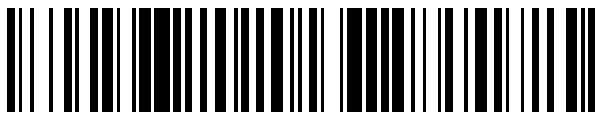


(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 518 715**

(21) Número de solicitud: 201400277

(51) Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

(12)

PATENTE DE INVENCIÓN

B1

(22) Fecha de presentación:

31.03.2014

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

05.11.2014

Fecha de la concesión:

01.09.2015

(45) Fecha de publicación de la concesión:

08.09.2015

(73) Titular/es:

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA (60.0%)
Avda Cervantes, 2
29071 Málaga (Málaga) ES y
SERVICIO ANDALUZ DE SALUD (40.0%)

(72) Inventor/es:

SANJUAN JIMÉNEZ, Rocío;
DEL TORO PEINADO, Inmaculada;
COLMENERO CASTILLO, Juan De Dios y
MORATA LOSA, Pilar

(54) Título: **Método y kit para la detección de secuencias de ADN específicas de *Mycobacterium tuberculosis complex* en muestras pulmonares**

(57) Resumen:

Método y kit para la detección de secuencias de ADN específicas de *Mycobacterium tuberculosis complex* en muestras pulmonares.

Nuevos cebadores y al método para la detección de especies pertenecientes al *Mycobacterium tuberculosis complex*, y kit de detección que los comprende.

ES 2 518 715 B1

Método y kit para la detección de secuencias de ADN específicas de *Mycobacterium tuberculosis* complex en muestras pulmonares.

La presente invención se encuentra dentro del campo de la biología molecular y la medicina, 5 y se refiere a unos nuevos cebadores y al método para la detección de especies pertenecientes al *Mycobacterium tuberculosis* complex, así como al kit de detección que los comprende.

Estado de la técnica

10 La tuberculosis es una enfermedad infecciosa de curso subagudo o crónico, con altas tasas de morbilidad y mortalidad, y que continúan siendo un importante problema socio-sanitario en nuestro medio. La tuberculosis continua siendo la infección más prevalente del planeta. Se estima que 12 millones de personas están infectadas por el complejo *Mycobacterium tuberculosis* que incluye las especies causantes de tuberculosis en 15 humanos (*M. tuberculosis*, *M. africanum* *M. canetti*) y agentes causales de la tuberculosis en animales que pueden transmitirse a humanos (*M. bovis*, *M. microti* *M. caprae* y *M. pinnipedii*). Este enorme reservorio genera 8,7 millones de nuevos casos de tuberculosis al año y 1,4 millones de muertes directamente atribuibles a la enfermedad (WHO, 2012). En 20 España, el número de casos declarados a la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica fue de 6.746 casos para el año 2011, lo que equivale a una tasa de 14,63 casos/100.000 habitantes (RENAVE, 2012). Del total de casos, 5.043 corresponden con tuberculosis respiratoria (10,93/100.000 habitantes) y 1.703 a tuberculosis extrapulmonar (3,69/100.000 habitantes). En cuanto a la localización anatómica de la enfermedad; 4.853 casos (72%) fueron de localización pulmonar, 121 (1,7%) fueron tuberculosis respiratoria sin especificar, 25 281 (4%) pleurales, 380 (1,4%) linfáticas, 98 (1,4%) meníngreas, 4 (0,06%) del SNC no meníngreas, 85 (1,3%) osteoarticulares, 58 (0,95%) genitourinarias, 34 (0,9%) digestivas, 48 (0,7%) diseminadas y 784 (11,6%) clasificadas como tuberculosis extra-respiratorias sin especificar.

Tradicionalmente, el diagnóstico microbiológico de la TUBERCULOSIS (TBP) se ha fundamentado en la baciloscopía, el cultivo y la identificación fenotípica. La baciloscopía o detección de bacilos ácido-alcohol resistentes proporciona una orientación diagnóstica preliminar y es el método más rápido, sencillo y económico. Sin embargo, la sensibilidad es escasa, entre el 50 y 80% de los cultivos positivos, y aunque la especificidad global es buena, esta ha disminuido en áreas con alta incidencia de aislados clínicos de micobacterias no tuberculosas (Schluger NW, 2001, Am J Resp Crit Care Med 164:2020-2024.).

Por el contrario, el cultivo continúa siendo el método de referencia debido a su especificidad y sensibilidad en muestras pulmonares, ya que permite acceder a posteriores estudios como la identificación fenotípica. El mayor inconveniente es el lento crecimiento de las micobacterias, que no permite el diagnóstico rápido, incluso con los nuevos sistemas semiautomatizados de cultivo.

El diagnóstico de la tuberculosis también puede ser indirecto mediante la demostración de granulomas caseificantes en material histológico, en el contexto de cuadro clínico compatible.

Exceptuando las tinciones en fluidos de cavidades estériles, todos los métodos convencionales de diagnóstico de la tuberculosis son lentos, oscilando entre 3 y 5 días en el caso de los métodos histológicos, a 4-6 semanas en el caso de cultivos de micobacterias (Alcaide y cols., 2005, Recomendaciones de la Sociedad de Enfermedades Infecciosas y microbiología clínica (SEIMC); Pertuiset E y cols., 1999, Medicine (Baltimore), 78: 309-20).

El diagnóstico etiológico precoz de la infección por Tuberculosis es fundamental para su adecuado tratamiento y reducción de la morbimortalidad asociada a la demora diagnóstica. Por otra parte, un diagnóstico más preciso evitaría el uso de tratamiento tuberculostático empírico, tan frecuentes en la práctica clínica y no exentos de riesgos innecesarios para los pacientes.

