

(12)

SOLICITUD de PATENTE

(43) Fecha de publicación: **25/12/2013** (51) Int. Cl: **C12N 15/00** (2006.01)

(22) Fecha de presentación: **26/06/2012**

(21) Número de solicitud: **2012007512**

(71) Solicitante:

**CENTRO DE INVESTIGACION Y ASISTENCIA EN
TECNOLOGIA Y DISEÑO DEL ESTADO DE JALISCO,
A.C.
Av. Normalistas No. 800 44270 Guadalajara Jalisco
MX**

(72) Inventor(es):

**RUBEN HIPOLITO LOPEZ REVILLA
Avanzada 555 - 26 SAN LUIS POTOSI San Luis Potosí
78250 MX
IKURI ALVAREZ MAYA
JOSE ALBERTO TLACUILO PARRA**

(74) Representante:

**CARLOS OMAR AGUILAR NAVARRO
Av. Normalistas 800 Guadalajara Jalisco 44270 MX**

(54) Título: **METODO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS, MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMPLEX Y MYCOBACTERIUM BOVIS EN UNA MUESTRA BIOLÓGICA, Y USO DE OLIGONUCLEOTIDOS ESPECÍFICOS.**

(54) Title: **METHOD FOR IDENTIFYING MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS, MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMPLEX AND MYCOBACTERIUM BOVIS IN A BIOLOGICAL SAMPLE AND USE OF SPECIFIC OLIGONUCLEOTIDES.**

(57) Resumen

En la presente invención se describe y reclama un método in Vitro para la identificación específica de Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium bovis y Mycobacterium Complex, de manera simultánea mediante PCR multiplex y el kit de diagnóstico que lo contiene, mediante el uso de los oligonucleótidos descritos en las SEQ ID No. 1, SEQ. ID. No. 2, SEQ. ID. No. 3, SEQ. ID. No. 4, SEQ. ID. No. 5 y SEQ. ID. No. 6.

(57) Abstract

The present invention describes and claims an in Vitro method for the specific identification of Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium bovis and Mycobacterium Complex in a simultaneous manner by PCR multiplex and the diagnosis kit containing the same, using the oligonucleotides described in the SEQ ID No. 1, SEQ. ID. No. 2, SEQ. ID. No. 3, SEQ. ID. No. 4, SEQ. ID. No. 5 y SEQ. ID. No. 6.

**METODO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS,
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMPLEX Y MYCOBACTERIUM BOVIS
EN UNA MUESTRA BIOLÓGICA, Y USO DE OLIGONUCLEOTIDOS
ESPECÍFICOS.**

5

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención está relacionada con la amplificación de ácidos nucleicos, incluyendo la detección y/o la identificación de microorganismos en una muestra usando el método de reacción en cadena de la polimerasa múltiple.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La tuberculosis es una enfermedad que produce una alta morbilidad y continúa siendo un importante problema socio-sanitario en nuestro medio. Se estima que 2,000 millones de personas están infectadas por *Mycobacterium tuberculosis*. El número de personas infectadas por tuberculosis es de 8.8 millones en 2011, incluyendo 1.1 millones de casos de personas con VIH. El número de personas que murieron de tuberculosis fue de 1.4 millones en 2011, de las cuales 350,000 personas fueron VIH positivas, lo que equivale a 3,800 muertes al día.

La tasa estimada de incidencia global fue de 128 casos por 100,000 habitantes en 2011. La prevalencia de infección tuberculosa en nuestro país oscila en torno al 30-35% de la población, y la incidencia de enfermedad tuberculosa es de 37 casos/100.000 habitantes (Work
5 Group of the MPTR. 2000, Med. Clin. (Barc) 114: 530- 7).

Las mycobacterias son del género de bacterias alcohol-ácido resistentes, no móviles, bacilos gram positivos. El género incluye, pero no se limita, a algunas especies tales como, *Mycobacterium africanum*,
M. avium, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium bovis-BCG*, *M.*
10 *chelonae*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M.*
micortii, *M. scrofulaceum*, *M. paratuberculosis* y *M. tuberculosis*.
Ciertamente algunos de esos microorganismos son agentes causales de la enfermedad. Los casos de infecciones por mycobacterias están incrementándose en México y en el mundo en general. Muchos de
15 esos casos están relacionados con la epidemia del SIDA, que provoca inmunodeficiencia en las personas infectadas, las cuales son particularmente susceptibles a la infección por mycobacterias.

La identificación convencional de las infecciones por mycobacterias radica en la baciloscopia y el cultivo de los organismos, seguido por las
20 pruebas bioquímicas. Los procedimientos son tardados, y un típico

diagnóstico por métodos de cultivo convencional puede tomar hasta seis semanas. Esta falta de métodos de diagnóstico adecuados hace que la detección de la enfermedad no se produzca a tiempo para su tratamiento, lo que provoca que cada año mueran millones de personas por tuberculosis. Hasta el momento 2.2 millones de casos de tuberculosis son diagnosticados cada año por exámenes microscópicos, mientras que el resto suelen ser detectados con métodos más antiguos y a menudo poco fiables. Los sistemas de cultivo automatizado tales como el sistema Bactem TM (Becton Dickinson Microbiology System, Sparks, Md.) pueden reducir el tiempo para el diagnóstico de una o dos semanas. Sin embargo, aún se requiere reducir el tiempo para el diagnóstico de infecciones mycobacterianas a menos de una semana, preferentemente a un día.

Las pruebas basadas en la amplificación de ácidos nucleicos como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) son usualmente más sensibles y proporcionan resultados aún más rápidos, a veces dentro de horas. Los métodos requieren necesariamente el diseño de oligonucleótidos los cuales deben ser altamente específicos para la región del gen que se necesita amplificar.

