemente un inmunoensayo de tipo sándwich que usa un primer anticuerpo y un segundo anticuerpo contra la proteína secretora específica del complejo de *Mycobacterium tuberculosis*, en particular, el ensayo inmunosorbente ligado a enzimas (ELISA) o ensayo inmunocromatográfico. El primer anticuerpo y el segundo anticuerpo pueden ser iguales o diferentes entre sí a condición de que permitan la detección de la proteína secretora específica del complejo de *Mycobacterium tuberculosis*.

55 Este ensayo inmunológico puede ser cualquier procedimiento capaz de detectar inmunológicamente MPB64 secretada extracelularmente mediante el tratamiento térmico de la muestra biológica y es preferentemente un ensayo inmunocromatográfico, en particular preferentemente un ensayo inmunocromatográfico que usa un

anticuerpo monoclonal anti-MPB64. El ensayo inmunocromatográfico para la detección de MPB64 puede realizarse fácilmente de acuerdo con el procedimiento descrito en la Patente japonesa abierta a inspección pública N.º 11-108931. Además, puede usarse Capilia® TB (fabricado por TAUNS Laboratories, Inc.), un aparato de ensayo inmunocromatográfico disponible en el mercado para la detección de MPB64, es decir, MPT64.

5 **Ejemplos**

La presente invención se describirá adicionalmente específicamente por medio de los Ejemplos a continuación. Sin embargo, no se pretende limitar la presente invención a estos Ejemplos.

Ejemplo de Referencia 1 (Preparación de una solución bacteriana que se ha de someter a ensayo)

10 Se disolvieron 4,7 g de la base de caldo Middlebrook 7H9 (fabricada por Difco Laboratories Inc.) en 900 ml de agua destilada que contenía 0,5 g de Tween 80. La solución se esterilizó a alta presión en un autoclave a 121 °C durante 10 minutos. Después de que se enfriase, se añadieron asépticamente 100 ml de enriquecimiento de ADC (albúmina-dextrosa-catalasa) al mismo para preparar un medio líquido Middlebrook 7H9.

15 Una cepa de *M. bovis* BCG Tokio (en lo sucesivo en el presente documento denominada cepa BCG) se inoculó en el medio líquido preparado anteriormente y se cultivó de acuerdo con un procedimiento convencional. El cultivo continuó hasta que se obtuvo una turbidez correspondiente a los criterios de McFarland N.º 1. La solución bacteriana resultante se centrifugó para recuperar células bacterianas. Las células bacterianas recuperadas se resuspendieron mediante la adición del medio líquido Middlebrook 7H9 mencionado anteriormente y después se centrifugaron adicionalmente para recuperar células bacterianas. Esta operación se repitió tres veces. Las células bacterianas se lavaron para retirar las proteínas secretoras del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* unidas a las células bacterianas. Se aplicaron 100 µl del sobrenadante después de la operación de lavado a Capilia® TB (fabricado por TAUNS Laboratories, Inc.), un aparato de ensayo inmunocromatográfico para la detección de MPB64. Como resultado, este producto presentó negatividad para confirmar que la MPB64 secretada estaba ausente en el sobrenadante.

Ejemplo 1 (Estudio sobre las condiciones óptimas para la temperatura de tratamiento térmico)

25 La densidad óptica de la solución bacteriana que tenía la turbidez correspondiente a los criterios McFarland N.º 1, preparada en el Ejemplo de Referencia 1, se ajustó a una D.O. a 0,1 a una absorbancia de 530 nm para preparar una solución bacteriana para los ensayos (recuento bacteriano: correspondiente a 10⁷ UFC). La solución bacteriana para el ensayo se diluyó adicionalmente con un medio líquido para preparar una solución bacteriana diluida 10 veces (recuento bacteriano: correspondiente a 10⁶ UFC) y una solución bacteriana diluida 100 veces (recuento bacteriano: correspondiente a 10⁵ UFC). Se dispensaron 200 µl de cada solución bacteriana preparada a cada tubo de plástico (un tubo para la amplificación de ácido nucleico) y se trataron térmicamente usando un bloque térmico controlable por temperatura para un aparato de amplificación de ácido nucleico. La temperatura de calentamiento se ajustó a temperaturas que diferían en 5 °C de 35 °C a 75 °C. El tratamiento térmico se realizó durante 30 minutos. Se usaron muestras tratadas térmicamente a una temperatura de cultivo habitual de 35 °C como controles. Se recogió una alícuota de 100 µl de cada muestra tratada de este modo y se aplicó a Capilia® TB (fabricado por TAUNS Laboratories, Inc.) de la misma manera que en el Ejemplo de Referencia 1 para detectar la presencia de MPB64. La absorbancia del área de lectura se midió usando Immno Chromato-Reader (fabricado por Otsuka Electronics Co., Ltd.).

