

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 784 357**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

C12Q 1/689 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.08.2016 PCT/EP2016/068608**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.02.2017 WO17021478**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.08.2016 E 16750429 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.02.2020 EP 3332026**

54 Título: **Composiciones y procedimientos para la detección de *Mycobacterium tuberculosis***

30 Prioridad:

06.08.2015 US 201514819427

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

24.09.2020

73 Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)

Grenzacherstrasse 124

4070 Basel, CH

72 Inventor/es:

JOHNSON, JENNY A.

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 784 357 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

Composiciones y procedimientos para la detección de *Mycobacterium tuberculosis*

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente divulgación se refiere al campo del diagnóstico bacteriano, y más en particular a la detección de *Mycobacterium Tuberculosis*.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La tuberculosis (TB) es una enfermedad bacteriana causada por diversas cepas de micobacterias, tales como *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) y otros miembros del complejo de MTB, que se encuentran con mayor frecuencia en los pulmones. Se transmite de persona a persona a través del aire cuando los individuos con tuberculosis pulmonar o laríngea, tosen, estornudan o escupen y lanzan MTB al aire. Se estima que un tercio de la población mundial está infectada con MTB y 9 millones de personas desarrollan TB cada año. La tuberculosis sigue siendo una de las principales causas de enfermedades infecciosas humanas y las cepas de MTB resistentes a los medicamentos están en aumento, especialmente en los países en desarrollo.

20 Dos fármacos de primera línea comunes para el tratamiento de MTB incluyen isoniazida (INH) y rifampicina (RIF), y los pacientes pueden adquirir MTB resistente a los fármacos al vivir o visitar un lugar donde prevalece la resistencia a los fármacos. Los pacientes también pueden desarrollar MTB resistente a los fármacos cuando se interrumpe su régimen de tratamiento con antibióticos. El cultivo en medios sólidos o líquidos todavía se considera el criterio de referencia para la detección de MTB y de resistencia a los fármacos frente a MTB, pero el cultivo puede llevar hasta ocho semanas para obtener resultados. Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica de un procedimiento rápido y fiable para detectar específicamente MTB de una manera sensible.

SUMARIO DE LA INVENCION

30 La presente divulgación se refiere a procedimientos para la detección rápida de la presencia o ausencia de MTB en una muestra biológica o no biológica, por ejemplo, detección múltiple de MTB por reacción en cadena de la polimerasa ultrarrápida en un solo tubo de ensayo. Dichos procedimientos de detección de MTB pueden comprender realizar al menos una etapa de ciclado, que puede incluir una etapa de amplificación y una etapa de hibridación. Además, se divulgan cebadores, sondas y kits diseñados para la detección de MTB en un solo tubo. Los procedimientos de detección están diseñados para dirigirse al *gen esxJ* (y sus genes homólogos *esxK*, *esxM*, *esxP*, *esxW*) lo que permite detectar MTB en una sola prueba.

40 En un modo de realización, se proporciona un procedimiento para detectar *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) y otros miembros del complejo de MTB en una muestra, que incluye realizar una etapa de amplificación que incluye poner en contacto la muestra con un conjunto de cebadores para *esxJ* para producir un producto de amplificación si un ácido nucleico de *esxJ* está presente en la muestra; realizar una etapa de hibridación que incluye poner en contacto el producto de amplificación con una o más sondas para *esxJ* detectables; y detectar la presencia o ausencia del producto de amplificación, en el que la presencia del producto de amplificación es indicativa de la presencia de MTB en la muestra y en el que la ausencia del producto de amplificación es indicativa de la ausencia de MTB en la muestra; en el que el conjunto de cebadores para *esxJ* comprende un primer cebador que comprende una primera secuencia de oligonucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, 7 y 9, o un complemento del mismo y un segundo cebador que comprende una segunda secuencia de oligonucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 15-17, o un complemento de la misma; y en el que la sonda para *esxJ* detectable comprende una tercera secuencia de oligonucleótidos SEQ ID NO: 30, o un complemento de la misma.

50 También se divulga que el conjunto de cebadores para la amplificación de la diana del gen *esxJ* incluye un primer cebador que comprende una primera secuencia de oligonucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9, o un complemento de las mismas, y un segundo cebador que comprende una segunda secuencia de oligonucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 y 21, o un complemento de las mismas, y la sonda detectable para la detección del producto de amplificación de *esxJ* incluye las secuencias de ácido nucleico de SEQ ID NO: 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 y 40, o un complemento de las mismas.

60 En algunos modos de realización del procedimiento, la etapa de hibridación comprende poner en contacto el producto de amplificación con una sonda para *esxJ* detectable que está marcada con un resto fluorescente donador y un resto aceptor correspondiente y la etapa de detección comprende detectar la presencia o ausencia de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) entre el resto fluorescente donador y el resto aceptor de la sonda, en el que la presencia o ausencia de fluorescencia es indicativa de la presencia o ausencia de MTB en la muestra. En algunos modos de realización, la etapa de amplificación emplea una enzima polimerasa que tiene una actividad nucleasa de 5' a 3'. En algunos modos de realización, el resto fluorescente

donador y el resto aceptor correspondiente están separados por no más de 8 a 20 nucleótidos entre sí en la sonda. En determinados modos de realización, el resto aceptor es un extintor. En algunos modos de realización, al menos uno de los oligonucleótidos primero, segundo y tercero comprende al menos un nucleótido modificado. En algunos modos de realización, el primer, segundo y tercer oligonucleótido tienen 40 nucleótidos o menos.

También se divulga un oligonucleótido que comprende o que consiste en una secuencia de nucleótidos seleccionada de SEQ ID NO: 1-40 o un complemento de las mismas, presentando dicho oligonucleótido 100 nucleótidos o menos. También se divulga un oligonucleótido que incluye un ácido nucleico que tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia (por ejemplo, al menos un 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 %, etc.) con una de las SEQ ID NO: 1-40, o un complemento de las mismas, presentando dicho oligonucleótido 100 nucleótidos o menos. En general, estos oligonucleótidos pueden ser ácidos nucleicos cebadores, ácidos nucleicos sonda o similares. También se divulga que los oligonucleótidos tienen 40 nucleótidos o menos (por ejemplo, 35 nucleótidos o menos, 30 nucleótidos o menos, etc.). También se divulga que los oligonucleótidos comprenden al menos un nucleótido modificado, por ejemplo, para alterar la estabilidad de hibridación del ácido nucleico con respecto a los nucleótidos no modificados. Opcionalmente, los oligonucleótidos comprenden al menos un marcador y/o al menos un resto extintor. También se divulga que los oligonucleótidos incluyen al menos una variación modificada conservativamente. Las "variaciones modificadas conservativamente" o, simplemente, las "variaciones conservativas" de una secuencia de ácido nucleico particular se refieren a los ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas o, cuando el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, a secuencias esencialmente idénticas. Un experto reconocerá que las sustituciones, deleciones o adiciones individuales que alteran, añaden o delecionan un único aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos (típicamente menos de un 5 %, más típicamente menos de un 4 %, 2 % o 1 %) en una secuencia codificada son "variaciones modificadas conservativamente" en las que las alteraciones dan como resultado la deleción de un aminoácido, la adición de un aminoácido o la sustitución de un aminoácido por un aminoácido químicamente similar.

También se divulga que la amplificación puede emplear una enzima polimerasa que tiene actividad nucleasa de 5' a 3'. Por tanto, el resto fluorescente donador y el resto aceptor, por ejemplo, un extintor, pueden estar separados por no más de 5 a 20 nucleótidos (por ejemplo, 8 o 10) entre sí a lo largo de la longitud de la sonda. También se divulga que la sonda para *esxJ* incluye una secuencia de ácido nucleico que permite la formación de estructuras secundarias. Dicha formación de estructuras secundarias en general da como resultado la proximidad espacial entre el primer y segundo resto fluorescente. De acuerdo con este procedimiento, el segundo resto fluorescente en la sonda puede ser un extintor. También se divulga un oligonucleótido que comprende o consiste en una secuencia de nucleótidos seleccionados de las SEQ ID NO: 1-40.

También se divulga una composición que comprende un conjunto de cebadores oligonucleotídicos adecuados para producir uno o más productos de amplificación de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) y otros miembros del complejo de MTB que comprende un primer cebador oligonucleotídico que comprende o que consiste en una secuencia de ácido nucleico seleccionada de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9, y un segundo cebador oligonucleotídico que comprende o consiste en una secuencia de ácido nucleico seleccionada de SEQ ID NO: 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 y 21, o un complemento de los mismos, presentando dichos cebadores oligonucleotídicos 100 nucleótidos o menos. También se divulga que la composición comprende además una sonda para *esxJ* detectable que comprende o que consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 y 40, o un complemento de las mismas. También se divulga que los cebadores oligonucleotídicos y/o la sonda oligonucleotídica tienen 100 nucleótidos o menos. También se divulga que los cebadores oligonucleotídicos y/o la sonda oligonucleotídica tienen 40 nucleótidos o menos. También se divulga que la sonda oligonucleotídica comprende un resto fluorescente donador y un resto aceptor correspondiente. También se divulga que el resto fluorescente donador y el resto aceptor correspondiente están separados por no más de 8-20 nucleótidos entre sí en la sonda. También se divulga que el resto aceptor es un extintor. También se divulga que al menos uno de los oligonucleótidos cebador y/o sonda comprende al menos un nucleótido modificado.

La presente divulgación proporciona también procedimientos para detectar la presencia o ausencia de MTB en una muestra biológica de un individuo. Dichos procedimientos en general incluyen realizar al menos una etapa de ciclado, que incluye una etapa de amplificación y una etapa de unión a tinte. Típicamente, la etapa de amplificación incluye poner en contacto la muestra con un par de cebadores para *esxJ* para producir uno o más productos de amplificación de *esxJ* si una molécula de ácido nucleico de *esxJ* está presente en la muestra, y la etapa de unión a tinte incluye poner en contacto el producto de amplificación de *esxJ* con un tinte de unión a ADN bicatenario. Dichos procedimientos también incluyen detectar la presencia o ausencia de unión del tinte de unión a ADN bicatenario en el producto de amplificación, en los que la presencia de unión es indicativa de la presencia de MTB en la muestra, y en el que la ausencia de unión es indicativa de la ausencia de MTB en la muestra. Un tinte de unión a ADN bicatenario representativo es el bromuro de etidio. Además, dichos procedimientos también pueden incluir determinar la temperatura de fusión entre el producto de amplificación de *esxJ* y el tinte de unión a ADN bicatenario, en el que la temperatura de fusión confirma la presencia o ausencia de MTB.

En un modo de realización adicional, se proporciona un kit para detectar un ácido nucleico de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) y otros miembros del complejo de MTB, en el que el kit incluye un primer cebador oligonucleotídico que comprende una primera secuencia de oligonucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, 7 y 9, o un complemento de las mismas; un segundo cebador oligonucleotídico que comprende una segunda secuencia de oligonucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 15-17, o un complemento de las mismas; y una tercera sonda marcada fluorescentemente detectable que comprende la secuencia de oligonucleótidos SEQ ID NO: 30, o un complemento, estando configurada la tercera sonda marcada detectablemente para hibridarse con un amplicón generado por el primer cebador y el segundo cebador. El kit también puede incluir un prospecto del envase e instrucciones para usar los cebadores, sondas y restos fluoróforos para detectar la presencia o ausencia de MTB en una muestra. También se divulga que el kit para detectar un ácido nucleico de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) y otros miembros del complejo de MTB comprende un primer cebador que comprende una primera secuencia de oligonucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-9, o un complemento de las mismas; un segundo cebador que comprende una segunda secuencia de oligonucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 10-21, o un complemento de las mismas; y una tercera secuencia de oligonucleótidos marcada de forma detectable por fluorescencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 22-40, o un complemento, estando configurada la tercera secuencia de oligonucleótidos marcada de forma detectable para hibridarse con un amplicón generado por el primer cebador y el segundo cebador. En algunos modos de realización, la tercera secuencia de oligonucleótidos marcada de manera detectable comprende un resto fluorescente donador y un resto aceptor correspondiente. En algunos modos de realización el resto aceptor es un extintor. En algunos modos de realización, el kit comprende además nucleósido trifosfatos, polimerasa de ácido nucleico y tampones necesarios para la función de la polimerasa de ácido nucleico. En algunos modos de realización, al menos uno de los primer, segundo y tercer oligonucleótidos comprende al menos un nucleótido modificado. En algunos modos de realización, el primer, segundo y tercer oligonucleótido tienen 40 nucleótidos o menos.

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece la presente invención. Aunque se pueden usar procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o en las pruebas de la presente materia objeto, se describen a continuación procedimientos y materiales adecuados. Además, los materiales, procedimientos y ejemplos son solo ilustrativos y no se pretende que sean limitantes.

Los detalles de uno o más modos de realización de la invención se exponen en los dibujos adjuntos y en la descripción a continuación. Otras características, objetos y ventajas de la invención serán evidentes a partir de los dibujos y la descripción detallada, y a partir de las reivindicaciones.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La FIGURA 1 muestra las curvas de crecimiento de PCR de los experimentos usando varios cebadores directos específicos para la diana *esxJ* para MTB.

La FIGURA 2 muestra las curvas de crecimiento de PCR de experimentos usando cebadores inversos específicos para la diana *esxJ* para MTB que muestran valores de codo más tempranos y una fluorescencia más alta de los tres cebadores inversos de *esxJ* en comparación con oligonucleótidos optimizados con 16S.

La FIGURA 3 muestra curvas de crecimiento de PCR de experimentos usando varios cebadores específicos para la diana *esxJ* para MTB, que muestran valores de fluorescencia y codo de 4 candidatos con la diana MTB.

