

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 751 357**

51 Int. Cl.:

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.04.2013 PCT/JP2013/060301**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.10.2013 WO13151122**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.04.2013 E 13772467 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.07.2019 EP 2835646**

54 Título: **Procedimiento de detección inmunológica del complejo Mycobacterium tuberculosis**

30 Prioridad:

05.04.2012 JP 2012086566

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

31.03.2020

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 2 751 357 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 inmunológica del complejo *Mycobacterium tuberculosis*

Campo técnico

- 5 La presente invención se refiere a un procedimiento altamente seguro para la detección inmunológica de un complejo de *Mycobacterium tuberculosis* que puede realizarse conveniente, rápida, y directamente de una muestra biológica que contiene el complejo de *Mycobacterium tuberculosis* sin operación de cultivo mediante tratamiento térmico de la muestra biológica a una temperatura predeterminada y detección inmunológica de una proteína secretora específica del complejo *Mycobacterium tuberculosis* secretada de manera extracelular.

Técnica antecedente

- 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 sospechosa de tener infección de tuberculosis debe ser hospitalizada de acuerdo con la Ley de Enfermedades Infecciosas. Un médico debe informar inmediatamente a la autoridad cuando haya diagnosticado a un paciente con tuberculosis y, por lo tanto, se requieren respuestas rápidas.
- 15 *Mycobacterium tuberculosis* (tipo humano de bacteria de tuberculosis), *Mycobacterium bovis* (tipo bovino de bacteria de tuberculosis), *Mycobacterium microti* (tipo murino de bacteria de tuberculosis) y *Mycobacterium africanum* (tipo africano de bacteria de tuberculosis), que pertenecen a un complejo de *Mycobacterium tuberculosis*, se conocen como bacterias resistentes al ácido patógenas para los 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, se han incrementado en los últimos años. Dado que ambas infecciones presentan síntomas clínicos similares, la identificación de un microbio causante también es importante para determinar los cursos de tratamiento.
- 25 Por lo 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 adecuadamente el tratamiento temprano. 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, los procedimientos de detección basados en cultivo se han practicado como procedimientos para detectar el complejo de *Mycobacterium tuberculosis*. Dichos procedimientos de cultivo se realizan inoculando una muestra biológica para analizarla en un medio líquido o un medio sólido y detectando células bacterianas cultivadas. El procedimiento que utiliza el medio líquido conlleva un alto riesgo de infección secundaria durante la operación y, por lo tanto, requiere una instalación y un aparato altamente seguros, aunque este procedimiento puede acortar el período de cultivo de la muestra biológica a analizar. El procedimiento que utiliza el medio sólido requiere un período de aproximadamente 2 meses para obtener resultados de detección. El complejo de *Mycobacterium tuberculosis* debe cultivarse utilizando un aparato altamente seguro en un entorno altamente seguro, con gran cuidado para prevenir la infección secundaria.
- 35 Como un 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 de *Mycobacterium tuberculosis* específica del complejo secretada en el medio.
- 40 La patente japonesa expuesta a inspección pública No. 11-108931 divulga un procedimiento para detectar la presencia de un complejo de *Mycobacterium tuberculosis*, que comprende: inocular una muestra biológica recogida de un paciente con tuberculosis, en un medio sólido o un medio líquido; cultivar el complejo de *Mycobacterium tuberculosis* durante unos días a algunas semanas; y luego 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 Este procedimiento, sin embargo, implica cultivar el complejo de *Mycobacterium tuberculosis* contenido en la muestra biológica y utilizar los cultivos resultantes como una muestra. Por lo 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 lo tanto requiere una enorme mano de obra y gastos.
- 50

Como se describe en la Patente japonesa expuesta a inspección pública No. 11-108931, MPB64 es una proteína secretora específica del complejo *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 expuesta a inspección pública No. 2002-62299 establece que la proteína secretora específica de 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 como el esputo y detectar MPT64 contenido en la muestra biológica para 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 sea secretado extracelularmente por este complejo de *Mycobacterium tuberculosis* y contenido en la muestra biológica. Además, una pequeña abundancia de MPT64, aunque secretada, requiere una gran cantidad de muestra biológica y complica la operación. Esto plantea mayores cargas para los sujetos de prueba y las personas a cargo de las pruebas. Al mismo tiempo, se puede pasar por alto la infección con el complejo de *Mycobacterium tuberculosis*, lo que resulta en problemas de salud pública.