40 Los resultados se muestran en la Figura 1. En la Figura 1, la ordenada representa el valor de medición de la intensidad del color (absorbancia) en Capilia® TB (fabricado por TAUNS Laboratories, Inc.) y la abscisa representa la temperatura de calentamiento. La relación entre la absorbancia y la temperatura de tratamiento se indica mediante una línea continua para los resultados de la solución bacteriana para el ensayo (recuento bacteriano: correspondiente a 10⁷ UFC), mediante una línea discontinua para los resultados de la solución bacteriana diluida 10 veces (recuento bacteriano: correspondiente a 10⁶ UFC) y mediante una línea discontinua larga para los resultados de la solución bacteriana diluida 100 veces (recuento bacteriano: correspondiente a 10⁵ UFC).

45 Como se observa a partir de los resultados, todas las muestras sometidas a ensayo presentaron un aumento en la absorbancia a 40 °C a 60 °C, en particular, un aumento notable a 45 °C a 50 °C. Esto indica que el tratamiento térmico de las células bacterianas promovió su secreción extracelular de MPB64. Los controles tratados en condiciones de cultivo habituales de 35 °C no presentaron aumento en la absorbancia, lo que demuestra que solo mantener una muestra a temperatura ambiente o en condiciones equivalentes a la misma no hace que MPB64 se secrete extracelularmente. Por otro lado, no se confirmó ningún aumento en la absorbancia en un intervalo de temperaturas superior al intervalo de temperaturas de 40 °C a 60 °C donde se confirmó la secreción de MPB64. Esto demostró que MPB64 no se secreta en un intervalo de temperaturas igual o superior a 60 °C.

55 En consecuencia, a partir de estos resultados, se confirmó que el tratamiento térmico de una muestra bacteriana a 40 °C a 60 °C, en particular, a 45 °C a 50 °C, promueve notablemente la secreción extracelular de MPB64 y aumenta notablemente la tasa de detección del ensayo inmunológico.

Ejemplo 2 (Estudio sobre las condiciones óptimas para la temperatura de tratamiento térmico)

La densidad óptica de la solución bacteriana que tenía la turbidez correspondiente a los criterios McFarland N.º 1, preparada en el Ejemplo de Referencia 1, se ajustó a una D.O. a 0,1 a una absorbancia de 530 nm para preparar una solución bacteriana para los ensayos (recuento bacteriano: correspondiente a 10^7 UFC). Se dispensaron 200 µl de la solución bacteriana preparada a cada tubo de plástico (un tubo para la amplificación de ácido nucleico) y se trataron térmicamente usando un bloque térmico controlable por temperatura para un aparato de amplificación de ácido nucleico. La temperatura de calentamiento se ajustó a 35 °C, 13 temperaturas que diferían en 2 °C de 40 °C a 64 °C y 2 temperaturas de 70 °C y 80 °C como intervalo de temperaturas altas. El tratamiento térmico se realizó durante 60 minutos. Se usaron muestras tratadas térmicamente a una temperatura de cultivo habitual de 35 °C como controles. Se recogió una alícuota de 100 µl de cada muestra tratada de este modo y se aplicó a Capilia® TB (fabricado por TAUNS Laboratories, Inc.) de la misma manera que en el Ejemplo de Referencia 1 para detectar la presencia de MPB64. La evaluación se realizó mediante la observación visual de la intensidad del color de una sustancia marcadora acumulada en el área de lectura. La intensidad del color se evaluó visualmente como el grado de color magenta sobre la base de 5 grados: - (sin color), ± (color débil), + (color evidente), ++ (color más evidente) y +++ (color marcado). Los resultados de la evaluación se muestran en la Tabla 1.