La FIGURA 4 muestra curvas de crecimiento de PCR de los experimentos usando varios cebadores específicos para la diana *esxJ* para MTB, que muestran fluorescencia de 4 candidatos con diana distinta de MTB (*M.gastris*).

La FIGURA 5 muestra las curvas de crecimiento de la PCR de los experimentos usando varios cebadores específicos para la diana *esxJ* para MTB, que muestran la demostración de exclusividad con series de dilución de MTB y *le6c*/PCR de especies distintas de MTB (*M.gastris*, *M.szulgai* y *M.kansasii*).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

El diagnóstico de una infección por MTB mediante amplificación de ácido nucleico proporciona un procedimiento para detectar con rapidez y exactitud la infección bacteriana. En el presente documento se describe un ensayo ultrarrápido para detectar MTB en una muestra. Se proporcionan cebadores y sondas para detectar MTB, así como artículos de fabricación o kits que contienen dichos cebadores y sondas. La sensibilidad incrementada de la PCR ultrarrápida para la detección de MTB en comparación con otros procedimientos, así como las características mejoradas de la PCR ultrarrápida que incluyen la contención de la muestra y la detección ultrarrápida del producto amplificado, hacen factible la implementación de esta tecnología para el diagnóstico y la detección de MTB rutinarios en el laboratorio clínico.

La presente descripción incluye cebadores oligonucleotídicos y sondas de hidrólisis marcadas con fluorescencia que se hibridan con el locus de genes ESX-5 del genoma de MTB para identificar específicamente MTB usando la tecnología de amplificación y detección TaqMan®. Los oligonucleótidos se hibridan específicamente con el gen *esxJ*, ubicado dentro del locus ESX-5, y además se hibridan con otros cuatro homólogos del gen (*esxM*, *esxK*, *esxP* y *esxW*) ubicados fuera del locus ESX-5 en otras partes del genoma de MTB. Algunos miembros del complejo de MTB tienen menos de cinco copias de este homólogo del gen. Tener oligonucleótidos que se hibridan en múltiples ubicaciones en el genoma es más ventajoso para mejorar la sensibilidad que dirigirse a un locus genético de copia única.

La naturaleza multicopia de muchos de los genes de ESX-5 en el genoma de MTB se ha descrito en la bibliografía (por ejemplo, Uplekar et al., Infect. Immun., (2001) 79 (10): 4042-4049). Las proteínas codificadas por los miembros del locus de genes ESX-5 han sido bien estudiadas y se cree que provocan una fuerte respuesta inmunitaria del huésped que puede ser potencialmente útil para una futura vacuna que proteja contra la infección por MTB. Sin embargo, los oligonucleótidos dirigidos a *esxJ* y sus homólogos con fines de diagnóstico no se han descrito anteriormente y pueden ofrecer una sensibilidad aproximadamente 5 veces mejor en comparación con los oligonucleótidos dirigidos a 16S (un locus genético de MTB de copia única).

Los procedimientos divulgados pueden incluir realizar al menos una etapa de ciclado que incluya amplificar una o más partes de la diana génica de la molécula de ácido nucleico de *esxJ* de una muestra usando uno o más pares de cebadores para *esxJ*. «Cebador(es) para *EsxJ*», como se usa en el presente documento, se refiere a cebadores oligonucleotídicos que se aparean específicamente con la secuencia de ácido nucleico que codifica *esxJ*, y además se hibridan con otros cuatro homólogos del gen (*esxM*, *esxK*, *esxP* y *esxW*) en MTB, e inician la síntesis de ADN a partir de ellos bajo condiciones apropiadas produciendo los respectivos productos de amplificación. Cada uno de los cebadores para *esxJ* analizados se aparean con una diana dentro de o adyacente a la molécula de ácido nucleico diana de *esxJ*, *esxM*, *esxK*, *esxP* y *esxW* respectiva, de modo que al menos una parte de cada producto de amplificación contiene una secuencia de ácido nucleico correspondiente a la diana. El uno o más de los productos de amplificación de *esxJ*, *esxM*, *esxK*, *esxP* y/o *esxW* se producen siempre que uno o más de los ácidos nucleicos de *esxJ*, *esxM*, *esxK*, *esxP* y/o *esxW* estén presentes en la muestra, por lo tanto, la presencia uno o más de los productos de amplificación de *esxJ*, *esxM*, *esxK*, *esxP* y/o *esxW* es indicativa de la presencia de MTB en la muestra. El producto de amplificación debe contener las secuencias de ácido nucleico que son complementarias a una o más sondas para *esxJ* detectables. «Sonda(s) para *esxJ*», como se usa en el presente documento, se refiere a sondas oligonucleotídicas que se aparean específicamente con la secuencia de ácido nucleico que codifica *esxJ*, y además se hibridan con otros cuatro homólogos del gen (*esxM*, *esxK*, *esxP* y *esxW*) en MTB. Cada etapa de ciclado incluye una etapa de amplificación, una etapa de hibridación y una etapa de detección, en la que la muestra se pone en contacto con la una o más sondas para *esxJ* detectables para la detección de la presencia o ausencia de MTB en la muestra.

Tal como se usa en el presente documento, el término "amplificación" se refiere al procedimiento de sintetizar moléculas de ácido nucleico que son complementarias a una o ambas cadenas de una molécula de ácido nucleico molde (por ejemplo, *esxJ*). Amplificar una molécula de ácido nucleico típicamente incluye desnaturalizar el ácido nucleico molde, apareamiento de cebadores al ácido nucleico molde a una temperatura que esté por debajo de las temperaturas de fusión de los cebadores y alargar enzimáticamente a partir de los cebadores para generar un producto de amplificación. La amplificación típicamente requiere la presencia de desoxirribonucleósido trifosfatos, una enzima ADN polimerasa (por ejemplo, TaqPlatinum®) y un tampón apropiado y/o cofactores para la actividad óptima de la enzima polimerasa (por ejemplo, MgCl₂ y/o KCl).

El término "cebador" se usa en el presente documento como se conoce por los expertos en la técnica y se refiere a compuestos oligoméricos, principalmente a oligonucleótidos, pero también a oligonucleótidos modificados que pueden "cebar" la síntesis de ADN mediante una ADN polimerasa dependiente de molde, es decir, el extremo 3', por ejemplo, del oligonucleótido proporciona un grupo 3'-OH libre al que se pueden unir "nucleótidos" adicionales mediante una ADN polimerasa dependiente de molde que establece un enlace fosfodiéster 3' a 5', con lo que se usan desoxinucleósido trifosfatos, y con lo que se libera pirofosfato. Por lo tanto, no existe una diferencia fundamental entre un "cebador", un "oligonucleótido" o una "sonda", excepto posiblemente respecto a la función deseada.

El término "hibridación" se refiere al apareamiento de una o más sondas con un producto de amplificación. Las condiciones de hibridación típicamente incluyen una temperatura que está por debajo de la temperatura de fusión de las sondas, pero que evita la hibridación no específica de las sondas.

El término "actividad nucleasa en dirección 5' a 3'" se refiere a una actividad de una polimerasa de ácido nucleico, típicamente asociada a la síntesis de la cadena de ácido nucleico, con lo que se eliminan los nucleótidos del extremo 5' de la cadena de ácido nucleico.

El término "polimerasa termoestable" se refiere a una enzima polimerasa que es termoestable frente al calor, es decir, la enzima cataliza la formación de productos de extensión del cebador complementarios a un molde y no se desnaturaliza de forma irreversible cuando se somete a temperaturas elevadas durante el tiempo necesario

para efectuar la desnaturalización de ácidos nucleicos molde bicatenarios. En general, la síntesis se inicia en el extremo 3' de cada cebador y continúa en la dirección de 5' a 3' a lo largo de la cadena molde. Se han aislado polimerasas termoestables de *Thermusflavus*, *T. ruber*, *T. thermophilus*, *T. aquaticus*, *T. lacteus*, *T. rubens*, *Bacillusstearothermophilus*, y *Methanothermusfervidus*. No obstante, también se pueden emplear polimerasas que no son termoestables en ensayos de PCR siempre que se reponga la enzima.

El término "complemento del mismo" se refiere a un ácido nucleico que al mismo tiempo tiene la misma longitud que, y es exactamente complementario a, un ácido nucleico dado.

El término "extensión" o "alargamiento" cuando se usa con respecto a ácidos nucleicos, se refiere a cuando se incorporan nucleótidos adicionales (u otras moléculas análogas) en los ácidos nucleicos. Por ejemplo, un ácido nucleico se extiende opcionalmente por un biocatalizador que incorpora nucleótidos, tal como una polimerasa que típicamente añade nucleótidos en el extremo terminal 3' de un ácido nucleico.

Los términos "idéntico" o porcentaje de "identidad" en el contexto de dos o más secuencias de ácido nucleico, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje especificado de nucleótidos que son iguales, cuando se comparan y alinean para una correspondencia máxima, por ejemplo, como se mide usando uno de los algoritmos de comparación de secuencias disponibles para los expertos o por inspección visual. Los algoritmos ejemplares que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y la similitud de secuencia son los programas BLAST, que se describen, por ejemplo, en Altschulet al.(1990) "Basic local alignment search tool" *J. Mol. Biol.* 215:403-410, Gish et al. (1993) "Identification of protein coding regions by database similarity search» *Nature Genet.* 3:266-272, Madden et al. (1996) "Applications of network BLAST server" *Meth. Enzymol* 266:131-141, Altschulet al. (1997) "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs" *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402, y Zhang et al. (1997) "PowerBLAST: A new network BLAST application for interactive or automated sequence analysis and annotation" *Genome Res.* 7:649-656.

Un "nucleótido modificado" en el contexto de un oligonucleótido se refiere a una alteración en la que al menos un nucleótido de la secuencia de oligonucleótidos se reemplaza por un nucleótido diferente que proporciona una propiedad deseada al oligonucleótido. Nucleótidos modificados ejemplares que se pueden sustituir en los oligonucleótidos descritos en el presente documento incluyen, por ejemplo, una C5-metil-dC, una C5-etil-dC, una C5-metil-dU, una C5-etil-dU, una 2,6-diaminopurina, una C5-propinil-dC, una C5-propinil-dU, una C7-propinil-dA, una C7-propinil-dG, una C5-propargilamino-dC, una C5-propargilamino-dU, una C7-propargilamino-dA, una C7-propargilamino-dG, una 7-desaza-2-desoxixantocina, un análogo de pirazolopirimidina, una pseudo-dU, un nitropirrol, un nitroindol, 2'-0-metil-ribo-U, 2'-0-metil-ribo-C, una N4-etil-dC, una N6-metil-dA y similares. Muchos otros nucleótidos modificados que pueden estar sustituidos en los oligonucleótidos se mencionan en el presente documento o se conocen de otro modo en la técnica. En determinados modos de realización, las sustituciones de nucleótidos modificados modifican las temperaturas de fusión (Tf) de los oligonucleótidos con respecto a las temperaturas de fusión de los oligonucleótidos no modificados correspondientes. Para ilustrar adicionalmente, determinadas sustituciones de nucleótidos modificados pueden reducir la amplificación de ácido nucleico inespecífica (por ejemplo, minimizar la formación de dímeros de cebadores o similares), aumentar el rendimiento de un amplicón diana deseado y/o similares en algunos modos de realización. Los ejemplos de estos tipos de modificaciones en ácidos nucleicos se describen, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 6.001.611.

45 **Detección de MTB**

La presente divulgación proporciona procedimientos para detectar MTB amplificando, por ejemplo, una parte de la secuencia de ácido nucleico de *esxJ*. Las secuencias de ácido nucleico de *esxJ* están disponibles (p. ej., n.º de acceso de GenBank NC_009565). Específicamente, los cebadores y las sondas para amplificar y detectar dianas de moléculas de ácido nucleico de *esxJ* se proporcionan por los modos de realización en la presente divulgación. Para la detección de MTB, se proporcionan cebadores y sondas para amplificar el *esxJ*. También se pueden usar ácidos nucleicos de *esxJ* distintos de los ejemplificados en el presente documento para detectar MTB en una muestra. Por ejemplo, se pueden evaluar la especificidad y/o sensibilidad de variantes funcionales por los expertos en la técnica usando procedimientos rutinarios. Las variantes funcionales representativas pueden incluir, por ejemplo, una o más deleciones, inserciones y/o sustituciones en los ácidos nucleicos de *esxJ* divulgados en el presente documento. Más específicamente, modos de realización de los oligonucleótidos incluyen, cada uno, un ácido nucleico con una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 1-40, una variante sustancialmente idéntica de la misma en la que la variante tiene al menos, por ejemplo, un 80 %, 90 % o 95 % de identidad de secuencia con una de las SEQ ID NO: 1-40, o un complemento de las SEQ ID NO: 1-40 y la variante.