Para obviar en la medida de lo posible las limitaciones de los métodos diagnósticos convencionales de la tuberculosis humana, nuestro grupo ha desarrollado en los últimos

años varias técnicas de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) a tiempo real, aplicables al diagnóstico de la Tuberculosis humana. Tras optimizar y ensayar la técnica en diversos supuestos clínicos, se ha podido demostrar, que estas técnicas de diagnóstico molecular superan en eficacia a los métodos habituales, no solo en el diagnóstico de la 5 primoinfección, sino también en los casos de formas focales de la enfermedad (Queipo-Ortuño MI y cols., 2009, PLoS One 4(2):e4526; Colmenero JD y cols., 2012, Diagn Microbiol Infect Dis 74(1):70-2. Sanjuan-Jimenez R y cols., 2013, PLoS One 8(3):e58353; Sanjuan-Jimenez R y cols 2013, PLoS Negl Trop Dis 7(12):e2593).

Esta nueva técnica de PCR a tiempo real (RT-PCR) emplea la tecnología 10 LightCycler, que permite cuantificar la carga bacteriana y reducir el tiempo del ensayo a unos 45 min (P200801280). El proceso de la PCR a tiempo real permite una mayor automatización, lo cual redunda en una mayor simplicidad de la técnica, reducción del riesgo de contaminación y menor variabilidad inter e intra ensayo (Queipo-Ortuño MI, y cols., 2008, Clin Microbiol Infect., 14: 1128-34).

15 En los últimos años también se ha mejorado de forma notable los primitivos métodos moleculares aplicados al diagnóstico de la tuberculosis, los cuales adolecían de una adecuada sensibilidad y presentaban problemas de especificidad. Con este objetivo se han estudiado diferentes secuencias de ADN para la identificación del complejo *Mycobacterium tuberculosis*, mediante PCR convencional y PCR a tiempo real, empleando el elemento de 20 inserción IS6110, cfp32 y superóxido dismutasa, un segmento del gen *hsp65*, genes del ARNr 16S, región intergénica 16-23S, senX3-regX3, etc. En la mayoría de los casos, los autores aplican métodos PCR-IS6110 de diseño propio y los resultados son comparados con otras técnicas. Dichos sistemas sólo muestran buenos niveles de sensibilidad en muestras BAAR+ (Dalovisio JR y cols., 1996, Clin Infect Dis 23:1099-1106; Baba K y cols., 25 2008, Diagn Mol Pathol 17(2):112-117) y además, los estudios comparativos indican altas variaciones de sensibilidad y especificidad entre laboratorios (Sankar S y cols., 2011, Mol Diagn Ther 1;15(1):1-11.; Wallis RS y cols., 2013, Lancet Infect Dis 13(4):362-372.).

Existen numerosos estudios sobre el rendimiento de técnicas PCR para el diagnóstico de PTB, pero son limitados los trabajos que incluyen muestras de LP en la población de estudio (Shibuya *et al.*, 2002; Moure *et al.*, 2011; Miller *et al.*, 2011; Tortoli *et al.*, 2012; Tang *et al.*, 2013).

Miller *et al.* (2011) comparan el rendimiento diagnóstico de *Xpert MTB/RIF* y una RT-PCR IS6110 en 122 muestras (89 pulmonares y 23 extrapulmonares) con sospecha de TB. La sensibilidad clínica en muestras pulmonares fue del 93% utilizando *Xpert MTB/RIF* y 90% con el ensayo IS6110, mientras que la especificidad fue del 97% para ambos sistemas. Ambos métodos muestran una sensibilidad del 100% en muestras BAAR+ pero disminuye hasta un 60 y 40% respectivamente en las BAAR-. Los resultados falsos negativos se correspondieron con 2 esputos y 1 biopsia pleural en los casos compartidos, además de un BAL y un LP para el ensayo RT-PCR.

El estudio de Tang *et al.* (2013) analiza una M PCR con las dianas IS6110 e ISB9 para el diagnóstico de TB en 369 muestras clínicas, incluyendo esputo, orina, pus, BAL, JG, LCR y LP. La sensibilidad del ensayo (93,10%) fue superior a las de microscopía (69,40%) y cultivo (54,90%), mientras que la especificidad (89,60%) fue inferior a la de las técnicas convencionales (100 y 98,90%, respectivamente). La mayoría de falsos negativos (6%) se correspondieron con muestras de LP con BAAR-.

La dificultad de detección en muestras pleurales ha sido descrita previamente (de Wit *et al.*, 1992; Valdés *et al.*, 2003; Santos *et al.*, 2009), debido a la presencia de sustancias inhibidoras y baja carga bacteriana de las muestras.

Maurya *et al.* (2011) evalúan una técnica PCR-IS6110 para la detección del MTC en 102 muestras pleurales con sospecha de TB. La sensibilidad del ensayo PCR con el método de extracción CTAB fue muy alta (95,70%), pero la especificidad diagnóstica fue muy inferior (69,10%) comparada con las técnicas de microscopía (31,90 y 96,30% respectivamente). Los autores concluyen que la PCR-IS6110 es más sensible que los métodos convencionales, pero no absoluta para la identificación de todos los casos de TB pleural.

Igualmente, el estudio de Rosso *et al.* (2011) analiza un ensayo RT-PCR basado en IS6110 con 150 muestras de líquido o tejido pleural (98 con TB y 52 controles negativos). La sensibilidad (42,80%) y especificidad (94,20%) del ensayo fue superior a

las técnicas de microscopia y cultivo, aunque inferior a la sensibilidad global lograda con la combinación de los resultados de cultivo e histopatología de las muestras de tejido pleural.

Otros estudios (Villena et al., 1998; Parandaman et al., 2000; Pai et al., 2004; Dil-5 Afroze et al., 2006) muestran resultados muy variables de sensibilidad y especificidad en muestras pleurales, lo que podría estar causado por aspectos metodológicos. Los distintos cebadores y protocolos utilizados por los autores sugieren la necesidad de realizar estudios más exhaustivos, fundamentalmente en la elección del método de extracción más adecuado para este tipo de muestra clínica.