15

Tabla 1

Temperatura de tratamiento	Evaluación
35 °C (control)	-
40 °C	±
42 °C	+
44 °C	+
46 °C	++
48 °C	+++
50 °C	+++
52 °C	++
54 °C	+
56 °C	+
58 °C	+
60 °C	±
62 °C	-
64 °C	-
70 °C	-
80 °C	-

Como se observa a partir de los resultados de la Tabla 1, se presentó un aumento en la intensidad del color a 40 °C a 60 °C y, en particular, se confirmó un aumento notable a 44 °C a 52 °C. Esto indica que el tratamiento térmico de las células bacterianas promovió su secreción extracelular de MPB64, como en el Ejemplo 1. Los controles tratados en condiciones de cultivo habituales de 35 °C no mostraron aumento en la absorbancia, lo que demuestra que simplemente mantener una muestra a temperatura ambiente o en condiciones equivalentes a la misma, no provoca que MPB64 se secrete extracelularmente. Por otro lado, no se confirmó ningún aumento en la absorbancia a temperaturas iguales o superiores a 62 °C o en el intervalo de temperaturas altas de 70 °C y 80 °C. Esto demostró que MPB64 no se secreta en un intervalo de temperaturas igual o superior a 60 °C.

En consecuencia, a partir de estos resultados, se confirmó que el tratamiento térmico de una muestra bacteriana a 40 °C a 60 °C, en particular, a 45 °C a 50 °C, promueve notablemente la secreción extracelular de MPB64 y aumenta notablemente la tasa de detección del ensayo inmunológico.

Ejemplo 3 (Estudio sobre las condiciones óptimas para el tiempo de tratamiento térmico)

La densidad óptica de la solución bacteriana que tenía la turbidez correspondiente a los criterios McFarland N.º 1, preparada en el Ejemplo de Referencia 1, se ajustó a una D.O. a 0,1 a una absorbancia de 530 nm para preparar una solución bacteriana para los ensayos (recuento bacteriano: correspondiente a 10^7 UFC). Se dispensaron 200 µl de la solución bacteriana preparada a cada tubo de plástico y se trataron térmicamente usando un bloque térmico controlable por temperatura para un aparato de amplificación de ácido nucleico. La operación de calentamiento se realizó con la temperatura de calentamiento ajustada a temperaturas que diferían en 5 °C de 35 °C a 75 °C. El tiempo de tratamiento se ajustó a 0 minutos, 15 minutos, 30 minutos y 60 minutos. Se recogió una alícuota de 100 µl de cada muestra tratada de este modo y se aplicó a Capilia® TB (fabricado por TAUNS Laboratories, Inc.) de la misma manera que en el Ejemplo 1. La absorbancia del área de lectura se midió usando Immno Chromato-Reader (fabricado por Otsuka Electronics Co., Ltd.).

Los resultados se muestran en la Figura 2. En la Figura 2, la ordenada representa el valor de medición de la intensidad del color (absorbancia) en Capilia® TB (fabricado por TAUNS Laboratories, Inc.) y la abscisa representa

la temperatura de calentamiento. La relación entre la absorbancia y la temperatura de tratamiento se indica mediante una línea discontinua para los resultados de las muestras tratadas durante el tiempo de tratamiento de 15 minutos, mediante una línea continua para los resultados de las muestras tratadas durante el tiempo de tratamiento de 30 minutos y mediante una línea discontinua para los resultados de las muestras tratadas durante el tiempo de tratamiento de 60 minutos.

Como se observa a partir de los resultados, todas las muestras tratadas durante el tiempo de tratamiento de 15 minutos, 30 minutos y 60 minutos presentaron un aumento notable en la absorbancia a la temperatura de 45 °C a 50 °C. No se observaron diferencias entre los tiempos de tratamiento. Incluso no se confirmó que las muestras tratadas durante el tiempo de calentamiento de 60 minutos difirieran en gran medida de las otras muestras. En consecuencia, se confirmó que el tiempo de tratamiento térmico de al menos 15 minutos tiene el efecto de promover la secreción extracelular de MPB64.