TABLA I: Cebadores directos para *EsxJ*

Cebadores directos				
Nombre oligonucleótido	del	SEQ ID NO:	Secuencia	Modificaciones
JJESXFP01BBA		1	GTTTTGAGGTGCACGCCAGJ	J = t-butylbencil-dA
JJESXFP02BBA		2	ATGGCCTCACGTTTTATGACGGJ	J = t-butylbencil-dA
JJESXFP03BBA		3	ACATGGCGGGCCGTTTTGJ	J = t-butylbencil-dA
JJESXFP04BBA		4	TTTTGAGGTGCACGCCAGJ	J = t-butylbencil-dA
JJESXFP05BBA		5	TTTGAGGTGCACGCCAGJ	J = t-butylbencil-dA
JJESXFP06BBA		6	TTGAGGTGCACGCCAGJ	J = t-butylbencil-dA
JJESXFP07BBC		7	GACGGTGGAGGACGAGGCTJ	J = t-butylbencil-dC
JJESXFP08BBC		8	CGGTGGAGGACGAGGCTJ	J = t-butylbencil-dC
JJESXFP09BBC		9	GGTGGAGGACGAGGCTJ	J = t-butylbencil-dC

TABLA II: Cebadores inversos para *esxJ*

Cebadores inversos				
Nombre oligonucleótido	del	SEQ ID NO:	Secuencia	Modificaciones
JJESXAP01FQ6		10	ATGTTGCGAAACGCCTGATTCJ	J = t-butylbencil-dA
JJESXRP02BBA		11	TCGTAGTTGTTGGCGTCGGAJ	J = t-butylbencil-dA
JJESXRP03BBA		12	TAGTTGTTGGCGTCGGAACCJ	J = t-butylbencil-dA
JJESXRP04BBC		13	GGCCATGGTGTCTAGCGAGGTJ	J = t-butylbencil-dC
JJESXRP05BBC		14	GCCATGGTGTCTAGCGAGGTJ	J = t-butylbencil-dC
JJESXRP06BBC		15	CCATGGTGTCTAGCGAGGTJ	J = t-butylbencil-dC
JJESXRP07BBC		16	TCATGGTGTCTAGCGAGGTJ	J = t-butylbencil-dC
JJESXRP08BBC		17	GTCATGGTGTCTAGCGAGGTJ	J = t-butylbencil-dC
JJESXRP09BBC		18	TGTCTAGCGAGGTCGCCTJ	J = t-butylbencil-dC
JJESXRP10BBC		19	GTCTAGCGAGGTCGCCTJ	J = t-butylbencil-dC
JJESXRP11BBC		20	CCTCGGCCATGCCACTJ	J = t-butylbencil-dC
JJESXRP12BBC		21	CTCGGCCATGCCACTJ	J = t-butylbencil-dC

TABLA III: Sondas para esxJ

Sondas				
Nombre del oligonucleótido	SEQ NO:	ID	Secuencia	Modificaciones
JJESXAP01FQ6	22		FTCTAGCQAGGTCGCTCGGGCCA TGCCACTCP	P = fosfato, F = th-FAM, Q = BHQ2
JJESXAP02FQ6	23		FTTTTGCQGGGACGCCACATCC GGCP	P = fosfato, F = th-FAM, Q = BHQ2
JJESXSP01FQ6	24		FGGCCGAQGGCGACCTCGCTAGA CACCATGACCTAGP	P = fosfato, F = th-FAM, Q = BHQ2
JJESXSP02FQ6	25		FTGGCCGQAGGCGACCTCGCTAG ACACCATGACCTAGATP	P = fosfato, F = th-FAM, Q = BHQ2
JJESXAP02GFQ6	26		FTTTTIGCQGLGGACGCCACATCC GGCP	P = fosfato, F = th-FAM, Q = BHQ2, L = G-conector
JJESXAP03FQ6	27		FTTTTGCQGGGACGCCACATCC GGP	P = fosfato, F = th-FAM, Q = BHQ2
JJESXAP03GFQ6	28		FTTTTGCQGLGGACGCCACATCC GGP	P = fosfato, F = th-FAM, Q = BHQ2, L = G-conector
JJESXAP04FQ6	29		FTTTTGCQGGGACGCCACATCC GP	P = fosfato, F = th-FAM, Q = BHQ2
JJESXAP04FQ5	30		FTTTTGCQGGGACGCCACATCC GP	P = fosfato, F = th-FAM, Q = BHQ2
JJESXAP04GFQ6	31		FTTTTGCQGLGGACGCCACATCC GP	P = fosfato, F = th-FAM, Q = BHQ2, L = G-conector
JJESXAP05FQ6	32		FTTTTGCQGGGACGCCACATCCG GP	P = fosfato, F = th-FAM, Q = BHQ2
JJESXAP06FQ6	33		FTTTTGCQGGGACGCCACATCCG P	P = fosfato, F = th-FAM, Q = BHQ2
JJESXAP07FQ6	34		FTGTTTQGCQGGGACGCCACAT CCGP	P = fosfato, F = th-FAM, Q = BHQ2
JJESXAP08FQ6	35		FTGTTTQGCQGGGACGCCACAT CCP	P = fosfato, F = th-FAM, Q = BHQ2
JJESXAP08FQ5	36		FTGTTTQGCQGGGACGCCACAT CCP	P = fosfato, F = th-FAM, Q = BHQ2
JJESXAP16PFQ6	37		<FAM_Thr><pdU><pdU><pdU><pdU><pdU> <G><pdC><BHQ_2><G><pdC>GGA<p <dC><G><pdC><pdC><pdC>A<Phos>	
JJESXAP17PFQ6	38		<FAM_Thr><pdU><pdU><pdU><pdU><pdU> <G><pdC><BHQ_2><G><pdC>GGA<p <dC><G><pdC><pdC><pdC><Phos>	

Amplicones			
Nombre del oligonucleótido	SEQ ID NO:	Secuencia	Anotaciones
Región amplicón esxM	del de 43	<p>ATGGCCTCGCGTTTTATGACGGAT CCGCACGCGATGCGGGACATGGC GGGCCGTTTTGAGGTGCACGCC AGACGGTGGAGGACGAGGCTCGC CGGATGTGGGCGTCCGCGCAAAA CATCTCGGGCGCGGGCTGGAGTGC GCATGGCCGAGGCGACCTCGCTA GACACCATGGCCCAGATGAATCA GCGTTTTCGCAACATCGTGAACAT GCTGCACGGGGTGGGTGACGGGC TGGTTCGCGACGCCAACAACTAC GA</p>	Cebador DIR FP01 y cebador INV RP02 (<u>subrayado</u>), nucleótidos que indican diferencias entre las 5 copias (homólogos) del gen esx (subrayado en negrita)
Región amplicón esxP	del de 44	<p>ATGGCCTCGCGTTTTATGACGGAT CCGCACGCGATGCGGGACATGGC GGGCCGTTTTGAGGTGCACGCC AGACGGTGGAGGACGAGGCTCGC CGGATGTGGGCGTCCGCGCAAAA CATTTCCGGTGCGGGCTGGAGTGC GCATGGCCGAGGCGACCTCGCTA GACACCATGGCCAGATGAATCA GCGTTTTCGCAACATCGTGAACAT GCTGCACGGGGTGGGTGACGGGC TGGTTCGCGACGCCAACAACTAC GA</p>	Cebador DIR FP01 y cebador INV RP02 (<u>subrayado</u>), nucleótidos que indican diferencias entre las 5 copias (homólogos) del gen esx (subrayado en negrita)
Región amplicón esxW	del de 45	<p>ATGGCCTCGCGTTTTATGACGGAT CCGCATGCGATGCGGGACATGGC GGGCCGTTTTGAGGTGCACGCC AGACGGTGGAGGACGAGGCTCGC CGGATGTGGGCGTCCGCGCAAAA CATTTCCGGTGCGGGCTGGAGTGC GCATGGCCGAGGCGACCTCGCTA GACACCATGACCTAGATGAATCA GCGTTTTCGCAACATCGTGAACAT GCTGCACGGGGTGGGTGACGGGC TGGTTCGCGACGCCAACAACTAC GA</p>	Cebador DIR FP01 y cebador INV RP02 (<u>subrayado</u>), nucleótidos que indican diferencias entre las 5 copias (homólogos) del gen esx (subrayado en negrita)

En un modo de realización, los conjuntos de cebadores y sondas para *esxJ* descritos anteriormente se usan para proporcionar la detección de MTB en una muestra biológica de la que se sospecha que contiene MTB. Los conjuntos de cebadores y sondas pueden comprender o consistir en los cebadores y las sondas específicos para las secuencias de ácido nucleico de *esxJ*, que comprenden o consisten en las secuencias de ácido nucleico de las SEQ ID NO: 1-40. En otro modo de realización, los cebadores y las sondas para las dianas de *esxJ* comprenden o consisten en una variante funcionalmente activa de cualquiera de los cebadores y sondas de las SEQ ID NO: 1-40. En algunos modos de realización, un primer cebador comprende o consiste en una primera secuencia de oligonucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-9, o un complemento de la misma. En algunos modos de realización, un segundo cebador comprende o consiste en una segunda secuencia de oligonucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 10-21, o un complemento de la misma. En algunos modos de realización, una sonda para *esxJ* detectable comprende o consiste en una tercera secuencia de oligonucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 22-40, o el complemento de la misma. En algunos modos de realización, el primer cebador comprende o consiste en una primera secuencia de oligonucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-9 y el segundo cebador comprende o consiste en una segunda secuencia de oligonucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 10-21. En algunos modos de realización, el primer cebador comprende o consiste en una primera secuencia de oligonucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-9, el segundo cebador comprende o consiste en una segunda secuencia de oligonucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 10-21 y la tercera sonda para *esxJ* detectable comprende o consiste en una tercera secuencia de oligonucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 22-40, o el complemento de la misma.

En algunos modos de realización, el primer cebador comprende o consiste en una secuencia de oligonucleótidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1 y 4-6 y/o 7-9, o un complemento de las mismas. En algunos modos de realización, un segundo cebador comprende o consiste en una segunda secuencia de oligonucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 13-17, o un complemento de la misma. En algunos modos de realización, una sonda para *esxJ* detectable comprende o consiste en una tercera secuencia de oligonucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 23 y 26-36, o el complemento de la misma. En algunos modos de realización, el primer cebador comprende o consiste en una primera secuencia de oligonucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 y 4-6 y/o 7-9 y el segundo cebador comprende o consiste en una segunda secuencia de oligonucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 13-17. En algunos modos de realización, el primer cebador comprende o consiste en una primera secuencia de oligonucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 y 4-6 y/o 7-9, el segundo cebador comprende o consiste en una segunda secuencia de oligonucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 13-17 y la tercera sonda para *esxJ* detectable comprende o consiste en una tercera secuencia de oligonucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 23 y 26-36, o el complemento de la misma.

En algunos modos de realización, el primer cebador comprende o consiste en una primera secuencia de oligonucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 7-9, o un complemento de la misma. En algunos modos de realización, un segundo cebador comprende o consiste en una segunda secuencia de oligonucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 15-17, o un complemento de la misma. En algunos modos de realización, una sonda para *esxJ* detectable comprende o consiste en una tercera secuencia de oligonucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 29-30 y 35-36, o el complemento de la misma. En algunos modos de realización, el primer cebador comprende o consiste en una primera secuencia de oligonucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 7-9 y el segundo cebador comprende o consiste en una segunda secuencia de oligonucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 15-17. En algunos modos de realización, el primer cebador comprende o consiste en una primera secuencia de oligonucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 7-9, el segundo cebador comprende o consiste en una segunda secuencia de oligonucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 15-17 y la tercera sonda para *esxJ* detectable comprende o consiste en una tercera secuencia de oligonucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 29-30 y 35-36, o el complemento de la misma. En determinados modos de realización, el primer cebador comprende o consiste en una primera secuencia de oligonucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 7, o un complemento de la misma. En determinados modos de realización, un segundo cebador comprende o consiste en una segunda secuencia de oligonucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 16, o un complemento de la misma. En determinados modos de realización, una sonda para *esxJ* detectable comprende o consiste en una tercera secuencia de oligonucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 30, o el complemento de la misma. En determinados modos de realización, el primer cebador comprende o consiste en una primera secuencia de oligonucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 7 y el segundo cebador comprende o consiste en una segunda secuencia de oligonucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 16. En determinados modos de realización, el primer cebador comprende o consiste en una primera secuencia de oligonucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 7, el segundo cebador comprende o consiste en una segunda secuencia de oligonucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 16 y la tercera sonda para *esxJ* detectable comprende o consiste en una tercera secuencia de oligonucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 30, o el complemento de la misma.

Una variante funcionalmente activa de cualquiera de los cebadores y/o sondas de las SEQ ID NO: 1-40 se puede identificar usando los cebadores y/o sondas en los procedimientos divulgados. Una variante funcionalmente activa de un cebador y/o sonda de cualquiera de las SEQ ID NO: 1-40 se refiere a un cebador y/o sonda que proporciona una especificidad y sensibilidad similar o superior en el procedimiento o kit descrito en comparación con la secuencia de las SEQ ID NO: 1-40.

La variante puede variar, por ejemplo, de la secuencia de las SEQ ID NO: 1-40 en una o más adiciones, deleciones o sustituciones de nucleótidos, tal como una o más adiciones, deleciones o sustituciones de nucleótidos en el extremo 5' y/o en el extremo 3' de la secuencia respectiva de las SEQ ID NO: 1-40. Como se detalla anteriormente, un cebador (y/o sonda) se puede modificar químicamente, es decir, un cebador y/o sonda pueden comprender un nucleótido modificado o un compuesto no nucleotídico. Una sonda (o un cebador) es, entonces, un oligonucleótido modificado. Los "nucleótidos modificados" (o "análogos de nucleótidos") difieren de un "nucleótido" natural en alguna modificación, pero todavía consisten en una base o compuesto similar a base, un azúcar pentofuranosilo o un compuesto similar a azúcar pentofuranosilo, una porción fosfato o porción similar a fosfato o combinaciones de los mismos. Por ejemplo, se puede unir un "marcador" a la porción de base de un "nucleótido", con lo que se obtiene un "nucleótido modificado". Una base natural en un "nucleótido" también se puede reemplazar por, por ejemplo, una 7-desazapurina, con lo que también se obtiene un "nucleótido modificado". Los términos "nucleótido modificado" o "análogo de nucleótido" se usan de manera intercambiable en la presente solicitud. Un "nucleósido modificado" (o "análogo de nucleósido") difiere de un nucleósido natural en alguna modificación de la manera como se explica anteriormente para un "nucleótido modificado" (o un "análogo de nucleótido").