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

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

Documentos técnicos convencionales

25 Documentos de patente

Documento de patente 1: Patente japonesa expuesta a inspección pública No. 11-108931

Documento de patente 2: Patente japonesa expuesta a inspección pública No. 2002-62299

Documento de patente 3: Publicación internacional No. WO 2009/084481

30 El documento EP 0 273 333 divulga un procedimiento que incluye tratamiento térmico (80 - 100 °C durante 2 - 4 min) como un medio para exponer antígenos micobacterianos.

Sumario de la invención

Problemas a resolver por la invención

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

Medios para resolver los problemas

Los presentes inventores han llevado a cabo estudios diligentes para resolver los problemas anteriores y, en consecuencia, descubrieron que los problemas pueden resolverse mediante el procedimiento de la reivindicación 1.

45 De acuerdo con un aspecto, la presente invención 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 al 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 promover la secreción extracelular MPB64, cuando se utilizan las células bacterianas de cepas de *M. bovis* BCG Tokyo.

5 La Figura 2 es un gráfico que muestra la relación entre el tiempo de tratamiento térmico y el efecto de promover la secreción extracelular MPB64, cuando se utilizan las células bacterianas de cepas de *M. bovis* BCG Tokyo.

Descripción de las realizaciones

La muestra biológica utilizada en la presente invención no está particularmente limitada siempre 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. 10 Preferiblemente, el esputo se utiliza debido a su alta concentración bacteriana. Alternativamente, el líquido de lavado bronquial recogido durante el examen respiratorio, un tejido recogido del bronquio o el pulmón, o similares, pueden utilizarse como muestra biológica. Estas muestras biológicas se pueden utilizar solas o se pueden utilizar como una mezcla de dos o más de ellas.

El tratamiento térmico de la muestra biológica se lleva a cabo preferiblemente colocando la muestra biológica en un recipiente herméticamente sellable y luego sometiendo el recipiente en su conjunto a un tratamiento térmico porque la muestra biológica a tratar contiene un complejo de *Mycobacterium tuberculosis* altamente infecciosa. La operación de tratamiento térmico se realiza preferiblemente dentro de un gabinete de seguridad desde el punto de vista de garantizar la seguridad de un operador. El contenedor para uso en el tratamiento térmico no está particularmente limitado siempre que el contenedor pueda mantener su estado herméticamente sellado y pueda resistir una temperatura de calentamiento predeterminada. El contenedor puede seleccionarse adecuadamente de acuerdo con la muestra biológica a tratar. El recipiente puede estar equipado, en su apertura, con una boquilla cuentagotas con un filtro para facilitar la descarga de la muestra biológica así tratada del recipiente, para el análisis inmunológico. Se prefiere el uso de la boquilla cuentagotas con un filtro porque la boquilla cuentagotas con un filtro puede eliminar la materia sólida, como los componentes desnaturalizados contenidos en la muestra biológica tratada y, además, puede 25 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 acuerdo con sus propiedades antes del tratamiento térmico. Por ejemplo, cuando se utiliza esputo como muestra, se puede lisar con una sustancia alcalina, una sustancia reductora, una proteasa, un azúcar, un tensioactivo, un desnaturalizante de proteínas o similares, lo que reduce la viscosidad del esputo, con el fin de mejorar la eficiencia del tratamiento térmico. Particularmente, un tratamiento que utiliza hidróxido de sodio como una sustancia alcalina y N-acetil-L-cisteína como una sustancia reductora en combinación es conveniente y se utiliza preferiblemente. 30

De acuerdo con otra realización, la muestra biológica puede dispersarse o disolverse en un disolvente y luego 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. Se puede utilizar una solución tampón, como solución salina tamponada con fosfato o un medio líquido para su uso en cultivos de aislamiento de bacterias resistentes a los ácidos, como Middlebrook 7H9. Particularmente, se utiliza preferiblemente un medio líquido porque la proteína necesita ser secretada extracelularmente por el tratamiento térmico sin perjudicar la actividad del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* y porque la muestra tratada de este modo puede someterse directamente a un ensayo inmunológico. Alternativamente, la muestra biológica lisada con el agente de tratamiento de muestra puede 35 redispersarse en el disolvente.