10 Asimismo, los estudios de Aldous et al. (2005) y Santos et al. (2009) demuestran que los métodos de extracción utilizados para el diagnóstico de TB, en muestras pleurales y de esputo respectivamente, influyen en el rendimiento de las técnicas RT-PCR.

El sistema *Xpert® MTB/RIF* (Cepheid) es una prueba de amplificación molecular totalmente automatizada que permite detectar el MTC así como mutaciones que confieren 15 resistencia a la rifampicina. Basada en la tecnología PCR a tiempo real y PCR semianidada, utiliza tres cebadores específicos y cinco sondas moleculares dirigidas a un fragmento del gen *rpoB*. La técnica se realiza en la plataforma multifuncional *GeneXpert®* que integra todos las etapas, incluida la extracción de ácidos nucleicos, mediante la utilización de un dispositivo en el que están contenidos todos los reactivos necesarios para el procesamiento directo de muestras respiratorias.

20 Los resultados se obtienen en dos horas y está validado para muestras BAAR+ y BAAR-. Este sistema fue recomendado por la OMS en 2010 y orientado a los programas nacionales de control de la tuberculosis para que incorporen este nuevo método en los algoritmos existentes de diagnóstico.

Sin embargo, pese a los métodos existentes en el estado del arte, sigue siendo 25 necesario encontrar alternativas más sencillas, rápidas, flexibles en los tiempos de almacenamiento de la muestra y con la menor necesidad de manipulación directa de las mismas.

Breve descripción de la invención

Los inventores de la presente invención, aplicando la tecnología PCR a tiempo real diseñada, han desarrollado un sistema de PCR basado en el agente intercalante SYBR Green I, capaz de identificar de forma rápida el complejo *Mycobacterium tuberculosis* en una única reacción, con bajo riesgo de contaminación y una interpretación semiautomática de los resultados.

Un primer aspecto de la invención se refiere al uso de los cebadores de secuencia SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 para la detección y/o identificación de especies de *Mycobacterium tuberculosis* complex. En una realización preferida de este aspecto de la invención, la detección y/o identificación se realiza en una muestra biológica no sérica

Un segundo aspecto de la invención se refiere a un método para la detección y/o identificación de especies de *Mycobacterium tuberculosis* complex que comprende:

a) extraer el ADN de una muestra biológica,
15 b) amplificar el ADN mediante una técnica de reacción en cadena de la polimerasa, usando los cebadores de secuencia SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2. En una realización preferida de este aspecto la muestra biológica es una muestra biológica no sérica. Más preferiblemente, la muestra biológica se selecciona de entre: esputo, lavado bronquioalveolar, aspirado gástrico, líquido pleural, iopia pleural, punciones aspirativas de aguja fina, o cualquiera de 20 sus combinaciones. En otra realización preferida de este aspecto, la técnica de PCR es PCR en tiempo real (RT-PCR)

Un tercer aspecto de la invención se refiere a un kit, de ahora en adelante kit de la invención, que comprende los cebadores de secuencia SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2. En una realización preferida de este aspecto el kit además comprende el agente intercalante 25 SYBR-Green I, y aún más preferiblemente comprende una muestra control.

Un cuarto aspecto de la invención se refiere al uso del kit de la invención para la detección y/o identificación de especies de *Mycobacterium tuberculosis* complex.

Un quinto aspecto de la invención se refiere al cebador de secuencia SEQ ID NO: 1.

Un sexto aspecto de la invención se refiere al cebador de secuencia SEQ ID NO: 2.

Descripción de los dibujos.

Figura 1. Evaluación del ensayo PCR a tiempo real senX3-regX3 en muestras clínicas. Un grupo de tres muestras es simultáneamente analizado para la diana senX3-regX3 de *Mycobacterium tuberculosis* complex.

Panel A: Temperatura de disociación (T_m $90,05\pm0,14$) de los productos de amplificación generados mediante PCR a tiempo real con la diana senX3-regX3. Las señales específicas correspondientes a los productos de amplificación de tres pacientes con tuberculosis pulmonar, control positivo con ADN de *Mycobacterium tuberculosis* y un control negativo sin ADN; líneas de color azul generadas a partir de una muestra de esputo de un paciente con tuberculosis pulmonar; líneas de color rojo de una muestra de broncospirado procedente de un paciente con tuberculosis pulmonar; líneas de color verde de una muestra de esputo de un paciente con tuberculosis pulmonar. Las líneas con triángulos negros representan el control positivo de senX3-regX3 con ADN de *Mycobacterium tuberculosis* y la línea de color gris el control negativo de la técnica.

Panel B: Curvas de amplificación de los productos generados mediante PCR a tiempo real con la diana senX3-regX3. Las señales específicas correspondientes a los productos PCR de tres pacientes con tuberculosis pulmonar, el control positivo con ADN de *Mycobacterium tuberculosis* y control negativo; líneas de color azul, muestra de esputo de un paciente con tuberculosis pulmonar, líneas de color rojo, muestra de broncospirado procedente de un paciente con tuberculosis pulmonar, líneas de color verde, muestra de esputo de un paciente con tuberculosis pulmonar. Las líneas con triángulos negros representan el control positivo de senX3-regX3 con ADN de *Mycobacterium tuberculosis* y la línea de color gris el control negativo de la técnica.

Descripción detallada de la invención.

La presente invención se refiere a un conjunto de **cebadores, método y kit de diagnóstico molecular rápido para la detección del complejo *Mycobacterium tuberculosis* complex** utilizando el intercalante fluorescente del DNA SYBR-Green I; más 5 concretamente para la detección de ADN específico de los miembros que componen el complejo *Mycobacterium tuberculosis* en muestras clínicas no sanguíneas, mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en Tiempo Real.