Se pueden diseñar oligonucleótidos, incluyendo oligonucleótidos modificados y análogos de oligonucleótidos que amplifican una molécula de ácido nucleico que codifica *esxJ*, por ejemplo, ácidos nucleicos que codifican porciones alternativas de *esxJ*, usando, por ejemplo, un programa de ordenador tal como OLIGO (Molecular BiologyInsights Inc., Cascade, Colo.). Las características importantes cuando se diseñan oligonucleótidos que se van a usar como cebadores de amplificación incluyen, pero no se limitan a, un producto de amplificación de tamaño apropiado para facilitar la detección (por ejemplo, por electroforesis), temperaturas de fusión similares para los miembros de un par de cebadores, y la longitud de cada cebador (es decir, los cebadores necesitan ser lo suficientemente largos para aparearse con especificidad de secuencia y para iniciar la síntesis, pero no tan largos como para que se reduzca la fidelidad durante la síntesis del oligonucleótido). Típicamente, los cebadores oligonucleotídicos tienen de 8 a 50 nucleótidos de longitud (por ejemplo, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48 o 50 nucleótidos de longitud).

Además de un conjunto de cebadores, los procedimientos pueden usar una o más sondas para detectar la presencia o ausencia de MTB. El término "sonda" se refiere a ácidos nucleicos (ADN o ARN) producidos sintéticamente o biológicamente, que por diseño o selección contienen secuencias de nucleótidos específicas que les permiten hibridarse en condiciones rigurosas predeterminadas definidas específicamente (es decir, preferentemente) con "ácidos nucleicos diana", en el presente caso con un ácido nucleico (diana) de *esxJ*. Una "sonda" se puede denominar "sonda de detección", lo que significa que detecta el ácido nucleico diana.

En algunos modos de realización, las sondas para *esxJ* descritas pueden marcarse con al menos un marcador fluorescente. En un modo de realización, la sonda para *esxJ* se puede marcar con un resto fluorescente donador, por ejemplo, un tinte fluorescente, y un resto aceptor correspondiente, por ejemplo, un extintor. En un modo de realización, la sonda comprende o consiste en un resto fluorescente y las secuencias de ácido nucleico comprenden o consisten en la SEQ ID NO: 22-40.

El diseño de oligonucleótidos a usar como sondas se puede realizar de manera similar al diseño de cebadores. Los modos de realización pueden usar una única sonda o un par de sondas para la detección del producto de amplificación. Dependiendo del modo de realización, el uso de la(s) sonda(s) puede comprender al menos un marcador y/o al menos un resto extintor. Como sucede con los cebadores, las sondas normalmente tienen temperaturas de fusión similares, y la longitud de cada sonda debe ser suficiente para que se produzca la hibridación específica de secuencia, pero no tan larga como para que se reduzca la fidelidad durante la síntesis. Las sondas oligonucleotídicas en general tienen de 15 a 40 (por ejemplo, 16, 18, 20, 21, 22, 23, 24 o 25) nucleótidos de longitud.

Las construcciones pueden incluir vectores, cada uno de los cuales contiene uno de los cebadores de *esxJ* y moléculas de ácido nucleico sondas (por ejemplo, las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10). Se pueden usar construcciones, por ejemplo, como moléculas de ácido nucleico molde de control. Los vectores adecuados para su uso están disponibles comercialmente y/o se producen mediante procedimientos de tecnología de ácido nucleico recombinante rutinarios en la técnica. Las moléculas de ácido nucleico de *esxJ* se pueden obtener, por ejemplo, mediante síntesis química, clonación directa a partir de MTB o mediante amplificación por PCR.

Las construcciones adecuadas para su uso en los procedimientos de la invención típicamente incluyen, además de las moléculas de ácido nucleico de *esxJ* (por ejemplo, una molécula de ácido nucleico que contiene una o

más secuencias de las SEQ ID NO: 1-40), secuencias que codifican un marcador seleccionable (por ejemplo, un gen de resistencia a antibióticos) para seleccionar construcciones y/o transformantes deseados, y un origen de replicación. La elección de los sistemas de vectores normalmente depende de varios factores, incluyendo, pero sin limitarse a, la elección de células huésped, eficacia de la replicación, selectividad, inducibilidad y facilidad de recuperación.

Las construcciones que contienen moléculas de ácido nucleico de *esxJ* pueden propagarse en una célula huésped. Como se usa en el presente documento, el término célula huésped pretende incluir procariontes y eucariotas, tales como células de levaduras, vegetales y animales. Los huéspedes procariontes pueden incluir *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Serratiamarcescens* y *Bacillus subtilis*. Los huéspedes eucariotas incluyen levaduras, tales como *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *Pichia pastoris*, células de mamífero, tales como células COS o células de ovario de hámster chino (CHO), células de insecto y células vegetales, tales como *Arabidopsis thaliana* y *Nicotiana tabacum*. Se puede introducir una construcción en una célula huésped usando cualquiera de las técnicas conocidas comúnmente por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la precipitación con fosfato de calcio, electroporación, choque térmico, lipofección, microinyección y transferencia de ácido nucleico mediada por virus son procedimientos comunes para introducir ácidos nucleicos en células huésped. Además, se puede suministrar ADN desnudo directamente a las células (véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.º 5.580.859 y 5.589.466).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las patentes de EE. UU. n.º 4.683.202, 4.683.195, 4.800.159 y 4.965.188 divulgan técnicas de PCR convencionales. La PCR típicamente emplea dos cebadores oligonucleotídicos que se unen a un molde de ácido nucleico seleccionado (por ejemplo, ADN o ARN). Los cebadores útiles en algunos modos de realización incluyen oligonucleótidos que pueden actuar como puntos de iniciación de la síntesis de ácido nucleico dentro de las secuencias de ácido nucleico de *esxJ* descritas (por ejemplo, las SEQ ID NO: 1-21). Un cebador se puede purificar a partir de un hidrolizado de enzimas de restricción por procedimientos convencionales, o se puede producir de forma sintética. El cebador es preferentemente monocatenario para una máxima eficacia en la amplificación, pero el cebador puede ser bicatenario. Los cebadores bicatenarios se desnaturalizan en primer lugar, es decir, se tratan para separar las cadenas. Un procedimiento de desnaturalización de ácidos nucleicos bicatenarios es por calentamiento. Si el ácido nucleico molde es bicatenario, es necesario separar las dos cadenas antes de que se pueda usar como molde en la PCR. La separación de las cadenas se puede lograr por cualquier procedimiento de desnaturalización adecuado incluyendo medios físicos, químicos o enzimáticos. Un procedimiento de separación de las cadenas de ácido nucleico implica calentar el ácido nucleico hasta que esté predominantemente desnaturalizado (por ejemplo, más de un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 95 % desnaturalizado). Las condiciones de calentamiento necesarias para desnaturalizar el ácido nucleico molde dependerán, por ejemplo, de la concentración de sal tampón y de la longitud y composición de nucleótidos de los ácidos nucleicos que se desnaturalizan, pero típicamente varían de aproximadamente 90 °C a aproximadamente 105 °C durante un tiempo que depende de las características de la reacción, tal como la temperatura y la longitud del ácido nucleico. La desnaturalización típicamente se realiza durante aproximadamente 30 s a 4 min (por ejemplo, de 1 min a 2 min 30 s, o 1,5 min).

Si el ácido nucleico molde bicatenario se desnaturaliza con calor, la mezcla de reacción se deja enfriar hasta una temperatura que promueva el apareamiento de cada cebador con su secuencia diana en las moléculas de ácido nucleico de *esxJ* descritas. La temperatura para el apareamiento es normalmente de aproximadamente 35 °C a aproximadamente 65 °C (por ejemplo, de aproximadamente 40 °C a aproximadamente 60 °C; de aproximadamente 45 °C a aproximadamente 50 °C). Los tiempos de apareamiento pueden ser de aproximadamente 10 s a aproximadamente 1 min (por ejemplo, de aproximadamente 20 s a aproximadamente 50 s; de aproximadamente 30 s a aproximadamente 40 s). A continuación, se ajusta la mezcla de reacción a una temperatura a la que se promueve u optimiza la actividad de la polimerasa, es decir, una temperatura suficiente para que se produzca la extensión a partir del cebador apareado para generar productos complementarios al ácido nucleico molde. La temperatura debe ser suficiente para sintetizar un producto de extensión a partir de cada cebador que se aparee con un molde de ácido nucleico, pero no debe ser tan alta como para desnaturalizar un producto de extensión de su molde complementario (por ejemplo, la temperatura para extensión varía, en general, de aproximadamente 40 °C a aproximadamente 80 °C (por ejemplo, de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 70 °C; aproximadamente 60 °C). Los tiempos de extensión pueden ser de aproximadamente 10 s a aproximadamente 5 min (por ejemplo, de aproximadamente 30 s a aproximadamente 4 min; de aproximadamente 1 min a aproximadamente 3 min; de aproximadamente 1 min 30 s a aproximadamente 2 min).

Los ensayos de PCR pueden emplear ácido nucleico diana tal como ARN o ADN (ADNc). El ácido nucleico molde no tiene que estar purificado; puede ser una fracción menor de una mezcla compleja, tal como el ácido nucleico de *esxJ* contenido en las células humanas. Las moléculas de ácido nucleico de *esxJ* se pueden extraer a partir de una muestra biológica mediante técnicas rutinarias tales como las descritas en *Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications* (Persing et al. (eds), 1993, American Society for Microbiology, Washington D.C.). Se pueden obtener ácidos nucleicos a partir de una serie de fuentes, tales como plásmidos, o fuentes naturales, incluyendo bacterias, levaduras, virus, orgánulos u organismos superiores, tales como plantas

o animales.

Los cebadores oligonucleotídicos (por ejemplo, las SEQ ID NO: 1-21) se combinan con reactivos de PCR en condiciones de reacción que inducen la extensión del cebador. Por ejemplo, las reacciones de extensión de la cadena incluyen, en general, KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), MgCl₂ 15 mM, gelatina al 0,001 % (p/v), 0,5-1,0 µg de ADN molde desnaturizado, 50 pmoles de cada cebador oligonucleotídico, 2,5 U de polimerasa Taq y DMSO al 10 %. Las reacciones contienen normalmente de 150 a 320 µM de cada uno de dATP, dCTP, dTTP, dGTP o uno o más análogos de los mismos.

Las cadenas recién sintetizadas forman una molécula bicatenaria que se puede usar en las etapas sucesivas de la reacción. Las etapas de separación, apareamiento y alargamiento de la cadena se pueden repetir con tanta frecuencia como sea necesario para producir la cantidad deseada de productos de amplificación correspondientes a la molécula de ácido nucleico de *esxJ* diana. Los factores limitantes en la reacción son las cantidades de cebadores, enzima termoestable y nucleósido trifosfatos presentes en la reacción. Las etapas de ciclado (es decir, desnaturalización, apareamiento y extensión) se repiten preferentemente al menos una vez. Para su uso en la detección, el número de etapas de ciclado dependerá, por ejemplo, de la naturaleza de la muestra. Si la muestra es una mezcla compleja de ácidos nucleicos, se requerirán más etapas de ciclado para amplificar la secuencia diana lo suficiente para la detección. En general, las etapas de ciclado se repiten al menos aproximadamente 20 veces, pero se pueden repetir hasta 40, 60 o incluso 100 veces.

Transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET)

La tecnología de FRET (véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.º 4.996.143, 5.565.322, 5.849.489 y 6.162.603) se basa en el concepto de que cuando un resto fluorescente donador y un resto fluorescente aceptor correspondiente se sitúan a una determinada distancia entre sí, tiene lugar una transferencia de energía entre los dos restos fluorescentes que se puede visualizar o detectar de otro modo y/o cuantificar. El donador típicamente transfiere la energía al aceptor cuando se excita el donador por radiación luminosa con una longitud de onda adecuada. El aceptor típicamente reemite la energía transferida en forma de radiación luminosa con una longitud de onda diferente. En determinados sistemas, la energía no fluorescente se puede transferir entre los restos donador y aceptor, por medio de biomoléculas que incluyen restos donadores sustancialmente no fluorescentes (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 7.741.467).

En un ejemplo, una sonda oligonucleotídica puede contener un resto fluorescente donador y un extintor correspondiente, que puede ser fluorescente o no, y que disipa la energía transferida en una forma diferente a la luz. Cuando la sonda está intacta, la transferencia de energía se produce típicamente entre los restos donador y aceptor fluorescentes, de modo que la emisión fluorescente desde el resto fluorescente donador se extingue. Durante una etapa de extensión de una reacción en cadena de la polimerasa, se escinde una sonda unida a un producto de amplificación mediante la actividad nucleasa en dirección 5' a 3' de, por ejemplo, una polimerasa Taq de modo que la emisión fluorescente del resto fluorescente donador ya no se extingue. Sondas ejemplares para este propósito se describen, por ejemplo, en las patentes de EE. UU. n.º 5.210.015, 5.994.056 y 6.171.785. Los pares donador-aceptor usados comúnmente incluyen el par FAM-TAMRA. Los extintores usados comúnmente son DABCYL y TAMRA. Los extintores oscuros usados comúnmente incluyen BlackHoleQuenchers™ (BHQ), (Biosearch Technologies, Inc., Novato, Cal.), Iowa Black™, (Integrated DNA Tech., Inc., Coralville, Iowa), BlackBerry™ Quencher 650 (BBQ-650), (Berry & Assoc., Dexter, Mich.).