La temperatura de calentamiento de la muestra biológica puede ser cualquier temperatura a la cual la proteína puede ser secretada extracelularmente en la muestra biológica o el disolvente por el complejo de *Mycobacterium tuberculosis*, y está preferiblemente en el intervalo de 40 °C a 60 °C, más preferiblemente en el intervalo de 40 °C a 55 °C. En particular, la temperatura que promueve efectivamente la secreción está en el rango de 45 °C a 50 °C. 40

El tiempo de tratamiento para la muestra biológica puede ser un tiempo suficiente para secretar extracelularmente una cantidad detectable de la proteína secretora específica del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* mientras la temperatura de tratamiento se mantiene dentro del intervalo anterior. El tiempo de tratamiento es preferiblemente 15 minutos o más, más preferiblemente 15 minutos o más y 2,5 horas o menos, más preferiblemente 15 minutos o más y 1,5 horas o menos, lo más preferiblemente 30 minutos o más y 1 hora o menos. 45

La muestra así tratada térmicamente puede someterse al tratamiento de inactivación del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* simplemente elevando la temperatura de calentamiento. La temperatura para el tratamiento de inactivación del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* no está particularmente limitada, pero es preferiblemente 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. 50

El aparato de calentamiento para uso en el tratamiento térmico no está particularmente limitado siempre que el aparato sea capaz de mantener la temperatura constante. Se puede utilizar un baño de termostato, un bloque calentador, una incubadora o similar. Se prefiere particularmente un pequeño aparato de calentamiento porque todos los 55

procedimientos para detectar el complejo de *Mycobacterium tuberculosis* se pueden completar dentro de un gabinete de seguridad.

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 lo tanto, la presencia del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* se puede detectar fácilmente mediante un ensayo inmunológico o similar utilizando la muestra biológica tratada de este modo.

En la presente invención, la proteína específica del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* que se secreta extracelularmente no está particularmente limitada siempre que la proteína se secrete extracelularmente. Los ejemplos de la proteína que es secretada extracelularmente por el complejo de *Mycobacterium tuberculosis* incluyen muchas proteínas como MPT64, MPB64, MPB70, ESAT-6 y CFP-10. De estas proteínas, se prefiere una proteína que se secreta 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 tal punto de vista, MPB64, es decir, MPT64 se utiliza preferiblemente como un objetivo para la detección de la presencia del complejo de *Mycobacterium tuberculosis*. El MPB64 secretado extracelularmente, es decir, MPT64 se puede analizar inmunológicamente para determinar la presencia o ausencia del complejo de *Mycobacterium tuberculosis*.

En el procedimiento de detección de la presente invención, el ensayo inmunológico no está particularmente limitado y es preferiblemente un inmunoensayo tipo sándwich que utiliza un primer anticuerpo y un segundo anticuerpo contra la proteína secretora específica del complejo de *Mycobacterium tuberculosis*, particularmente, un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) o ensayo inmunocromatográfico. El primer anticuerpo y el segundo anticuerpo pueden ser iguales o diferentes entre sí siempre que permitan la detección de la proteína secretora específica del complejo de *Mycobacterium tuberculosis*.

Este ensayo inmunológico puede ser cualquier procedimiento capaz de detectar inmunológicamente MPB64 secretada extracelularmente por el tratamiento térmico de la muestra biológica y es preferiblemente un ensayo inmunocromatográfico, particularmente preferiblemente un ensayo inmunocromatográfico utilizando un anticuerpo monoclonal anti-MPB64. El ensayo inmunocromatográfico para la detección de MPB64 se puede realizar fácilmente de acuerdo con el procedimiento descrito en la Patente japonesa expuesta a inspección pública No. 11-108931. Además, se puede utilizar Capilia® TB (fabricado por TAUNS Laboratories, Inc.), un aparato de ensayo inmunocromatográfico disponible comercialmente para la detección de MPB64, es decir, MPT64.