El método propuesto comprende: la amplificación mediante tecnología LightCycler en un tubo de reacción de un fragmento de 164 pb correspondiente a la región intergénica del 10 sistema de dos componentes senX3-regX3, específica para los miembros de *Mycobacterium tuberculosis* complex. Este sistema consiste en un sensor y un regulador que controlan la expresión de un conjunto de genes relacionados con la virulencia. Ambos componentes se encuentran separados por una región intergénica que contiene un tipo de repeticiones denominadas MIRU. El número de MIRU encontrados en la región intergénica senX3-regX3 15 es variable, pero existe como mínimo un elemento de 77 pb específico del complejo *M. tuberculosis*. La detección del producto amplificado resultante se basa en el agente intercalante SYBR Green I. Dicha técnica utiliza dos secuencias oligonucleotídicas que se hibridan a secuencias complementarias del ADN diana.

La técnica propuesta en esta invención es significativamente menos costosa, 20 sencilla, sensible y específica que los métodos de diagnóstico clínico tradicionales, incluido dentro de estos el kit comercial *Xpert® MTB/RIF* (Cepheid) y presenta las siguientes ventajas:

- La detección de los productos PCR teniendo en cuenta la temperatura de disociación (Tm) es rápida y objetiva, permitiendo un fácil y rápido diagnóstico de la 25 infección específica (tuberculosis);
- No requiere utilizar electroforesis en geles de agarosa, luz ultravioleta, ni el uso de agentes tóxicos como el bromuro de etidio, para la detección de los productos obtenidos;

- Debido a que la PCR a tiempo real se realiza en un sistema cerrado que no requiere manipulación de los productos PCR una vez completada la misma, disminuye notablemente el riesgo de contaminación por arrastre;

5 - Evita el riesgo de manipulación de los microorganismos por el personal de laboratorio;

- Permite el manejo simultáneo de un elevado número de muestras;
- Es susceptible de ser automatizada, lo cual la hace muy atractiva para el uso en cualquier laboratorio de diagnóstico clínico.

De este modo, constituye un **primer objeto** de la presente invención el uso de los 10 cebadores de secuencia SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 para la detección y/o identificación de especies de *Mycobacterium tuberculosis* complex en muestras clínicas. Dichos cebadores están formados por un primer cebador cuya secuencia comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO 1 y por un segundo cebador cuya secuencia comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO 2. Más preferentemente, 15 la secuencia de nucleótidos del primer cebador es idéntica a la SEQ ID NO 1 y la secuencia de nucleótidos del segundo cebador es idéntica a la SEQ ID NO 2.

En una realización preferida de este primer aspecto de la invención la detección se realiza en una muestra biológica no sérica.

En el contexto de la presente invención, se entiende por "muestra biológica" 20 cualquier materia que contenga un ácido nucleico, por ejemplo, ADN. Más preferiblemente, la muestra biológica es no sérica, y aún más preferiblemente, se selecciona de entre: esputo, lavado bronquioalveolar, aspirado gástrico, líquido pleural, iopia pleural, punciones aspirativas de aguja fina, o cualquiera de sus combinaciones.

En la presente invención se entiende por "ADN" o "ADN genómico" al material 25 genético de los organismos vivos que controla la herencia y se localiza en el núcleo de las células. Extracto de ADN

En el contexto de la presente invención se entiende "extracto de ADN", cuando tras someter la muestra biológica a un procedimiento de extracción, separación, purificación o

clonación de ADN, entre otros, se obtiene como resultado ya sea en seco, en solución, unido o no a otras moléculas, adherido o no a diversas sustancias o lechos, materia en la que el ADN se encuentra en mayor proporción relativa respecto al resto de moléculas presentes, en comparación con la muestra biológica de partida.

5 Así "extracto de ADN" se refiere al ADN extraído de cualquier muestra biológica que contenga ADN humano, ya sea procedente de un individuo vivo o muerto, feto, órganos, tejidos ó células.

Constituye un **segundo objeto** de la presente invención un método para la detección y/o identificación de especies de *Mycobacterium tuberculosis* complex, de ahora en adelante 10 método de la invención, que comprende:

- a) extraer el ADN de una muestra biológica,
- b) amplificar el ADN mediante una técnica de reacción en cadena de la polimerasa, (PCR) usando los cebadores de secuencia SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, la técnica de reacción 15 en cadena de la polimerasa es la PCR en tiempo real de una secuencia de 164 pb complementarias de la región intergénica senX3-regX3 de *Mycobacterium tuberculosis* complex, utilizando el conjunto de cebadores SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2.

Más preferiblemente la muestra biológica es una muestra biológica no sérica, y aún 20 más preferiblemente donde la muestra biológica se selecciona de entre: esputo, lavado bronquioalveolar, aspirado gástrico, líquido pleural, biopsia pleural, punciones aspirativas de aguja fina, o cualquiera de sus combinaciones.

Constituye un **tercer objeto** de la presente invención un kit, de ahora en adelante kit de la invención, que comprende los cebadores de secuencia SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2.

En una realización preferida de este aspecto, el kit de la invención además comprende el 25 agente intercalante SYBR-Green I, y aún más preferiblemente además comprende una muestra control.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso del kit de la invención para la detección y/o identificación de especies de *Mycobacterium tuberculosis* complex.

Otro aspecto de la invención se refiere a un cebador de secuencia SEQ ID NO: 1.

Otro aspecto de la invención se refiere a un cebador de secuencia SEQ ID NO: 2.

Otro aspecto de la invención se refiere a un medio de almacenamiento legible por un ordenador que comprende instrucciones de programa capaces de hacer que un ordenador
5 lleve a cabo el método de la invención.