Ejemplo 4 (Estudio sobre las condiciones óptimas para el tiempo de tratamiento térmico)

La densidad óptica de la solución bacteriana que tenía la turbidez correspondiente a los criterios McFarland N.º 1, preparada en el Ejemplo de Referencia 1, se ajustó a una D.O. a 0,01 a una absorbancia de 530 nm para preparar una solución bacteriana para los ensayos (recuento bacteriano: correspondiente a 10⁶ UFC). Se dispensaron 200 µl de la solución bacteriana preparada a cada tubo de plástico y se trataron térmicamente a 50 °C usando un bloque térmico controlable por temperatura para un aparato de amplificación de ácido nucleico. El tratamiento térmico se realizó con el tiempo de tratamiento ajustado a 0 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 60 minutos, 75 minutos, 120 minutos y 150 minutos. Como control, la misma solución bacteriana anterior que se ha de someter a ensayo se dejó a temperatura ambiente sin tratamiento térmico. Se recogió una alícuota de 100 µl de cada muestra tratada de este modo y se aplicó a Capilia® TB (fabricado por TAUNS Laboratories, Inc.) de la misma manera que en el Ejemplo de Referencia 1. La intensidad del color de una sustancia marcadora acumulada se observó visualmente. La intensidad del color se evaluó visualmente como el grado de color magenta sobre la base de 5 grados: - (sin color), ± (color débil), + (color evidente), ++ (color más evidente) y +++ (color marcado). Los resultados de la evaluación se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2

	Tratamiento térmico a 50 °C	Control (sin tratamiento térmico)
	Evaluación	Evaluación
0 min	-	-
15 min	+	-
30 min	+	-
45 min	++	-
60 min	+++	-
75 min	+++	-
120 min	+++	-
150 min	+++	-

Como puede observarse a partir de los resultados de la Tabla 2, se confirmó que la muestra de control no tratada térmicamente y la muestra tratada durante el tiempo de calentamiento de 0 minutos no desarrollaron color en el área de lectura. Se confirmó que el tratamiento térmico durante 15 minutos produjo color derivado de la secreción extracelular de MPB64. Se confirmó que la muestra tratada térmicamente durante 60 minutos desarrolló un color notable. Las muestras tratadas térmicamente durante hasta 150 minutos no presentaron ningún aumento adicional en la intensidad del color y se confirmó que desarrollaron un color notable al mismo nivel que el de la muestra tratada térmicamente durante 60 minutos. A partir de estos resultados, se confirmó que el tratamiento térmico durante al menos 15 minutos tenía el efecto de promover la secreción extracelular de MPB64, que alcanzó su punto máximo a los 60 minutos.

Ejemplo 5 (Estudio sobre el disolvente)

La solución bacteriana que tenía la turbidez correspondiente a los criterios McFarland N.º 1, preparada en el Ejemplo de Referencia 1, se preparó en soluciones bacterianas que tenían un recuento bacteriano correspondiente a 10⁷ UFC, 10⁶ UFC o 10⁵ UFC usando una solución tampón de fosfato que contenía Tween 80 o un medio líquido Middlebrook 7H9 como disolvente para el tratamiento de muestras biológicas para preparar muestras de ensayo. Se dispensaron 200 µl de cada muestra de ensayo a cada tubo de plástico. Después, la muestra se trató térmicamente a 50 °C durante 30 minutos en un bloque térmico. Después, se recogió una alícuota de 100 µl de la muestra tratada de este modo y se aplicó a Capilia® TB (fabricado por TAUNS Laboratories, Inc.) de la misma manera que en el Ejemplo 1, seguido de evaluación. La evaluación se realizó mediante la observación visual de la intensidad del color de una sustancia marcadora acumulada en el área de lectura. La intensidad del color se evaluó visualmente como el grado de color magenta sobre la base de 5 grados: - (sin color), ± (color débil), + (color evidente), ++ (color más evidente) y +++ (color marcado). Los resultados de la evaluación se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3

		Disolvente	
		Solución de tampón de fosfato que contenía Tween 80	Medio líquido Middlebrook 7H9
Muestra de ensayo (concentración bacteriana)	Correspondiente a 10 ⁵ CFU	+	++
	Correspondiente a 10 ⁶ CFU	++	+++
	Correspondiente a 10 ⁷ CFU	+++	+++

5 Como es evidente a partir de los resultados de la Tabla 3, pudo detectarse MPB64 secretada extracelularmente en ambos casos en los que la solución de tampón de fosfato que contenía Tween 80 se usó como disolvente y en los que el medio líquido Middlebrook 7H9 se usó como disolvente. Por tanto, no se confirmó ninguna diferencia en el ensayo inmunológico entre las variaciones en la composición de un disolvente.