Ejemplos

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

35 **Ejemplo de referencia 1 (Preparación de una solución bacteriana a analizar)**

Se disolvieron 4,7 g de base de caldo Middlebrook 7H9 (fabricado 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 autoclave a 121 °C durante 10 minutos. Después de enfriar, se añadieron aseptícamente 100 ml de ADC (albúmina-dextrosa-catalasa) enriquecida para preparar un medio líquido Middlebrook 7H9.

40 Una cepa de *M. bovis* de BCG Tokyo (en adelante denominada cepa BCG) se inoculó en el medio líquido preparado anteriormente y se cultivó de acuerdo con un procedimiento estándar. El cultivo continuó hasta que se obtuvo la turbidez correspondiente a los estándares McFarland No. 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 luego se centrifugaron para recuperar células bacterianas. Esta operación se repitió tres veces. Las células bacterianas se lavaron para eliminar las proteínas secretoras del complejo *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 exhibió negatividad para confirmar que MPB64 secretado estaba ausente en el sobrenadante.

50 **Ejemplo 1 (Estudio sobre la condición óptima para la temperatura de tratamiento térmico)**

La densidad óptica de la solución bacteriana que tiene la turbidez correspondiente a los estándares McFarland No. 1, preparada en el Ejemplo de referencia 1, se ajustó a OD 0,1 a una absorbancia de 530 nm para preparar una solución bacteriana para la prueba (recuento bacteriano: correspondiente a 10^7 UFC). La solución bacteriana para la prueba se diluyó adicionalmente con un medio líquido para preparar una solución bacteriana diluida 10 veces (recuento bacteriano: correspondiente a 10^6 UFC) y una solución bacteriana diluida 100 veces (recuento bacteriano: correspondiente a 10^5 UFC). Se suministraron 200 µl de cada solución bacteriana preparada a cada tubo de plástico (un tubo para la amplificación de ácido nucleico) y se trataron térmicamente utilizando 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 llevó a cabo durante 30 minutos. Las muestras tratadas térmicamente a una temperatura de cultivo ordinaria de 35 °C se usaron 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 utilizando Immno Chromato-Reader (fabricado por Otsuka Electronics Co., Ltd.).

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 sobre la solución bacteriana para la prueba (recuento bacteriano: correspondiente a 10⁷ UFC), mediante una línea discontinua para los resultados sobre la solución bacteriana diluida 10 veces (recuento bacteriano: correspondiente a 10⁶ UFC), y por una línea discontinua larga para los resultados sobre la solución bacteriana diluida 100 veces (recuento bacteriano: correspondiente a 10⁵ UFC).

Como se aprecia a partir de los resultados, todas las muestras analizadas mostraron un aumento en la absorbancia a 40 °C a 60 °C, particularmente, un aumento marcado 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 ordinarias de 35 °C no mostraron 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 sea secretada extracelularmente. Por otro lado, no se confirmó ningún aumento en la absorbancia en un rango de temperatura superior al rango de temperatura de 40 °C a 60 °C donde se confirmó la secreción de MPB64. Esto demostró que MPB64 no se secreta en un rango de temperatura 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, particularmente, a 45 °C a 50 °C promueve notablemente la secreción extracelular de MPB64 y aumenta notablemente la velocidad de detección de ensayo inmunológico.

Ejemplo 2 (Estudio sobre la condición óptima para la temperatura de tratamiento térmico)

La densidad óptica de la solución bacteriana que tiene la turbidez correspondiente a los estándares McFarland No. 1, preparada en el Ejemplo de referencia 1, se ajustó a OD 0,1 a una absorbancia de 530 nm para preparar una solución bacteriana para la prueba (recuento bacteriano: correspondiente a 10⁷ UFC). Se suministraron 200 µl de la solución bacteriana preparada en cada tubo de plástico (un tubo para la amplificación de ácido nucleico) y se trataron térmicamente utilizando 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 un rango de temperatura alta. El tratamiento térmico se llevó a cabo durante 60 minutos. Las muestras tratadas con calor a una temperatura de cultivo ordinaria de 35 °C se usaron 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 en base a 5 grados: - (sin color), ± (color débil), + (color distintivo), ++ (color más distintivo) y +++ (marcadamente coloreado). Los resultados de la evaluación se muestran en la Tabla 1.