Otro aspecto de la invención se refiere a una señal transmisible que comprende instrucciones de programa capaces de hacer que un ordenador lleve a cabo los pasos del método

10 **Modos de realización de la invención**

A continuación, se describe detalladamente, y sin carácter limitativo, un modo de realización de la invención, particularmente desarrollado para muestras clínicas, optimizado para la tecnología *LightCycler* (Roche Applied Science).

Extracción y purificación del ADN

15 El ADN total se extrae a partir de muestras pleuropulmonares, las cuales se almacenan a -20 °C. En esta alícuota se encuentra el ADN genómico humano y el bacteriano, este último en baja concentración. Para la realización de la prueba, el ADN total es extraído utilizando el kit *Quiamp DNA Mini kit* (Qiagen) a partir de muestras de 200 µL según las instrucciones del fabricante. El ADN precipitado resultante del protocolo comercial
20 es resuspendido en 50 µL de agua estéril y se almacena a 4 °C hasta su utilización. Para el análisis por PCR se utilizan alícuotas de 5 µL de la suspensión obtenida.

Amplificación

Para la identificación de *Mycobacterium tuberculosis* se amplificó una región de ADN de 164 pb complementarias de la región senX3-regX3 de *Mycobacterium tuberculosis* complex. Como iniciadores de la reacción de amplificación de la secuencia diana, se emplean los cebadores identificados en las SEQ ID NO 1 y SEQ ID NO 2.
25

Análisis de los productos de amplificación de la RT-PCR en tiempo real

La mezcla de reacción se realiza en un volumen final de 20 μ L, conteniendo 4 μ L de *LightCycler FastStart DNA Master Plus SYBR Green I* (Roche Molecular Biochemical), 0,5 μ mol/L de cada cebador iniciador de reacción y un volumen variable (1-5 μ L) del ADN molde correspondiente con concentraciones finales de ADN total de hasta un máximo de 150 ng.

5 La reacción se lleva a cabo en un termociclador *LightCycler 2.0* (Roche Applied Science). Los capilares son sellados, centrifugados a 500 g durante 5 segundos, y amplificados en el termociclador. La activación de la polimerasa se realiza a 95 °C durante 10 minutos y se llevan a cabo 45 ciclos compuestos de 10 segundos a 95 °C, 5 segundos a 60 °C y 6 segundos a 72°C. La temperatura de transición se fija a 20 °C/segundo durante todos los

10 pasos. Para monitorizar la cantidad de producto amplificado, la señal de fluorescencia del SG fue adquirida al final de cada paso de extensión. Tras concluir la amplificación se realiza una etapa de disociación (*melting*) calentando a 95°C durante 0 segundos a 20°C/segundo manteniendo a 65°C durante 60 segundos a 20°C/segundo y finalmente calentando lentamente a 0.1 °C/segundo hasta 95°C. Finalmente se realiza una etapa de enfriamiento a

15 40°C durante 15 segundos. Los productos de amplificación son analizados en el canal SYBR excitación a (470 nm, detección a 530 nm) del termociclador.

Las curvas de fluorescencia son analizadas utilizando el paquete informático *LightCycler*, versión 4.1. Para minimizar la variabilidad experimental y determina el ciclo umbral (C_p) utilizamos el método automático de la segunda derivada máxima. En todos los

20 ensayos realizados se incluyen controles negativos y controles positivos correspondientes a diluciones seriadas de *Mycobacterium tuberculosis* complex. Para garantizar la reproducibilidad de los resultados todas las muestras son procesadas por duplicado. Para prevenir la contaminación de las muestras se realizan medidas estándares y flujos unidireccionales en la extracción y amplificación del ADN. Un ensayo se considera negativo para ADN de *Brucella spp.* y *Mycobacterium tuberculosis* si el valor C_p supera los 38 ciclos.

25 Los resultados obtenidos, resumidos en la figura 1, evidencian la fiabilidad del procedimiento propuesto en la presente invención.

Resultados: Detección del complejo *Mycobacterium tuberculosis* en muestras pulmonares.

La eficiencia diagnóstica de los ensayos RT-PCR senx3-regx3 fue valorada en un estudio preliminar, con 66 muestras respiratorias procedentes de 30 pacientes diagnosticados con PTB (pleuropulmonar) y 36 pacientes control en los que la TB fue excluida. Todas las muestras fueron procesadas a simple ciego y por duplicado para cada ensayo RT-PCR.

De las 30 muestras obtenidas desde pacientes con TB, 9 (30%) fueron BAAR+ y 21 (70%) fueron BAAR-. Los cultivos fueron positivos en todos los casos de PTB (100%) y de las 36 muestras restantes del grupo control; en 9 de ellas (25%) se aislaron MNT (2 *M. mucogenicum*, 3 *M. gordonaee*, 1 *M. chelonae*, 1 *M. fortuitum*, 1 *M. intracellulare*, 1 *M. avium*), en 3 (8,33%) *Nocardia* sp y en las 24 restantes (66,67%) los cultivos fueron negativos. Los ensayos RT-PCR mostraron amplificación positiva por duplicado en 28 muestras de los 30 casos de TB con los cebadores senx3-regx3, y los resultados falsos negativos se correspondieron en ambos casos con las muestras de LP (Tabla 2 y figura 1).

Tabla 2. Resultados obtenidos en microscopia, cultivo y ensayos RT-PCR.

Tipo de muestras	Diagnóstico		Resultados			
	TB	Control	BAAR+	BAAR-	Cultivo+	senx3-regx3
Esputo (39)	17	22	7	10	17	17
BAS (13)	6	7	1	5	6	6
BAL (3)	2	1	1	1	2	2
Aspirado gástrico (5)	2	3	0	2	2	2
Líquido pleural (3)	2	1	0	2	2	0
Biopsia pleural (2)	1	1	0	1	1	1
PAAF (1)	0	1	0	0	0	0
Total (66)	30	36	9	21	30	28

Tabla 3. Rendimiento diagnóstico de los ensayos senx3-regx3 e IS6110.