Ejemplo 6 (Detección a partir de una muestra de esputo)

10 La solución bacteriana que tenía la turbidez correspondiente a los criterios de McFarland N.º 1, preparada en el Ejemplo de Referencia 1, se añadió al esputo que se había confirmado que era negativo para la infección por tuberculosis para preparar una muestra de esputo pseudopositivo que tenía un recuento bacteriano correspondiente a 10⁷ UFC. Esta muestra se dispensó a tubos de plástico. A cada una de estas muestras de esputo, se le añadieron N-acetil-L-cisteína y una solución acuosa de hidróxido de sodio en cantidades iguales y la mezcla se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 15 minutos para lisar la muestra. Después, se recogió una alícuota de 100 µl de la muestra tratada de este modo y se aplicó a Capilia® TB (fabricado por TAUNS Laboratories, Inc.) de la misma manera que en el Ejemplo 1, seguido de evaluación. Las muestras de esputo de control se trataron de la misma manera que anteriormente, excepto porque se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos sin el tratamiento térmico, seguido de evaluación. La evaluación se realizó mediante la observación visual de la intensidad del color de una sustancia marcadora acumulada en el área de lectura. La intensidad del color se evaluó visualmente como el grado de color magenta sobre la base de 5 grados: - (sin color), ± (color débil), + (color evidente), ++ (color más evidente) y +++ (color marcado). Los resultados de la evaluación se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4

	Sin tratamiento térmico	Tratamiento térmico a 50 °C
Muestra <1>	-	+
Muestra <2>	-	+
Muestra <3>	- a ±	++
Muestra <4>	-	+

25 Como resultado, se confirmó que las muestras tratadas térmicamente desarrollaron un color evidente en el área de lectura, lo que demostró la presencia de MPB64 en las muestras. Por el contrario, las muestras de control difirieron evidentemente de las muestras tratadas térmicamente, aunque algunas muestras presentaron un ligero color en el área de lectura. En consecuencia, se confirmó que el tratamiento térmico promueve la secreción de MPB64 incluso en una muestra de esputo, lo que demuestra que el complejo de *Mycobacterium tuberculosis* puede detectarse rápida y convenientemente a partir de una muestra biológica.

Aplicabilidad industrial

30 La presente invención se basa en un procedimiento para detectar un complejo de *Mycobacterium tuberculosis* que puede realizarse conveniente y rápidamente directamente a partir de una muestra biológica que contiene el complejo de *Mycobacterium tuberculosis* sin operación de cultivo por tratamiento térmico de la muestra biológica a una temperatura predeterminada y sometiendo a ensayo inmunológicamente una proteína secretora específica del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* secretada extracelularmente de este modo, y también desvela un kit dirigido a la misma. La presente invención es útil no solo para la detección del complejo de *Mycobacterium tuberculosis*, sino que puede ayudar en el diagnóstico y el tratamiento apropiados de la tuberculosis.

REIVINDICACIONES

1. Uso de un aparato de ensayo inmunológico para detectar una proteína secretora específica del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* secretada en un recipiente de tratamiento para la detección de un complejo de *Mycobacterium tuberculosis*, siendo dicho recipiente de tratamiento uno en el que una muestra biológica que puede contener el complejo de *Mycobacterium tuberculosis* se somete a tratamiento térmico de 40 °C a 55 °C durante al menos 15 minutos y como máximo durante 2,5 horas de manera que se secrete extracelularmente la proteína específica del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* del complejo de *Mycobacterium tuberculosis*.
2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la muestra biológica se lisa con un agente de tratamiento de muestra y se dispersa o se disuelve opcionalmente en un disolvente antes de someterla al tratamiento térmico.
3. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el ensayo inmunológico es un inmunoensayo de tipo sándwich que usa un primer anticuerpo y un segundo anticuerpo contra la proteína secretora específica del complejo de *Mycobacterium tuberculosis*.
4. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el aparato de ensayo inmunológico es un aparato de ensayo inmunocromatográfico.
5. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el aparato de ensayo inmunológico es un aparato de ensayo de ELISA.
6. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la proteína secretora específica del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* es MPB64 o MPT64.
7. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el recipiente de tratamiento es uno en el que una muestra biológica que puede contener el complejo de *Mycobacterium tuberculosis* se somete a tratamiento térmico de 40 °C a 50 °C durante 15 minutos hasta 2,5 horas de manera que se secrete extracelularmente la proteína específica del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* del complejo de *Mycobacterium tuberculosis*.
8. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el recipiente de tratamiento está equipado, en su abertura, con una boquilla cuentagotas con un filtro.