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 aprecia a partir de los resultados de la Tabla 1, se mostró un aumento en la intensidad del color a 40 °C a 60 °C, y particularmente, se confirmó un aumento marcado 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 bajo una condición de cultivo ordinaria de 35 °C no mostraron aumento en la absorbancia, lo que demuestra que simplemente mantener una muestra a temperatura ambiente o bajo condiciones equivalentes a esto, no causa que MPB64 sea secretada extracelularmente. Por otro lado, no se confirmó un aumento en la absorbancia a temperaturas iguales o superiores a 62 °C o en el rango de temperatura alta de 70 °C y 80 °C. Esto demostró que MPB64 no se secreta en un rango de temperatura igual o superior a 60 °C.

De acuerdo con lo anterior, a partir de estos resultados, se confirmó que el tratamiento térmico de una muestra bacteriana a 40 °C a 60 °C, particularmente, a 45 °C a 50 °C promueve notablemente la secreción extracelular de MPB64 y aumenta notablemente la velocidad de detección de ensayo inmunológico.

Ejemplo 3 (Estudio sobre la condición óptima para el tiempo de tratamiento térmico)

La densidad óptica de la solución bacteriana que tiene la turbidez correspondiente a los estándares de McFarland No. 1, preparada en el Ejemplo de referencia 1, se ajustó a OD 0,1 a una absorbancia de 530 nm. para preparar una solución bacteriana para la prueba (recuento bacteriano: correspondiente a 10^7 UFC). Se suministraron 200 μ l de la solución bacteriana preparada a cada tubo de plástico y se trataron térmicamente utilizando un bloque térmico controlable por temperatura para un aparato de amplificación de ácido nucleico. La operación de calentamiento se llevó a cabo con la temperatura de calentamiento ajustada a temperaturas que diferían en 5 °C de 35 °C a 75 °C. El tiempo de tratamiento se estableció en 0 minutos, 15 minutos, 30 minutos y 60 minutos. Se recogió una alícuota de 100 μ l 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 utilizando 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 sobre las muestras tratadas durante el tiempo de tratamiento de 15 minutos, mediante una línea continua para los resultados sobre las muestras tratadas para el tiempo de tratamiento de 30 minutos y línea discontinua para los resultados sobre las muestras tratadas para el tiempo de tratamiento de 60 minutos.

Como se aprecia a partir de los resultados, todas las muestras tratadas durante el tiempo de tratamiento de 15 minutos, 30 minutos y 60 minutos exhibieron un aumento marcado en la absorbancia a la temperatura de 45 °C a 50 °C. No se observaron diferencias entre los tiempos de tratamiento. Incluso las muestras tratadas durante el tiempo de calentamiento de 60 minutos no fueron confirmadas para diferir en gran medida de las otras muestras. De acuerdo con lo anterior, 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 la condición óptima para el tiempo de tratamiento térmico)

La densidad óptica de la solución bacteriana que tiene la turbidez correspondiente a los estándares McFarland No. 1, preparada en el Ejemplo de referencia 1, se ajustó a OD 0,01 a una absorbancia de 530 nm. para preparar una solución bacteriana para la prueba (recuento bacteriano: correspondiente a 10^6 UFC). Se suministraron 200 μ l de la solución bacteriana preparada a cada tubo de plástico y se trataron térmicamente a 50 °C utilizando un bloque térmico controlable por temperatura para un aparato de amplificación de ácido nucleico. El tratamiento térmico se realizó con el tiempo de tratamiento establecido en 0 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 60 minutos, 75 minutos, 120 minutos y 150 minutos. Como control, la misma solución bacteriana a analizar que la anterior 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 1. Se observó visualmente la intensidad del color de una sustancia marcadora acumulada. La intensidad del color se evaluó visualmente como el grado de color magenta en base a 5 grados: - (sin color), ± (color débil), + (color distintivo), ++ (color más distintivo) y +++ (marcadamente coloreado). Los resultados de la evaluación se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2

	Tratamiento térmico 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 se aprecia 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 la zona de lectura. Se confirmó que el tratamiento térmico durante 15 minutos producía color derivado de la secreción extracelular de MPB64. Se confirmó que la muestra tratada térmicamente durante 60 minutos desarrollaba un color marcado. Las muestras tratadas térmicamente durante hasta 150 minutos no mostraron un aumento adicional en la intensidad del color y se confirmó que desarrollaban un color marcado 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 disolvente)