[%, (95% IC)]	senx3-regx3
Sensibilidad	93,33 (84,40-100)
Especificidad	100
VPP	100
VPN	94,73 (87,60-100)
Precisión	97,00 (92,80-100)
CPP	NV*
CPN	0,07 (0,02-0,25)

VPP, Valor Predictivo positivo; VPN, Valor Predictivo negativo; CPP, Cociente de probabilidad de un resultado positivo; CPN, Cociente de probabilidad de un resultado negativo. NV*, No valorable por denominador igual a cero.

De las 17 muestras evaluadas con *Xpert MTB/RIF* (6 esputos, 4 BAS, 4 JG, 2 BAL, 1 PAAF y 1 LP), 11 de pacientes con TB y las otras 6 del grupo control, 16 fueron identificadas 10 correctamente y un BAS resultó falsamente negativo (Tabla 4). En comparación, el ensayo RT-PCR senx3-regx3 identificó correctamente todas las muestras pulmonares.

Tabla 4. Resultados obtenidos con el ensayo senx3-regx3 y *Xpert* (MTB/RIF).

Tipo de muestra	Diagnóstico		Resultados +	
	TB	Control	senX3-regX3	Xpert
Esputo (6)	5	1	5	5
BAS (4)	3	1	3	2
BAL (2)	2	0	2	2
Aspirado gástrico (4) (1	3	1	1
PAAF (1)	0	1	0	0
Total (17)*	11	6	11	10

15

*Las 49 muestras restantes del estudio solo fueron evaluadas con el ensayo sen X3-regX3.

Conclusiones

El ensayo senx3-regx3 detecta con precisión el MTC en muestras respiratorias. La sensibilidad del ensayo RT-PCR fue del 93,33%, generando únicamente dos resultados falsos negativos en las muestras de LP, con una especificidad del 100% en las muestras analizadas.

Los resultados de este estudio piloto sugieren que el ensayo senx3-regx3 podría ser similar o incluso más eficiente que el sistema *Xpert MTB/RIF* en muestras de pacientes con sospecha de TB pulmonar y/o pleural. Comparativamente, el ensayo RT-PCR identificó correctamente todas las muestras realizadas previamente con el *Xpert MTB/RIF*, incluido el resultado falso negativo generado por este último en una muestra de BAS.

Bibliografía

1. **Alcaide F, Esteban MJ, Palacios GC.** (2005) Procedimientos en Microbiología clínica: Micobacterias. En: Recomendaciones de la Sociedad de Enfermedades Infecciosas y microbiología clínica (SEIMC), Cercenado E, Cantón R, Eds. SEIMC, Madrid. Disponible en:
<http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia/>.
5. 2. **Baba K, Pathak S, Sviland L, Langeland N, Hoosen AA et al.** (2008) Real-time quantitative PCR in the diagnosis of tuberculosis in formalin-fixed paraffin-embedded pleural tissue in patients from a high HIV endemic area. *Diagn Mol Pathol* 17(2):112-117.
10. 3. **Colmenero JD, Sanjuan-Jimenez R, Ramos B, Morata P.** (2012) Miliary pulmonary tuberculosis following intravesical BCG therapy: case report and literature review. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012 Sep;74(1):70-2. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2012.05.026. Epub 2012 Jun 28.
15. 4. **Dalovisio JR, Montenegro-James S, Kemmerly SA, Genre CF, Chambers R et al.** (1996) Comparison of the amplified *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) direct test, Amplicor MTB PCR, and IS6110-PCR for detection of MTB in respiratory specimens. *Clin Infect Dis* 23:1099-1106
20. 5. **Pertuiset E, Beaudreuil J, Lioté F, Horusitzky A, Kemiche F y cols.** (1999) Spinal tuberculosis in adults. A study of 103 cases in a developed country, 1980-1994. *Medicine (Baltimore)* 78(5):309-20.
25. 6. **Queipo-Ortuño MI, Colmenero JD, Bravo MJ, García-Ordoñez MA, Morata P.** (2008) Usefulness of a quantitative real-time PCR assay using serum samples to discriminate between inactive, serologically positive and active human brucellosis. *Clin Microbiol Infect* 14:1128-1134.
30. 7. **Queipo-Ortuño MI, Colmenero JD, Bermudez P, Bravo MJ, Morata P.** (2009) Rapid differential diagnosis between extrapulmonary tuberculosis and focal complications of brucellosis using a multiplex real-time PCR assay. *PLoS One* 4(2):e4526.
35. 8. **Rodríguez E, Villarrubia S, Díaz O, Hernández G, Tello O.** (2012) Situación de la tuberculosis en España, 2011. Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica. *Boletín Epidemiológico Semanal* 20(15):140-152.

9. **Sanjuan-Jimenez R, Colmenero JD, Bermúdez P, Alonso A, Morata P.** (2013) Amplicon DNA melting analysis for the simultaneous detection of *Brucella* spp and *Mycobacterium tuberculosis* complex. Potential use in rapid differential diagnosis between extrapulmonary tuberculosis and focal complications of brucellosis. *PLoS One.* 2013;8(3):e58353. doi: 10.1371/journal.pone.0058353. Epub 2013 Mar 8.

5

10. **Sanjuan-Jimenez R, Morata P, Bermúdez P, Bravo MJ, Colmenero JD.** (2013) Comparative clinical study of different multiplex real time PCR strategies for the simultaneous differential diagnosis between extrapulmonary tuberculosis and focal complications of brucellosis. *PLoS Negl Trop Dis* 7(12):e2593. doi: 10.1371/journal.pntd.0002593. eCollection 2013.