En otro ejemplo, dos sondas oligonucleotídicas, cada una de las cuales contiene un resto fluorescente, se pueden hibridar con un producto de amplificación en posiciones particulares determinadas por la complementariedad de las sondas oligonucleotídicas con la secuencia de ácido nucleico diana de *esxJ*. Tras la hibridación de las sondas oligonucleotídicas con el ácido nucleico del producto de amplificación en las posiciones apropiadas, se genera una señal de FRET. Las temperaturas de hibridación pueden variar de aproximadamente 35 °C a aproximadamente 65 °C durante de aproximadamente 10 s a aproximadamente 1 min.

El análisis de la fluorescencia se puede llevar a cabo usando, por ejemplo, un sistema de microscopio de epifluorescencia de recuento de fotones (que contiene el espejo dicróico apropiado y filtros para controlar la emisión de fluorescencia en el intervalo particular), un sistema fotomultiplicador de recuento de fotones o un fluorímetro. Se puede llevar a cabo la excitación para iniciar la transferencia de energía, o para permitir la detección directa de un fluoróforo, con un láser de iones de argón, una lámpara de arco de mercurio (Hg) de alta intensidad, una fuente de luz de fibra óptica u otra fuente de luz de alta intensidad filtrada apropiadamente para la excitación en el intervalo deseado.

Como se usa en el presente documento con respecto a los restos donadores y aceptores correspondientes, "correspondiente" se refiere a un resto fluorescente aceptor o un extintor oscuro que tiene un espectro de absorbancia que superpone al espectro de emisión del resto fluorescente donador. El máximo de longitud de onda del espectro de emisión del resto fluorescente aceptor debe ser al menos 100 nm mayor que el máximo de longitud de onda del espectro de excitación del resto fluorescente donador. En consecuencia, se puede producir una transferencia de energía no radiativa eficiente entre los mismos.

Los restos fluorescentes donador y aceptor correspondiente se eligen, en general, por (a) la transferencia de energía de Förster de alta eficiencia; (b) un gran desplazamiento de Stokes final (>100 nm); (c) un desplazamiento de la emisión lo más cercana posible a la porción roja del espectro visible (>600 nm); y (d) un desplazamiento de la emisión a una longitud de onda mayor que la emisión de fluorescencia del espectro Raman del agua producida por excitación en la longitud de onda de excitación del donador. Por ejemplo, se puede elegir un resto fluorescente donador que tenga su máximo de excitación cerca de una línea láser (por ejemplo, helio-cadmio 442 nm o argón 488 nm), un alto coeficiente de extinción, un alto rendimiento cuántico y una buena superposición de su emisión de fluorescencia con el espectro de excitación del resto fluorescente aceptor correspondiente. Se puede elegir un resto fluorescente aceptor correspondiente que tenga un alto coeficiente de extinción, un alto rendimiento cuántico, una buena superposición de su excitación con la emisión del resto fluorescente donador y emisión en la parte roja del espectro visible (>600 nm).

Los restos fluorescentes donadores representativos que se pueden usar con diversos restos fluorescentes aceptores en la tecnología de FRET incluyen fluoresceína, amarillo Lucifer, B-ficoeritrina, isotiocianato de 9-acridina, amarillo Lucifer VS, ácido 4-acetamido-4'-isotiocianatoestilbeno-2,2'-disulfónico, 7-dietilamino-3-(4'-isotiocianatofenil)-4-metilcumarina, 1-pirebutirato de succinimidilo y derivados de ácido 4-acetamido-4'-isotiocianatoestilbeno-2,2'-disulfónico y derivados. Los restos fluorescentes aceptores representativos, que dependen del resto fluorescente donador usado, incluyen LC Red 640, LC Red 705, Cy5, Cy5.5, cloruro de lisamina rodamina B sulfonilo, isotiocianato de tetrametilrodamina, isotiocianato de rodamina x, isotiocianato de eritrosina, fluoresceína, pentaacetato de dietilentriamina u otros quelatos de iones de lantánidos (por ejemplo, europio o terbio). Se pueden obtener restos fluorescentes donadores y aceptores, por ejemplo, de Molecular Probes (Junction City, Oreg.) o Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo.).

Los restos fluorescentes donadores y aceptores se pueden unir al oligonucleótido de sonda apropiado por medio de un brazo conector. La longitud de cada brazo conector es importante, ya que los brazos conectores afectarán a la distancia entre los restos fluorescentes donadores y aceptores. La longitud de una sección conectora puede ser la distancia en Angstroms (Å) desde la base de nucleótido hasta el resto fluorescente. En general, un brazo conector es de aproximadamente 10 Å a aproximadamente 25 Å. El brazo conector puede ser de la clase descrita en el documento WO 84/03285. El documento WO 84/03285 también divulga procedimientos para unir brazos conectores a una base nucleotídica particular, y también para unir restos fluorescentes a un brazo conector.

Un resto fluorescente aceptor, como un LC Red 640, se puede combinar con un oligonucleótido que contiene un conector amino (por ejemplo, C6-aminofosforamiditas disponibles en ABI (Foster City, California) o Glen Research (Sterling, VA)) para producir, por ejemplo, oligonucleótido marcado con LC Red 640. Los conectores usados con frecuencia para acoplar un resto fluorescente donador, tal como fluoresceína, a un oligonucleótido incluyen conectores de tiourea (derivados de FITC, por ejemplo, fluoresceína-CPG de Glen Research o ChemGene (Ashland, Mass.)), conectores de amida (derivados de fluoresceína-éster de NHS, tal como CX-fluoresceína-CPG de BioGenex (San Ramon, Calif.)) o 3'-amino-CPG, que requieren el acoplamiento de fluoresceína-éster de NHS después de la síntesis de oligonucleótidos.

DetECCIÓN DE MTB

La presente divulgación proporciona procedimientos para detectar la presencia o ausencia de MTB en una muestra biológica o no biológica. Los procedimientos proporcionados evitan problemas de contaminación de la muestra, falsos negativos y falsos positivos. Los procedimientos incluyen realizar al menos una etapa de ciclado que incluye amplificar una porción de una molécula de ácido nucleico diana de *esxJ* a partir de una muestra usando uno o más pares de cebadores para *esxJ* y una etapa de detección por FRET. Se realizan múltiples etapas de ciclado, preferentemente en un termociclador. Los procedimientos de la invención se pueden realizar usando los cebadores y sondas para *esxJ* para detectar la presencia de MTB, y la detección de *esxJ* indica la presencia de MTB en la muestra.

Como se describe en el presente documento, los productos de amplificación se pueden detectar usando sondas de hibridación marcadas que aprovechan la tecnología FRET. Un formato FRET utiliza la tecnología TaqMan® para detectar la presencia o ausencia de un producto de amplificación y, por tanto, la presencia o ausencia de MTB. La tecnología TaqMan® utiliza una sonda monocatenaria de hibridación marcada con, por ejemplo, un tinte fluorescente y un extintor, que puede ser o no ser fluorescente. Cuando se excita un primer resto fluorescente con luz de una longitud de onda adecuada, la energía absorbida se transfiere a un segundo resto fluorescente o un extintor oscuro de acuerdo con los principios de FRET. El segundo resto fluorescente es, en general, una molécula de extintor. Durante la etapa de apareamiento de la reacción de PCR, la sonda de hibridación marcada se une al ADN diana (es decir, el producto de amplificación) y se degrada mediante la actividad nucleasa en dirección 5' a 3' de, por ejemplo, la polimerasa Taq durante la fase de alargamiento posterior. Como resultado, el resto fluorescente y el resto extintor se separan espacialmente uno del otro. Como consecuencia, tras la excitación del primer resto fluorescente en ausencia del extintor, se puede detectar la emisión de fluorescencia del primer resto fluorescente. A modo de ejemplo, un sistema de detección de secuencias ABI PRISM® 7700

(AppliedBiosystems) usa la tecnología TaqMan®, y es adecuado para realizar los procedimientos descritos en el presente documento para detectar la presencia o ausencia de MTB en la muestra.

También se pueden usar balizas moleculares junto con FRET para detectar la presencia de un producto de amplificación usando los procedimientos de PCR ultrarrápida. La tecnología de balizas moleculares usa una sonda de hibridación marcada con un primer resto fluorescente y un segundo resto fluorescente. El segundo resto fluorescente es, en general, un extintor, y los marcadores fluorescentes típicamente se localizan en cada extremo de la sonda. La tecnología de balizas moleculares usa un oligonucleótido de sonda que tiene secuencias que permiten la formación de estructuras secundarias (por ejemplo, una horquilla). Como resultado de la formación de estructuras secundarias dentro de la sonda, ambos restos fluorescentes están en proximidad espacial cuando la sonda está en solución. Después de la hibridación con los ácidos nucleicos diana (es decir, productos de amplificación), la estructura secundaria de la sonda se altera y los restos fluorescentes se separan entre sí, de modo que, después de la excitación con luz de una longitud de onda adecuada, se puede detectar la emisión del primer resto fluorescente.

Otro formato común de la tecnología FRET utiliza dos sondas de hibridación. Cada sonda se puede marcar con un resto fluorescente diferente y, en general, se diseñan para hibridarse en estrecha proximidad entre sí en una molécula de ADN diana (por ejemplo, un producto de amplificación). Un resto fluorescente donador, por ejemplo, fluoresceína, se excita a 470 nm mediante la fuente de luz del instrumento LightCycler®. Durante la FRET, la fluoresceína transfiere su energía a un resto fluorescente aceptor tal como Red 640 de LightCycler® (rojo LC 640) o Red 705 de LightCycler® (rojo LC 705). El resto fluorescente aceptor emite entonces luz de una longitud de onda más larga, que se detecta por el sistema de detección óptica del instrumento LightCycler®. La FRET eficaz puede tener lugar solo cuando los restos fluorescentes están en proximidad local directa y cuando el espectro de emisión del resto fluorescente donador se superpone con el espectro de absorción del resto fluorescente aceptor. La intensidad de la señal emitida se puede correlacionar con el número de moléculas de ADN diana originales (por ejemplo, el número de genomas de MTB). Si se produce la amplificación de ácido nucleico diana de *esxJ* y se produce un producto de amplificación, la etapa de hibridación da como resultado una señal detectable basada en FRET entre los miembros del par de sondas.

En general, la presencia de FRET indica la presencia de MTB en la muestra, y la ausencia de FRET indica la ausencia de MTB en la muestra. Sin embargo, la recogida inadecuada de muestras, los retrasos en el transporte, las condiciones de transporte inapropiadas o el uso de determinados hisopos de recogida (alginato de calcio o varilla de aluminio) son todas condiciones que pueden afectar al éxito y/o la exactitud del resultado de una prueba. Usando los procedimientos divulgados en el presente documento, la detección de FRET en, por ejemplo, 45 etapas de ciclado es indicativa de una infección por MTB.

Las muestras biológicas representativas que se pueden usar en la práctica de los procedimientos incluyen, pero no se limitan a muestras del aparato respiratorio, muestras fecales, muestras de sangre, hisopos dérmicos, hisopos nasales, hisopos de heridas, hemocultivos, piel e infecciones de tejidos blandos. Son conocidos procedimientos de recogida y almacenamiento de muestras biológicas por los expertos en la técnica. Las muestras biológicas se pueden procesar (por ejemplo, por procedimientos y/o kits de extracción de ácido nucleico conocidos en la técnica) para liberar el ácido nucleico de MTB o, en algunos casos, la muestra biológica se puede poner en contacto directamente con los componentes de la reacción PCR y los oligonucleótidos apropiados. El análisis de la curva de fusión es una etapa adicional que se puede incluir en un perfil de ciclado. El análisis de la curva de fusión se basa en el hecho de que el ADN se funde a una temperatura característica llamada temperatura de fusión (T_f), que se define como la temperatura a la que la mitad de las dobles cadenas de ADN se han separado en cadenas individuales. La temperatura de fusión de un ADN depende principalmente de su composición de nucleótidos. Por tanto, las moléculas de ADN ricas en nucleótidos G y C tienen una mayor T_f que las que tienen una abundancia de nucleótidos A y T. Detectando la temperatura a la que se pierde la señal, se puede determinar la temperatura de fusión de las sondas. De forma similar, detectando la temperatura a la que se genera la señal, se puede determinar la temperatura de apareamiento de las sondas. La(s) temperatura(s) de fusión de las sondas para *esxJ* del producto de amplificación de *esxJ* puede(n) confirmar la presencia o ausencia de MTB en la muestra.

Dentro de cada serie del termociclador, también se pueden realizar ciclados de muestras de control. Las muestras de control positivo pueden amplificar el molde de control de ácido nucleico diana (distinto de los productos de amplificación descritos de genes diana) usando, por ejemplo, cebadores de control y sondas de control. Las muestras de control positivo también pueden amplificar, por ejemplo, una construcción de plásmido que contiene las moléculas de ácido nucleico diana. Dicho control plasmídico se puede amplificar internamente (por ejemplo, dentro de la muestra) o en una muestra separada que se realiza paralelamente con las muestras del paciente usando los mismos cebadores y la misma sonda que los usados para la detección de la diana deseada. Dichos controles son indicadores del éxito o fracaso de la amplificación, hibridación y/o reacción de FRET. Cada serie del termociclador también puede incluir un control negativo que, por ejemplo, carece de ADN molde diana. El control negativo puede medir la contaminación. Esto garantiza que el sistema y los reactivos no den lugar a una señal positiva falsa. Por lo tanto, las reacciones de control pueden determinar fácilmente, por ejemplo, la capacidad de los cebadores de aparearse con especificidad de secuencia y de iniciar el alargamiento,

así como la capacidad de las sondas de hibridarse con especificidad de secuencia y para que se produzca la FRET.