Estudio sobre las condiciones óptimas para la temperatura del tratamiento térmico

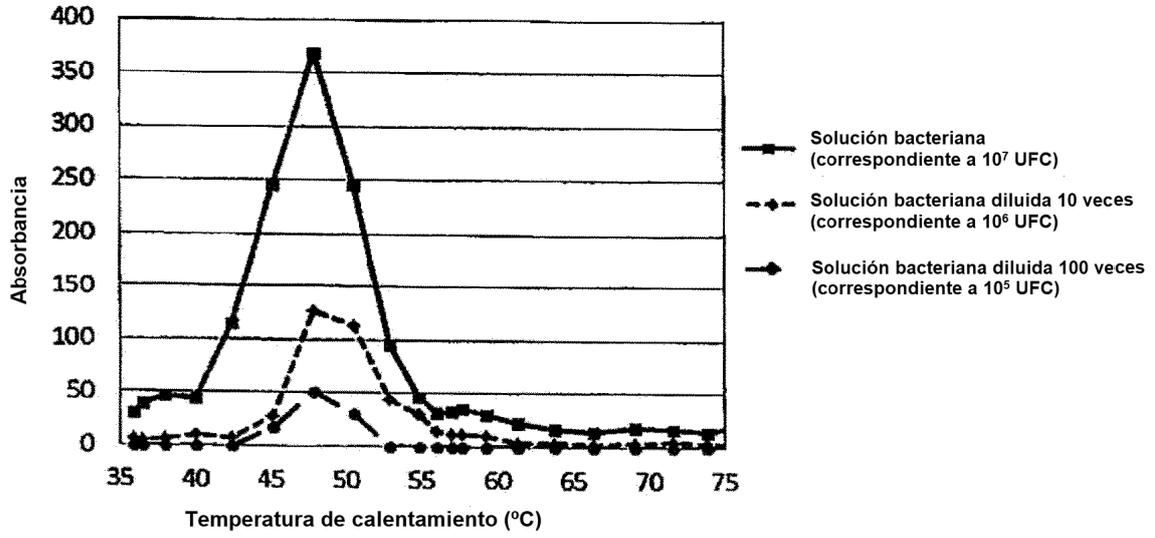


Figura 1

Estudio sobre las condiciones óptimas para el tiempo del tratamiento térmico

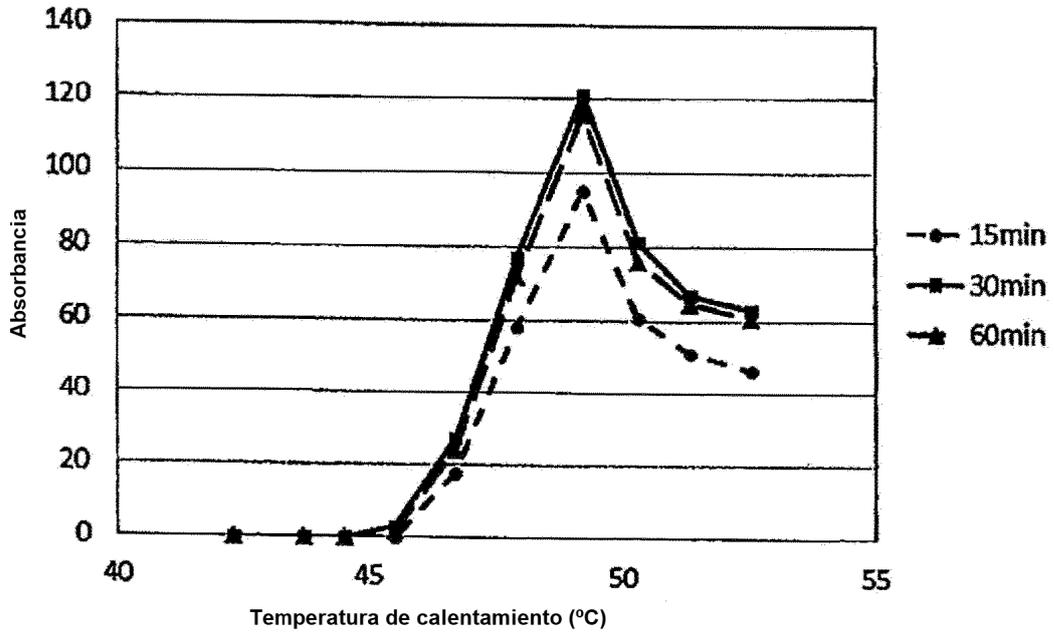


Figura 2