10

15. **Sankar S, Ramamurthy M, Nandagopal B, Sridharan G.** (2011b) An appraisal of PCR-based technology in the detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Diagn Ther* 1;15(1):1-11. doi: 10.2165/11586160-000000000-00000.

15

20. **Shluger NW.** (2001) Changing approaches to the diagnosis of tuberculosis. *Am J Resp Crit Care Med* 164:2020-2024.

20

25. **Wallis RS, Kim P, Cole S, Hanna D, Andrade BB et al.** (2013) Tuberculosis biomarkers discovery: developments, needs, and challenges. *Lancet Infect Dis* 13(4):362-372. doi: 10.1016/S1473-3099(13)70034-3.

25

14. **World Health Organization.** (2012) Global tuberculosis report 2012. Geneva, Switzerland: WHO/HTM/TB/2012.

Secuencias

1. Secuencias

1.1 Información general SEQ ID NO 1

5 Características:

- Longitud: 19 pares de bases
- Tipo: ácido nucleico
- Configuración: linear
- Organismo: *Mycobacterium tuberculosis*
- Tipo de molécula: ADN genómico
- Descripción de la SEQ ID NO 1

1 cggttaatca cgacggcac 19

1.2 Información general SEQ ID NO 2

15 Características:

- Longitud: 24 pares de bases
- Tipo: ácido nucleico
- Configuración: linear
- Organismo: *Mycobacterium tuberculosis*
- Tipo de molécula: ADN genómico
- Descripción de la SEQ ID NO 2

1 aacaggtcac aacgagagga agag 24

1.3 Información general de la secuencia amplificada por SEQ ID NO 1 y SEQ ID

25 NO 2

Características:

- Longitud: 164 pares de bases
- Tipo: ácido nucleico

- Configuración: linear
- Organismo: *Mycobacterium tuberculosis*
- Tipo de molécula: ADN genómico

5 - Descripción de la secuencia de amplificación utilizando SEQ ID NO 1 y SEQ ID NO 2

1 cgctaa tcacgacggc accatccgcg tgtggagcaa accgggaacc gggtaacgt 57
58 tcacctggc tttccggcg ttgatcgagg cctatcacga cgacgagcga cccgagcagg 118
119 cgcgagagcc cgaactgcgg tcaaacaggt cacaacgaga ggaagag 164

10

Reivindicaciones

- 1.- Uso de los cebadores de secuencia SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 para la detección y/o
5 identificación rápida y simple de especies de *Mycobacterium tuberculosis* complex.

- 2.- El uso según la reivindicación anterior, donde la detección se realiza en una muestra
biológica no sérica.

- 10 3.- Un método para la detección y/o identificación de especies de *Mycobacterium*
tuberculosis complex que comprende:
 - a) extraer el ADN de una muestra biológica,
 - b) amplificar el ADN mediante una técnica de reacción en cadena de la polimerasa, usando
los cebadores de secuencia SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 según se describe en cualquiera
15 de las reivindicaciones 1-2.

- 4.- El método según la reivindicación 3, donde la muestra biológica es una muestra biológica
no sérica.

- 20 5.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 3-4, donde la muestra biológica es
una muestra pulmonar.

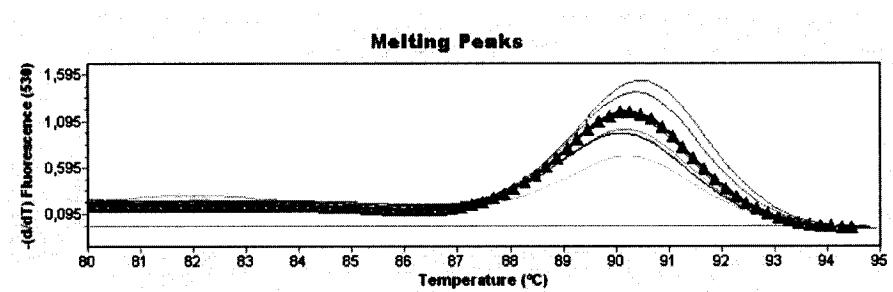
- 6.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 3-5, donde la muestra biológica se
selecciona de entre: esputo, lavado bronquioalveolar, aspirado gástrico, biopsia pleural,
25 punciones aspirativas de aguja fina, o cualquiera de sus combinaciones.

- 7.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 3-6, donde la técnica de PCR es
PCR en tiempo real (RT-PCR).

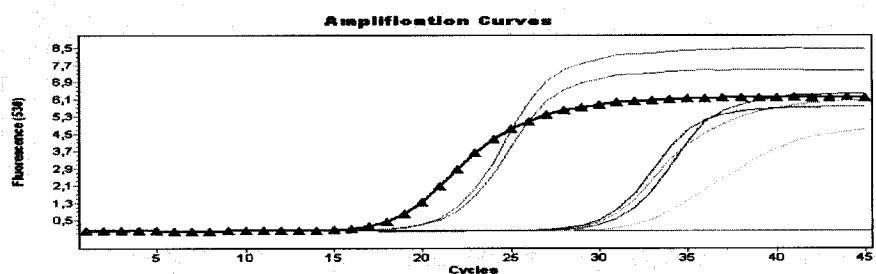
- 8.- Un kit que comprende los cebadores de secuencia SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2.
- 9.- El kit según la reivindicación anterior, que además comprende el agente intercalante
5 SYBR-Green I.
- 10.- El kit según cualquiera de las reivindicaciones 8-9, que además comprende una muestra control.
- 10 11.- El uso de un kit según cualquiera de las reivindicaciones 8-10 para la detección y/o identificación de especies de *Mycobacterium tuberculosis* complex.

Fig.1

Panel A



Panel B



Lista de Secuencias

<110> UNIVERSIDAD DE MÁLAGA
SERVICIO ANDALUZ DE SALUD

<120> Método y kit para la detección de secuencias de ADN específicas
de *Mycobacterium tuberculosis* complex en muestras pulmonares.