5 En un modo de realización, los procedimientos incluyen etapas para evitar la contaminación. Por ejemplo, un procedimiento enzimático que utiliza uracil-ADN glucosilasa se describe en las patentes de EE. UU. n.º 5.035.996, 5.683.896 y 5.945.313 para reducir o eliminar la contaminación entre una serie del termociclador y la siguiente.

10 Los procedimientos de PCR convencionales junto con la tecnología FRET se pueden usar para poner en práctica los procedimientos. En un modo de realización, se usa un instrumento LightCycler®. Las siguientes solicitudes de patente describen la PCR ultrarrápida como se usa en la tecnología de LightCycler®: documentos WO 97/46707, WO 97/46714 y WO 97/46712.

15 El LightCycler® se puede manejar usando una estación de trabajo para PC y puede utilizar un sistema operativo Windows NT. Las señales de las muestras se obtienen a medida que la máquina sitúa los capilares secuencialmente sobre la unidad óptica. El programa informático puede visualizar las señales de fluorescencia en tiempo real inmediatamente después de cada medición. El tiempo de registro de la fluorescencia es de 10-100 milisegundos (ms). Después de cada etapa de ciclado, se puede actualizar continuamente una visualización cuantitativa de la fluorescencia frente al número de ciclo para todas las muestras. Los datos generados se pueden almacenar para un análisis posterior.

20 Como una alternativa a FRET, se puede detectar un producto de amplificación usando un tinte de unión a ADN bicatenario tal como un tinte fluorescente de unión a ADN (por ejemplo, verde SYBR® u oro SYBR® (Molecular Probes)). Tras la interacción con el ácido nucleico bicatenario, dichos tintes fluorescentes de unión a ADN emiten una señal fluorescente después de la excitación con luz a una longitud de onda adecuada. También se puede usar un tinte de unión a ADN bicatenario, tal como un tinte de intercalación de ácido nucleico. Cuando se usan tintes de unión a ADN bicatenario, normalmente se realiza un análisis de curva de fusión para confirmar la presencia del producto de amplificación.

30 Se entiende que los modos de realización de la presente divulgación no están limitados por la configuración de uno o más instrumentos disponibles comercialmente.

Artículos de fabricación/kits

35 Los modos de realización de la presente divulgación proporcionan además artículos de fabricación o kits para detectar MTB. Un artículo de fabricación puede incluir cebadores y sondas usados para detectar la diana del gen *esxJ*, junto con materiales de embalaje adecuados. Los cebadores y sondas representativos para la detección del MTB se pueden hibridar con las moléculas de ácido nucleico diana de *esxJ*. Además, los kits también pueden incluir reactivos y materiales adecuadamente envasados necesarios para la inmovilización, hibridación y

40 detección de ADN, tales como soportes sólidos, tampones, enzimas y patrones de ADN. Los procedimientos para diseñar cebadores y sondas se divulgan en el presente documento, y se proporcionan ejemplos representativos de cebadores y sondas que amplifican y se hibridan con moléculas de ácido nucleico diana para *esxJ*.

45 Los artículos de fabricación también pueden incluir uno o más restos fluorescentes para marcar las sondas o, alternativamente, las sondas suministradas con el kit pueden estar marcadas. Por ejemplo, un artículo de fabricación puede incluir un resto fluorescente donador y/o aceptor para marcar las sondas para *esxJ*. Anteriormente se proporcionan ejemplos de restos fluorescentes donadores de FRET adecuados y restos fluorescentes aceptores correspondientes.

50 Los artículos de fabricación también pueden contener un prospecto o ficha técnica que tiene instrucciones para usar los cebadores para *esxJ* y sondas para detectar MTB en una muestra. Los artículos de fabricación pueden incluir adicionalmente reactivos para llevar a cabo los procedimientos divulgados en el presente documento (por ejemplo, tampones, enzimas polimerasa, cofactores o agentes para prevenir la contaminación). Dichos reactivos

55 pueden ser específicos para uno de los instrumentos disponibles comercialmente descritos en el presente documento.

En los siguientes ejemplos se describirán adicionalmente modos de realización de la presente divulgación, que no limitan el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones.

60 EJEMPLOS

Se proporcionan los siguientes ejemplos y figuras para ayudar al entendimiento de la materia objeto, cuyo verdadero alcance se expone en las reivindicaciones adjuntas. Se entiende que se pueden hacer modificaciones en los procedimientos establecidos.

65

EJEMPLO I

- La especificidad para los oligonucleótidos que se dirigen al gen *esxJ* se estableció mediante análisis de carga de 28 genomas completos de MTB disponibles públicamente, así como 26 genomas completos de micobacterias distintas de *M. tuberculosis*. La región del gen objetivo estaba presente con 5 copias distintas en los 28 genomas completos de MTB, así como también con 3-5 copias distintas en otro miembro del complejo de MTB (*M. bovis*, *M. africanum* y *M. canettii*), y que solo se encuentra en otras especies de micobacterias con muy poca homología. La exclusividad se confirmó sometiendo a prueba el ADN genómico extraído de numerosas especies de micobacterias distintas de *M. tuberculosis*.
- Con referencia a la Figura 1, se seleccionaron cebadores directos para *esx* de MTB que indican valores de codo similares y una fluorescencia más alta con FP07 (SEQ ID NO: 7) y FP09 (SEQ ID NO: 9) en comparación con FP01 (SEQ ID NO: 1). En referencia a la Figura 2, los cebadores inversos para *esx* de MTB se seleccionaron indicando valores de codo más tempranos y una fluorescencia más alta de los tres candidatos principales de cebadores para *esx* (es decir, SEQ ID NO: 15, 16 y 17) en comparación con los oligonucleótidos optimizados de 16S que se dirigen a una ubicación genómica de copia única. Con referencia a la Figura 3, la selección de la sonda para *esx* de MTB muestra los valores de fluorescencia y codo de los 4 candidatos principales (es decir, SEQ ID NO: 29, 30, 35 y 36) con la diana de MTB. Todas las sondas produjeron más de 12 unidades de fluorescencia. Con referencia a la Figura 4, la selección de la sonda para *esx* de MTB muestra fluorescencia de los 4 candidatos principales sin diana de MTB (*M. gastri*). Debido a la reactividad cruzada observada con *M. gastri*, las sondas de mayor rendimiento se eliminaron de los candidatos. Con referencia a la Figura 5, demostración de exclusividad de los principales oligonucleótidos de *esx* (es decir, SEQ ID NO: 7, 16 y 30) con series de dilución de MTB y 1e6c/PCR cada una de especies distintas de MTB (*M. gastri*, *M. szulgai* y *M. kansasii*).
- Aunque la invención precedente se ha descrito con algún detalle con propósitos de claridad y comprensión, será evidente para un experto en la técnica, a partir de una lectura de la presente divulgación, que se pueden realizar diversos cambios de forma y detalles. Por ejemplo, se pueden usar todas las técnicas y aparatos descritos anteriormente en diversas combinaciones.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Roche DiagnosticsGmbH F. Hoffmann-La Roche AG Roche Molecular Systems, Inc.
- 5 <120> COMPOSICIONES Y PROCEDIMIENTOS PARA LA DETECCIÓN DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*
- <130> P32966-WO-HS
- 10 <150> US 14/819427
<151> 06/08/2015
- <160> 45
- 15 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
<211> 21
<212> ADN
20 <213> Secuencia artificial
- <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético
- 25 <220>
<223> JJESXFP01BBA
- <400> 1
gttttgaggt gcaagcccag a 21
- 30 <210> 2
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 35 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético
- 40 <220>
<223> JJESXFP02BBA
- <400> 2
atggcctcac gttttatgac gga 23
- 45 <210> 3
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 50 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético
- <220>
<223> JJESXFP03BBA
- 55 <400> 3
acatggcggg ccgttttga 19
- <210> 4
60 <211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- <220>
65 <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético

	<220>	
	<223> JJESXFP04BBA	
5	<400> 4 ttttgaggtg cacgcccaga	20
	<210> 5	
	<211> 19	
10	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético	
	<220>	
	<223> JJESXFP05BBA	
	<400> 5 tttgaggtgc acgcccaga	19
20		
	<210> 6	
	<211> 18	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético	
30	<220>	
	<223> JJESXFP06BBA	
	<400> 6 ttgaggtgca cgcccaga	18
35		
	<210> 7	
	<211> 20	
	<212> ADN	
40	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético	
45	<220>	
	<223> JJESXFP07BBC	
	<400> 7 gacggtggag gacgaggctc	20
50		
	<210> 8	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
55	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético	
	<220>	
	<223> JJESXFP08BBC	
60		
	<400> 8 cggtggagga cgaggctc	18
	<210> 9	

<211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético

<220>
 <223> JJESXFP09BBC

10 <400> 9
ggtggaggac gaggctc 17

<210> 10
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético

<220>
 <223> JJESXRP01BBA

25 <400> 10
atggtgcaaa acgcctgatt ca 22

<210> 11
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético

35 <220>
 <223> JJESXRP02BBA

<400> 11
 40 **tcgtagttgt tggcgtcgcg aa** 22

<210> 12
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético

50 <220>
 <223> JJESXRP03BBA

<400> 12
 55 **tagttgtgg cgtcgcgaac ca** 22

<210> 13
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético

<220>
 65 <223> JJESXRP04BBC

	<400> 13 ggccatggtg tctagcgagg tc	22
5	<210> 14 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético	
	<220> <223> JJESXRP05BBC	
15	<400> 14 gccatggtgt ctagcgaggt c	21
20	<210> 15 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético	
	<220> <223> JJESXRP06BBC	
30	<400> 15 ccatggtgtc tagcgaggtc	20
35	<210> 16 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético	
	<220> <223> JJESXRP07BBC	
45	<400> 16 tcatggtgtc tagcgaggtc	20
50	<210> 17 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético	
	<220> <223> JJESXRP08BBC	
60	<400> 17 gtcatggtgt ctagcgaggt c	21
65	<210> 18 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	

	<220>		
	<223>	Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético	
	<220>		
5	<223>	JJESXRP09BBC	
	<400>	18	
		tgtctagcga ggtcgcctc	19
10	<210>	19	
	<211>	18	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
15	<220>		
	<223>	Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético	
	<220>		
20	<223>	JJESXRP10BBC	
	<400>	19	
		gtctagcgag gtcgcctc	18
25	<210>	20	
	<211>	17	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
30	<220>		
	<223>	Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético	
	<220>		
	<223>	JJESXRP11BBC	
35	<400>	20	
		cctcggccat gccactc	17
40	<210>	21	
	<211>	16	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
45	<220>		
	<223>	Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético	
	<220>		
	<223>	JJESXRP12BBC	
	<400>	21	
50		ctcggccatg ccactc	16
55	<210>	22	
	<211>	30	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
60	<220>		
	<223>	Descripción de secuencia artificial: Sonda sintética	
	<220>		
	<223>	JJESXAP01FQ6	
	<400>	22	
65		tctagcgagg tcgcctcggc catgccactc	30

<210> 23
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Sonda sintética
 <220>
 10 <223> JJESXAP02FQ6
 <400> 23
 ttttgcgcgg acgcccacat ccggc 25
 15 <210> 24
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Sonda sintética
 <220>
 25 <223> JJESXSP01FQ6
 <400> 24
 ggccgaggcg acctcgctag acaccatgac ctacg 34
 30 <210> 25
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Sonda sintética
 <220>
 <223> JJESXSP02FQ6
 40 <400> 25
 tggccgaggc gacctcgcta gacaccatga cctagat 37
 <210> 26
 <211> 25
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Sonda sintética
 50 <220>
 <223> JJESXAP02GFQ6
 <400> 26
 55 ttttgcgcgg acgcccacat ccggc 25
 <210> 27
 <211> 24
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Sonda sintética
 65 <220>

	<223> JJESXAP03FQ6	
	<400> 27	
5	ttttgcgcgg acgcccacat ccgg	24
	<210> 28	
	<211> 24	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: Sonda sintética	
	<220>	
15	<223> JJESXAP03GFQ6	
	<400> 28	
	ttttgcgcgg acgcccacat ccgg	24
20	<210> 29	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: Sonda sintética	
	<220>	
30	<223> JJESXAP04FQ6	
	<400> 29	
	ttttgcgcgg acgcccacat ccg	23
35	<210> 30	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: Sonda sintética	
	<220>	
	<223> JJESXAP04FQ5	
45	<400> 30	
	ttttgcgcgg acgcccacat ccg	23
	<210> 31	
50	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
55	<223> Descripción de secuencia artificial: Sonda sintética	
	<220>	
	<223> JJESXAP04GFQ6	
60	<400> 31	
	ttttgcgcgg acgcccacat ccg	23
	<210> 32	
	<211> 23	
	<212> ADN	
65	<213> Secuencia artificial	

	<220>		
	<223> Descripción de secuencia artificial: Sonda sintética		
	<220>		
5	<223> JJESXAP05FQ6		
	<400> 32		
	tttgcgcgga cgccacatc cgg		23
10	<210> 33		
	<211> 22		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
15	<220>		
	<223> Descripción de secuencia artificial: Sonda sintética		
	<220>		
20	<223> JJESXAP06FQ6		
	<400> 33		
	tttgcgcgga cgccacatc cg		22
25	<210> 34		
	<211> 25		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
30	<220>		
	<223> Descripción de secuencia artificial: Sonda sintética		
	<220>		
	<223> JJESXAP07FQ6		
35	<400> 34		
	tgttttgcgc ggacgcccac atccg		25
40	<210> 35		
	<211> 24		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
45	<220>		
	<223> Descripción de secuencia artificial: Sonda sintética		
	<220>		
	<223> JJESXAP08FQ6		
	<400> 35		
50	tgttttgcgc ggacgcccac atcc		24
55	<210> 36		
	<211> 24		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
60	<220>		
	<223> Descripción de secuencia artificial: Sonda sintética		
	<220>		
	<223> JJESXAP08FQ5		
	<400> 36		
	tgttttgcgc ggacgcccac atcc		24