La solución bacteriana que tenía la turbidez correspondiente a los estándares McFarland No. 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 utilizando una solución tampón de fosfato que contiene Tween 80 o un medio líquido Middlebrook 7H9 como disolvente para el tratamiento de muestras biológicas para preparar muestras de prueba. Se suministraron 200 µl de cada muestra de prueba a cada tubo de plástico. Luego, la muestra se trató térmicamente a 50 °C durante 30 minutos en un bloque térmico. Luego, se recogió una alícuota de 100 µl de la muestra así tratada, 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 en base a 5 grados: - (sin color), ± (color débil), + (color distintivo), ++ (color más distintivo) y +++ (marcadamente coloreado). Los resultados de la evaluación se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3

		Disolvente	
		Tween 80 – que contiene solución de tampón de fosfato	Medio líquido Middlebrook 7H9
Muestra de prueba (concentración bacteriana)	Corresponde a 10 ⁵ UFC	+	++
	Corresponde a 10 ⁶ UFC	++	+++
	Corresponde a 10 ⁷ UFC	+++	+++

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

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

La solución bacteriana que tiene la turbidez correspondiente a los estándares de McFarland No. 1, preparada en el Ejemplo de referencia 1, se añadió al esputo que se había confirmado que era negativo para la infección de tuberculosis para preparar una muestra de esputo pseudopositivo con un recuento bacteriano correspondiente a 10^7 UFC. Esta muestra se dispensó a tubos de plástico. A cada una de estas muestras de esputo, se 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. Luego, la muestra se trató térmicamente a 50 °C durante 30 minutos utilizando un bloque térmico. Luego, se recogió una alícuota de 100 μ l de la muestra así tratada, 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 antes, excepto que se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos sin el tratamiento térmico, seguido de una 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 en base a 5 grados: - (sin color), \pm (color débil), + (color distintivo), ++ (color más distintivo) y +++ (marcadamente coloreado). Los resultados de la evaluación se muestran en la Tabla 4.

20

Tabla 4

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

25

Como resultado, se confirmó que las muestras tratadas térmicamente desarrollaban un color evidente en el área de lectura, lo que demuestra la presencia de MPB64 en las muestras. Por el contrario, las muestras de control evidentemente diferían de las muestras tratadas térmicamente, aunque algunas muestras exhibieron un ligero color en el área de lectura. De acuerdo con lo anterior, 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* se puede detectar rápida y convenientemente a partir de una muestra biológica.

Aplicabilidad industrial

30

La presente invención proporciona un procedimiento para detectar un complejo de *Mycobacterium tuberculosis* de que puede realizarse conveniente y rápidamente directamente de una muestra biológica que contiene el complejo de *Mycobacterium tuberculosis* de sin operación de cultivo mediante tratamiento térmico de la muestra biológica a una temperatura predeterminada y ensayando inmunológicamente una proteína secretora específica del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* secretada de manera extracelular, y también proporciona un kit dirigido a la misma. La presente invención es útil no solo para la detección del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* desino también para el diagnóstico y tratamiento apropiados de la tuberculosis.

35

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento de detección de un complejo de *Mycobacterium tuberculosis*, que comprende someter una proteína específica del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* 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 a 46 °C a 48 °C durante al menos 15 minutos.
2. Un procedimiento para detectar un complejo de *Mycobacterium tuberculosis* de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el tratamiento térmico de la muestra biológica se lleva a cabo durante 15 minutos o más y 2,5 horas o menos.
- 10 3. Un procedimiento para detectar un complejo de *Mycobacterium tuberculosis* de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que la muestra biológica es al menos una muestra seleccionada del grupo que consiste en esputo, secreción bronquial, derrame pleural, jugo gástrico, sangre, líquido cefalorraquídeo, orina, heces, líquido de lavado bronquial y un tejido recogido del bronquio o el pulmón.
4. Un procedimiento para detectar un complejo de *Mycobacterium tuberculosis* de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la muestra biológica es esputo.
- 15 5. Un procedimiento para detectar un *Mycobacterium tuberculosis* de complejo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la muestra biológica se lisa con un agente de tratamiento de muestra antes de someterla al tratamiento térmico.
6. Un procedimiento para detectar un complejo de *Mycobacterium tuberculosis* de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la muestra biológica lisada con un agente de tratamiento de muestra se dispersa o disuelve en un disolvente antes de someterla al tratamiento térmico.
- 20 7. Un procedimiento para detectar un complejo de *Mycobacterium tuberculosis* de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el ensayo inmunológico es un inmunoensayo tipo sándwich que utiliza un primer anticuerpo y un segundo anticuerpo contra la proteína secretora específica del complejo de *Mycobacterium tuberculosis*.
- 25 8. Un procedimiento para detectar un complejo de *Mycobacterium tuberculosis* de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el ensayo inmunológico es un ensayo inmunocromatográfico.
9. Un procedimiento para detectar un complejo de *Mycobacterium tuberculosis* de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el ensayo inmunológico es ELISA.
- 30 10. Un procedimiento para detectar un complejo de *Mycobacterium tuberculosis* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en el que la proteína secretora específica del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* de es MPB64 o MPT64.