<130> P Morata (26/11/13)

<160> 3

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Cebador Fw para *Mycobaacterium tuberculosis* complex

<400> 1

cggctaatca cgacggcac

19

<210> 2

<211> 24

<212> DNA

<213> Cebador Rw para *Mycobaacterium tuberculosis* complex

<400> 2

aacaggtcac aacgagagga agag

24

<210> 3

<211> 164

<212> DNA

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 3

cggctaatca cgacggcacc atccgcgtgt ggagcaaacc ggaaaccggg tcaacgttca 60

ccttggctct tccggcggtt atcgaggcct atcacgacga cgagcgaccc gagcaggcgc 120

gagagcccgaa actgcggta aacaggtcac aacgagagga agag 164



②1 N.º solicitud: 201400277

②2 Fecha de presentación de la solicitud: 31.03.2014

③2 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤1 Int. Cl.: **C12Q1/68** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥6 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	QUEIPO-ORTUÑO, M.I. et al., 'Rapid differential diagnosis between extrapulmonary tuberculosis and focal complications of brucellosis using a multiplex real-time PCR assay', PLOS ONE, 2009, Vol. 4, No. 2, Página e4526, ISSN: 1932-6203, doi: 10.1371/journal.pone.0004526, Métodos, Tabla 1, Resultados, Discusión.	1-11
X	COLMENERO, J.D. et al., 'Multiplex real-time polymerase chain reaction: a practical approach for rapid diagnosis of tuberculous and brucellar vertebral osteomyelitis', SPINE, 2010, Vol. 35, No. 24, páginas E1392-1396, ISSN: 0362-2436 (print), ISSN: 1528-1159 (electronic), doi: 10.1097/BRS.0b013e3181e8eeaf, Materiales y Métodos, Resultados.	1-11
X	SANJUAN-JIMENEZ, R. et al., 'Amplicon DNA melting analysis for the simultaneous detection of Brucella spp and Mycobacterium tuberculosis complex. Potential use in rapid differential diagnosis between extrapulmonary tuberculosis and focal complications of brucellosis', PLOS ONE, 2013, Vol. 8, No. 3, Página e58353, ISSN: 1932-6203 (Electronic), doi: 10.1371/journal.pone.0058353, Epub: 08-03-2013, Materiales y Métodos.	1-11
X	SANJUAN-JIMENEZ, R. et al., 'Comparative clinical study of different multiplex real time PCR strategies for the simultaneous differential diagnosis between extrapulmonary tuberculosis and focal complications of brucellosis', PLOS NEGLECTED TROPICAL DISEASES, 2013 Dec, Vol. 7, No. 12, Página e2593, ISSN: 1935-2735 (print), ISSN: 1935-2735(electronic), doi: 10.1371/journal.pntd.0002593, Métodos.	1-11

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe 28.10.2014	Examinador J. L. Vizán Arroyo	Página 1/4
--	----------------------------------	---------------

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12Q

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, EMBL-EBI

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 28.10.2014

Declaración**Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)**

Reivindicaciones
Reivindicaciones 1-11

SI
NO

Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)

Reivindicaciones
Reivindicaciones 1-11

SI
NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	QUEIPO-ORTUÑO, M.I. et al., <i>PLoS One</i> , (2009), 4(2): e4526.	2009
D02	COLMENERO, J.D. et al., <i>Spine</i> , (2010), 35(24): E1392-6.	2010
D03	SANJUAN-JIMENEZ, R. et al., <i>PLoS One</i> , (2013), 8(3): e58353.	2013
D04	SANJUAN-JIMENEZ, R. et al., <i>PLoS Negl. Trop. Dis.</i> , (2013 Dec), 7(12): e2593.	2013

En D01-D04 se divultan procedimientos de detección de *Mycobacterium tuberculosis* basados en una reacción PCT a tiempo real (RT-PCR).

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

1. NOVEDAD (Art. 4.1. y Art. 6.1. de la Ley de Patentes) y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 4.1. y Art. 8.1. de la Ley de Patentes).

1.1 Reivindicaciones independientes 1, 3, 8.

1.1.1. El objeto de la reivindicación 1 consiste en el uso de los cebadores de secuencia SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 para la detección y/o identificación de *Mycobacterium tuberculosis*. Según la descripción estos cebadores permiten la amplificación de un fragmento de 164 pb correspondiente a la región intergénica del sistema de dos componentes senX3-regX3, específica de *M. tuberculosis* (cf. Página 8, líneas 8-12). Las reivindicaciones 3 y 8 tratan de un método de detección y/o identificación de *M. tuberculosis* basado en una reacción de amplificación PCR que hace uso de los cebadores de la reivindicación 1, y de un kit que comprende dichos cebadores.

En los documentos D01-D04 se describe un método de identificación de *Mycobacterium tuberculosis* que comprende una reacción PCR a tiempo real basada en el uso de cebadores cuyas secuencias de nucleótidos son idénticas a las secuencias SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, y el producto amplificado es también un fragmento de 164pd de la región intergénica senX3-regX3 de *M. tuberculosis* (cf. D01: Métodos, Tabla 1. D02. Materiales y Métodos. D03: Materiales y Métodos, Tabla 1. D04: Métodos). Por todo ello se considera que el objeto de protección de las reivindicaciones 1, 3, 8 y el de las reivindicaciones dependientes 2, 4-7, 9-11 no es nuevo ni tiene actividad inventiva sobre la base del documento D01-D04.

1.2. La presente solicitud no satisface el criterio establecido en el Art. 4.1. de la Ley de Patentes, pues el objeto de las reivindicaciones 1-11 no es nuevo ni tiene actividad inventiva de acuerdo con los Arts. 6.1. y 8.1. de la Ley de Patentes.