	<210> 37	
	<211> 17	
	<212> ARN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: Sonda sintética	
10	<220>	
	<223> JJESXAP16PFQ6	
	<400> 37	
15	uuuugcgcgg acgcca	17
	<210> 38	
	<211> 16	
	<212> ARN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: Sonda sintética	
	<220>	
25	<223> JJESXAP17PFQ6	
	<400> 38	
	uuuugcgcgg acgcc	16
30	<210> 39	
	<211> 18	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: Sonda sintética	
	<220>	
	<223> JJESXAP21PFQ6	
40	<400> 39	
	uguuuugcgc ggacgcc	18
	<210> 40	
45	<211> 17	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
50	<223> Descripción de secuencia artificial: Sonda sintética	
	<220>	
	<223> JJESXAP22PFQ6	
55	<400> 40	
	uguuuugcgc ggacgcc	17
	<210> 41	
	<211> 257	
60	<212> ADN	
	<213> <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	
	<220>	
65	<223> Región del amplicón de <i>esxJ</i>	

ES 2 784 357 T3

	<400> 41		
	atggcctcgc gttttatgac ggatccgcac gcgatgcggg acatggcggg ccgttttgag	60	
	gtgcacgccc agacggtgga ggacgaggct cgccggatgt gggcgtccgc gcaaaacatc	120	
	tccggcgcgg gctggagtgg catggccgag gcgacctcgc tagacaccat gaccagatg	180	
	aatcaggcgt ttcgcaacat cgtgaacatg ctgcacgggg tgcgtgacgg gctggttcgc	240	
	gacgccaaca actacga	257	
	<210> 42		
5	<211> 257		
	<212> ADN		
	<213> <i>Mycobacterium tuberculosis</i>		
	<220>		
10	<223> Región del amplicón de esxK		
	<400> 42		
	atggcctcgc gttttatgac ggatccgcac gcgatgcggg acatggcggg ccgttttgag	60	
	gtgcacgccc agacggtgga ggacgaggct cgccggatgt gggcgtccgc gcaaaacatt	120	
	tccggcgcgg gctggagtgg catggccgag gcgacctcgc tagacaccat gaccagatg	180	
	aatcaggcgt ttcgcaacat cgtgaacatg ctgcacgggg tgcgtgacgg gctggttcgc	240	
	gacgccaaca actacga	257	
	<210> 43		
15	<211> 257		
	<212> ADN		
	<213> <i>Mycobacterium tuberculosis</i>		
	<220>		
20	<223> Región del amplicón de esxM		
	<400> 43		
	atggcctcgc gttttatgac ggatccgcac gcgatgcggg acatggcggg ccgttttgag	60	
	gtgcacgccc agacggtgga ggacgaggct cgccggatgt gggcgtccgc gcaaaacatc	120	
	tccggcgcgg gctggagtgg catggccgag gcgacctcgc tagacaccat ggcccagatg	180	
	aatcaggcgt ttcgcaacat cgtgaacatg ctgcacgggg tgcgtgacgg gctggttcgc	240	
25	gacgccaaca actacga	257	
	<210> 44		
	<211> 257		
	<212> ADN		
30	<213> <i>Mycobacterium tuberculosis</i>		
	<220>		
	<223> Región del amplicón de esxP		
	<400> 44		
35	atggcctcgc gttttatgac ggatccgcac gcgatgcggg acatggcggg ccgttttgag	60	
	gtgcacgccc agacggtgga ggacgaggct cgccggatgt gggcgtccgc gcaaaacatt	120	
	tccggcgcgg gctggagtgg catggccgag gcgacctcgc tagacaccat ggcccagatg	180	
	aatcaggcgt ttcgcaacat cgtgaacatg ctgcacgggg tgcgtgacgg gctggttcgc	240	
	gacgccaaca actacga	257	
	<210> 45		

ES 2 784 357 T3

<211> 257
<212> ADN
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

5 <220>
<223> Región del amplicón de *esxW*

<400> 45
atggcctcgc gttttatgac ggatccgcat gcgatgcggg acatggcggg ccgttttgag 60
gtgcacgccc agacgggtgga ggacgaggct cgccggatgt gggcgtccgc gcaaaacatt 120
tccggtgcgg gctggagtgg catggccgag gcgacctcgc tagacacat gacctagatg 180
aatcaggcgt ttcgcaacat cgtgaacatg ctgcacgggg tgcgtgacgg gctggttcgc 240
gacgccaaca actacga 257

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para detectar *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) y otros miembros del complejo de MTB en una muestra, comprendiendo el procedimiento:
- 5 - llevar a cabo una etapa de amplificación que comprende poner en contacto la muestra con un conjunto de cebadores para *esxJ* para producir un producto de amplificación si un ácido nucleico de *esxJ* está presente en la muestra;
- 10 - realizar una etapa de hibridación que comprende poner en contacto el producto de amplificación con una o más sondas para *esxJ* detectables; y
- 15 - detectar la presencia o ausencia del producto de amplificación, en el que la presencia del producto de amplificación es indicativa de la presencia de MTB en la muestra y en el que la ausencia del producto de amplificación es indicativa de la ausencia de MTB en la muestra;
- en el que el conjunto de cebadores para *esxJ* comprende un primer cebador que comprende una primera secuencia de oligonucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, 7 y 9 o un complemento de las mismas, y un segundo cebador que comprende una segunda secuencia de oligonucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 15-17, o un complemento de las mismas, y
- 20 en el que la sonda para *esxJ* detectable comprende una tercera secuencia de oligonucleótidos SEQ ID NO: 30, o el complemento de la misma.
- 25 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que:
- la etapa de hibridación comprende poner en contacto el producto de amplificación con la sonda para *esxJ* detectable que está marcada con un resto fluorescente donador y un resto aceptor correspondiente; y
- 30 - la etapa de detección comprende detectar la presencia o ausencia de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) entre el resto fluorescente donador y el resto aceptor de la sonda, en el que la presencia o ausencia de fluorescencia es indicativa de la presencia o ausencia de MTB en la muestra.
- 35 3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que dicha etapa de amplificación emplea una enzima polimerasa que tiene actividad nucleasa de 5' a 3'.
4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 2 y 3, en el que el resto fluorescente donador y el resto aceptor correspondiente están separados por no más de 8-20 nucleótidos entre sí en la sonda.
- 40 5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en el que el resto aceptor es un extintor.
6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que al menos uno del primer cebador, el segundo cebador y la sonda para *esxJ* detectable comprende al menos un nucleótido modificado.
- 45 7. Un kit para detectar un ácido nucleico de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) y otros miembros del complejo de MTB que comprende:
- 50 - un primer cebador oligonucleotídico que comprende una primera secuencia de oligonucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, 7 y 9, o un complemento de las mismas;
- un segundo cebador oligonucleotídico que comprende una segunda secuencia de oligonucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 15-17, o un complemento de las mismas; y
- 55 - una tercera sonda marcada de forma detectable por fluorescencia que comprende la secuencia de oligonucleótidos SEQ ID NO: 30, o un complemento, la tercera sonda marcada de forma detectable configurada para hibridarse con un amplicón generado por el primer cebador y el segundo cebador.
- 60 8. El kit de la reivindicación 7, en el que la tercera secuencia de oligonucleótidos marcada de forma detectable comprende un resto fluorescente donador y un resto aceptor correspondiente.
9. El kit de la reivindicación 8, en el que el resto aceptor es un extintor.
- 65 10. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, que comprende además nucleósido trifosfatos, polimerasa de ácido nucleico y tampones necesarios para la función de la polimerasa de ácido nucleico.
11. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en el que al menos uno del primer, segundo y tercer

oligonucleótidos comprende al menos un nucleótido modificado.

12. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, en el que los primer, segundo y tercer oligonucleótidos tienen 40 nucleótidos o menos.