Estudio en condición óptima para la temperatura de tratamiento térmico

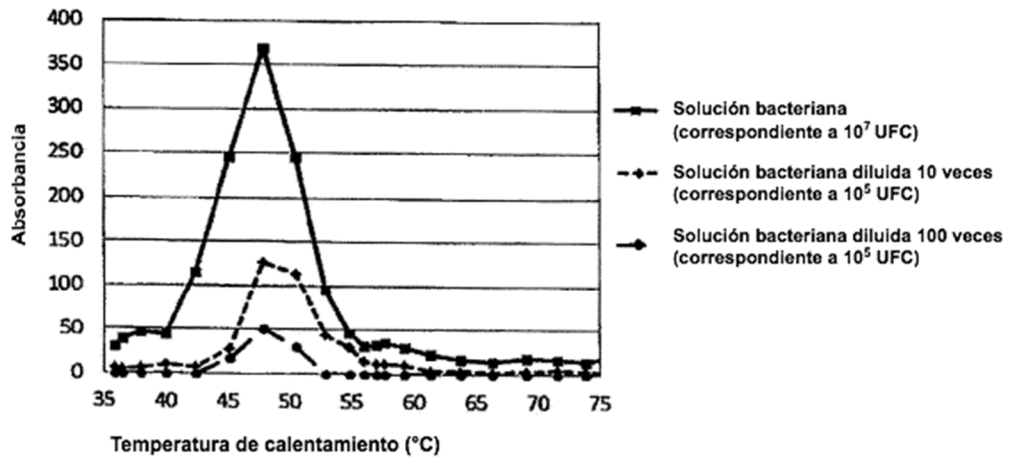


Figura 1

Estudio en condición óptima para la temperatura de tratamiento térmico

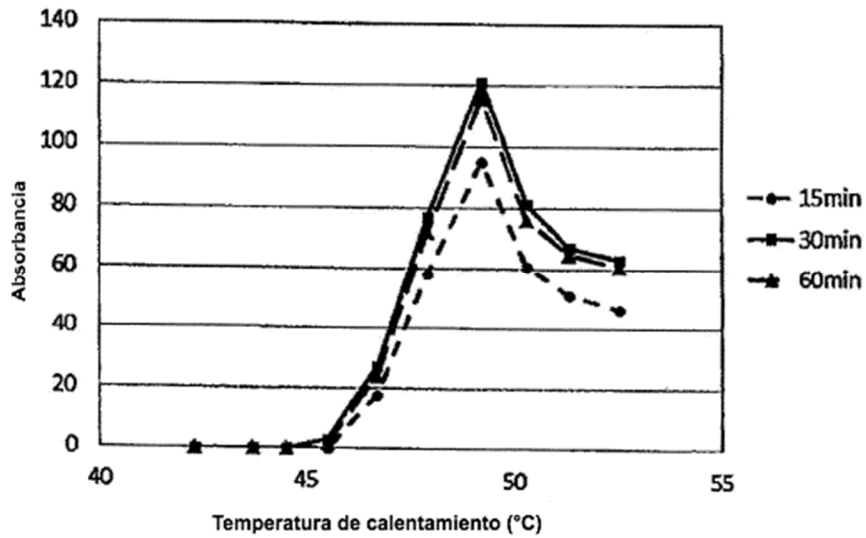


Figura 2