5

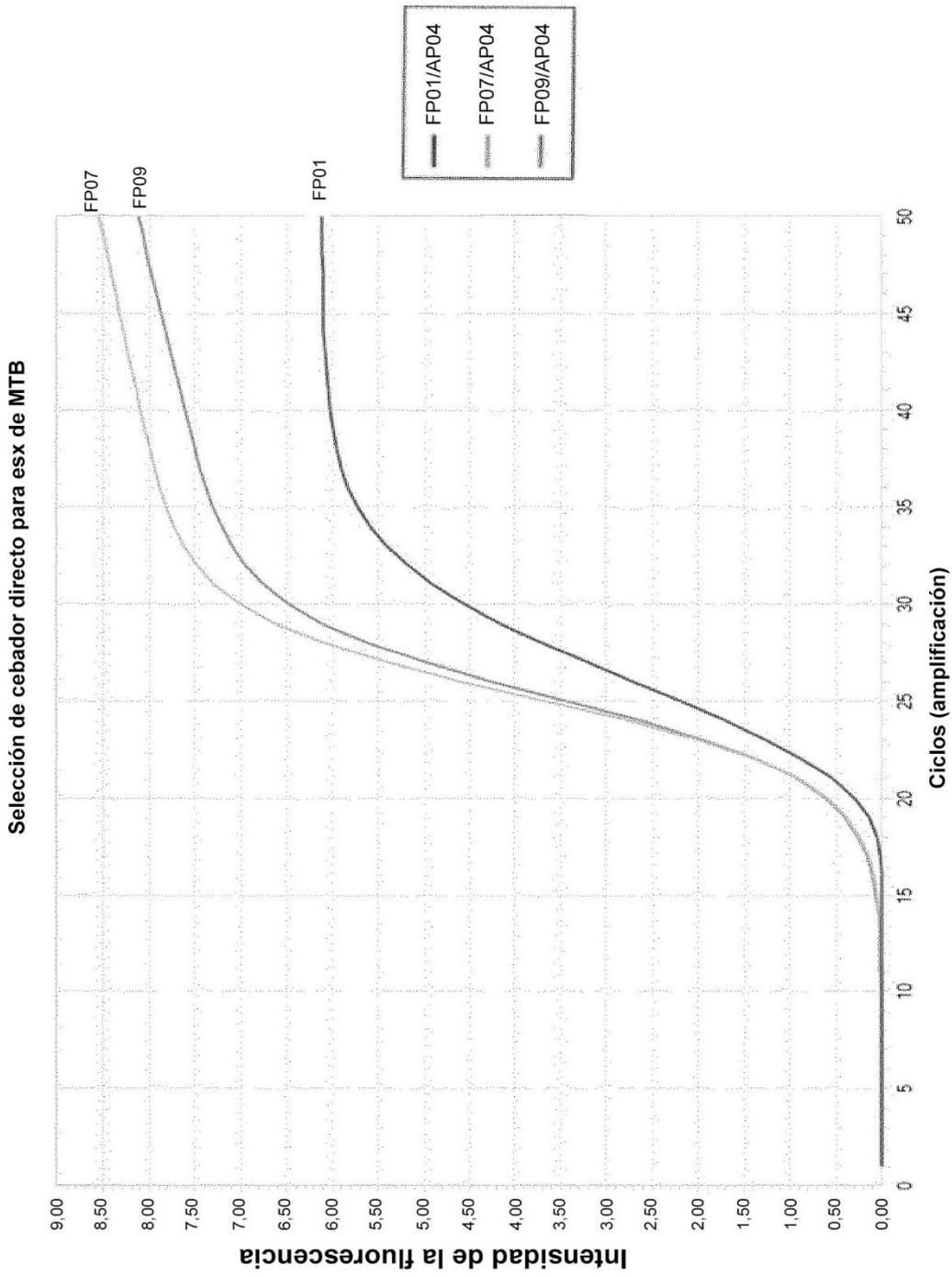


FIGURA 1

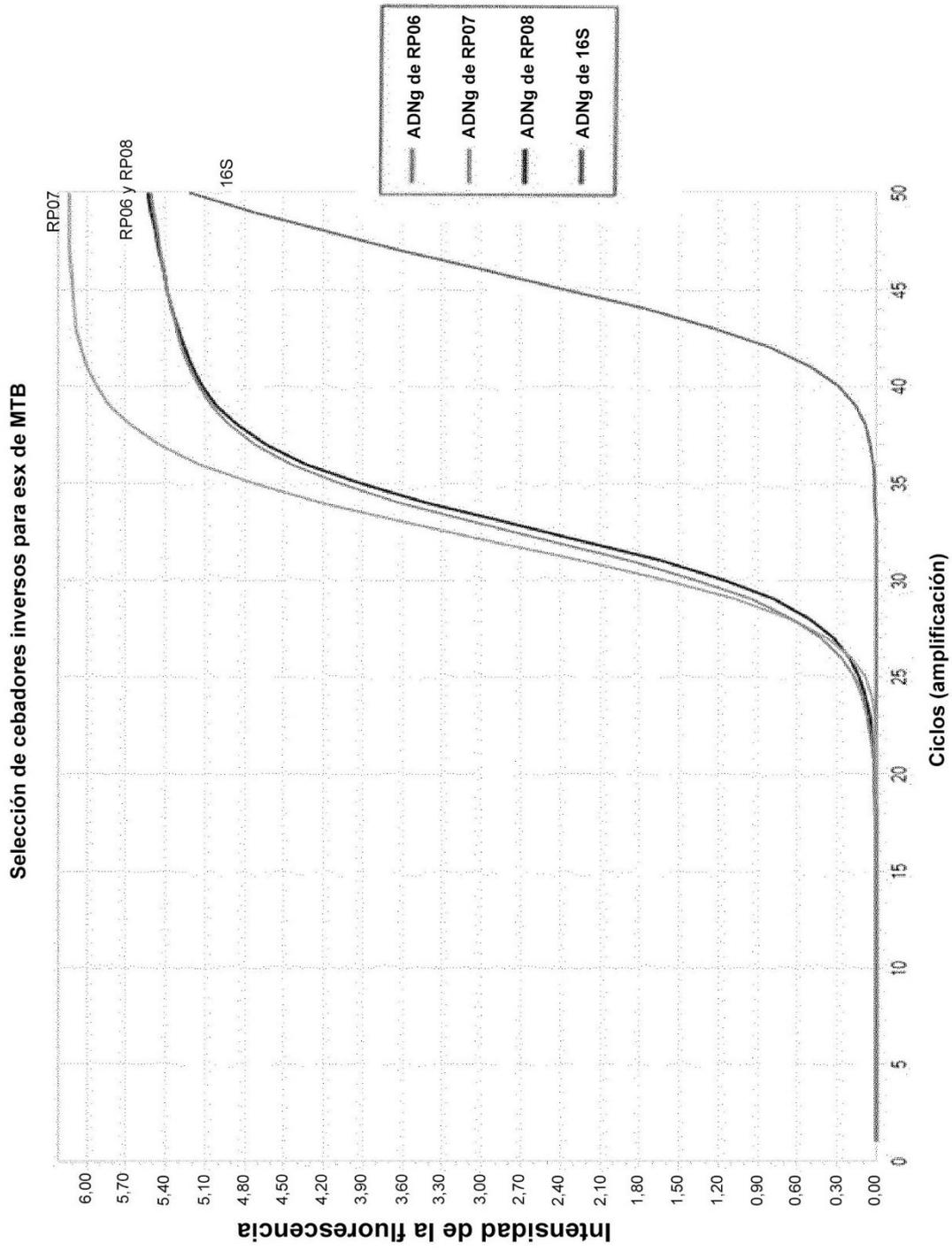


FIGURA 2

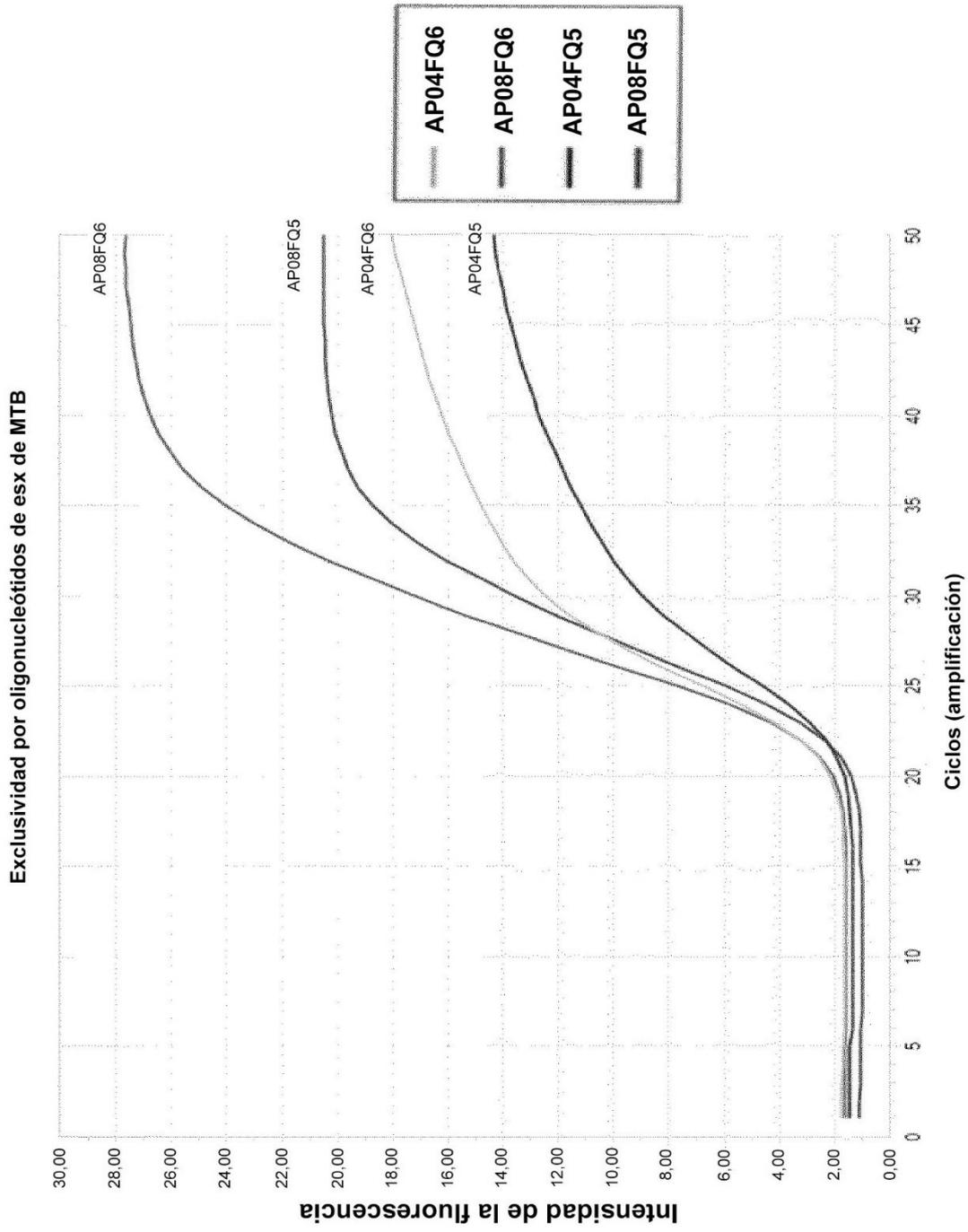


FIGURA 3

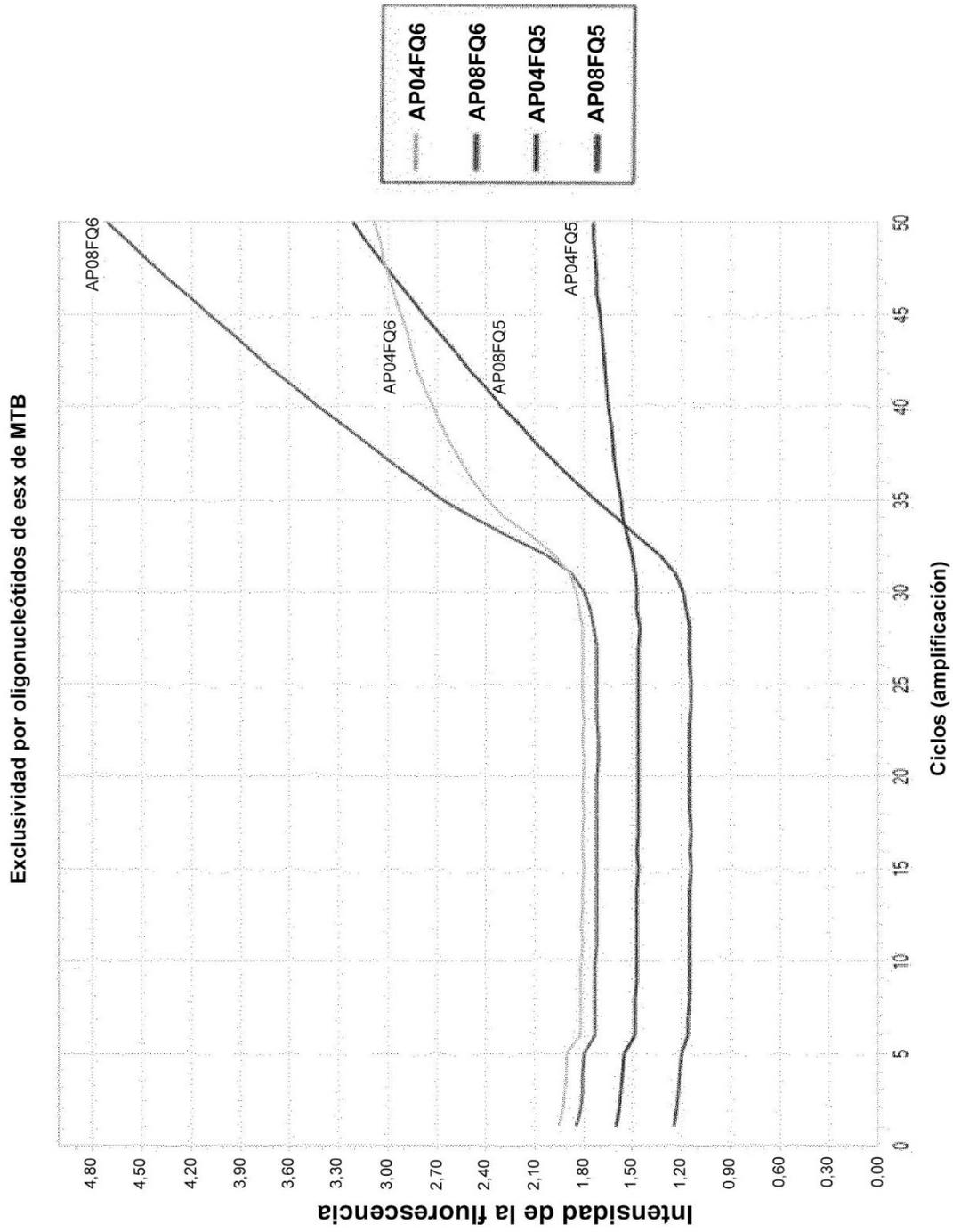


FIGURA 4

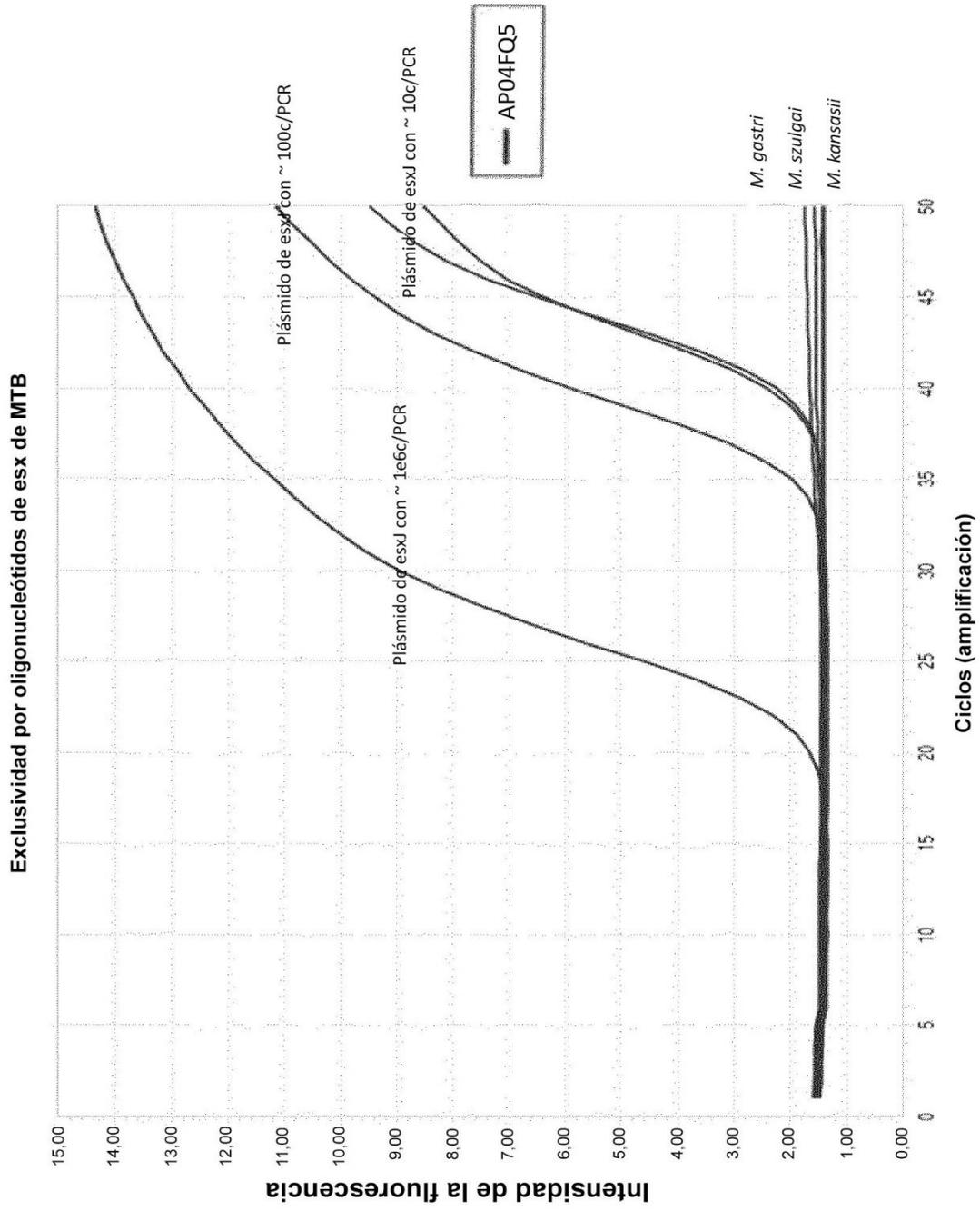


FIGURA 5