Ahora bien, en la presente solicitud se diseñaron una serie de oligonucleótidos para la detección del género *Mycobacterium*, del Complejo *Mycobacterium tuberculosis* y la identificación de la especie *Mycobacterium bovis*.

- 5 La PCR para la identificación de infecciones por *M. tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, y *Mycobacterium bovis BCG* han sido ya establecidas. Por lo tanto, la PCR monoplex para cualquiera de estas infecciones se conoce en el estado del arte. Sin embargo, un
- 10 obstáculo importante para esta técnica es la necesidad de llevar a cabo una reacción de PCR por separado para cada agente patógeno que puede ser lento y excesivamente caro, especialmente si se necesita hacer la determinación de un gran número de muestras. Además la PCR monoplex incrementa el volumen de muestra disponible que podría ser muy pequeña como en el caso de muestras
- 15 de líquido cefalorraquídeo.

La PCR múltiple es capaz de detectar al mismo tiempo diversos organismos microbianos o bien identificar diferentes alelos de un organismo. En una PCR múltiple, el conjunto de diferentes reactivos, que se utiliza deberá favorecer que todos los demás componentes de

20 la mezcla en reacción funcionen como si fuera una condición

monoplex, pero además los iniciadores deben ser diseñados específicamente para cada uno de los organismos que se quiera identificar o detectar. Debido a que en la PCR múltiple, los iniciadores y las condiciones que se aplican en las condiciones de una PCR monoplex ya no producen los mismos resultados, los oligonucleótidos de los diferentes organismos pueden interferir entre sí y reducir la sensibilidad y especificidad de la prueba. De esta forma, tanto la selección de iniciadores, así como la optimización de las condiciones y la concentración de los reactivos utilizados debe ser estandarizada, tomando en cuenta la procedencia de los reactivos, de los iniciadores, así como la necesidad de contar con la sensibilidad necesaria en esa condición de conjunto de iniciadores en particular.

Recientemente Gupta y colaboradores han publicado una técnica de PCR múltiple, utilizando un conjunto de iniciadores para diferenciar entre *M. tuberculosis Complex* y *Mycobacterias* no Tuberculosas (Gupta S, Bandyopadhyay D, Paine SK, Gupta S, Banerjee S, Bhattacharya S, Gachhui R, Bhattacharya B. Rapid identificación of mycobacterium species with the aid of múltiple polymerase chain reaction (PCR) from clinical isolates. *Open Microbiol J.* 2010 Oct 21; 4:93-7). Por otro lado, Lee y colaboradores han publicado una PCR múltiple utilizando iniciadores para el complejo *Mycobacterium*

- tuberculosis* y *M. bovis* (BCG) mediante la identificación de RD1 (Lee HR, Kim SY, Chang HE, Song SH, Lee HS, Park KU, Song J, Kim EC. J Clin Microbiol. Novel múltiple PCR using dual-priming oligonucleotides for detection and discrimination of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex and *M. bovis* BCG. 2010 Dec; 48 (12):4612-4). Sin embargo, estos reportes fallan en la detección específica de *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. t. complex*, en donde el procedimiento de detección de las tres simultáneamente ayudaría a una prognosis rápida y precisa en caso de pacientes, por ejemplo, inmunocomprometidos.
- 10 Las patentes WO 01/44520, KR20110130336(A) y WO2011149279 (A2) divulgaron los ensayos para la detección de especies de *Mycobacterium* en una muestra basada en el uso de iniciadores específicos para el ADN recombinante (rDNA) 16S en diferentes especies de *Mycobacterium*. Sin embargo no existen patentes de la
- 15 combinación de iniciadores, para los genes 16S rDNA, IS6110 y RD4. La combinación de este conjunto de iniciadores para PCR, permite la identificación, en una misma reacción de PCR del género *Mycobacterium*, además del *Complejo Mycobacterium Complex*, que incluye las especies *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M bovis BCG*, *M. africanum*, *M. canetti*, *M. microti*, *M. pinnipedii* y *M. mungi*, y por ultimo
- 20

esta combinación permite la identificación específica de la especie *M. bovis*.

Este tipo de ensayo es importante dado que al ser una prueba múltiple, se abaten costos, tiempos para obtención de resultados y se obtienen resultados específicos para las infecciones por mycobacterias frecuentes en humanos. Es decir, la técnica propuesta en esta invención es significativamente más rápida, sensible y específica que los métodos de identificación clínico tradicionales (bacteriológicos, serológicos y de tinción) y más sensible en el sentido de que en una sola reacción se descartan a las mycobacterias más comunes en infecciones en humanos. Este tipo de detección es fundamental para el diagnóstico y tratamiento de pacientes que requieren atención rápida, por ejemplo, en pacientes inmunocomprometidos o inmunosuprimidos, o aquellos que presenten un estado de salud que los haga altamente susceptibles a las mycobacterias.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

Figura 1. El diseño de la PCR múltiple consiste en la identificación de secuencias de DNA correspondientes a los genes 16S rDNA, IS6110 y RD4. Los iniciadores diseñados son derivados de una región diferente a las secuencias reportadas previamente. El par de

iniciadores para el gen 16S rDNA produce un producto de PCR de 630 pb, e identifica el género *Mycobacterium*. El par de iniciadores para la secuencia IS6110 produce un segmento de DNA de 137 pb e identifica *Mycobacterium Tuberculosis complex*. Finalmente, un producto de 255
5 pb del gen RD4 confirma la presencia de esta región en especies no pertenecientes a *M. bovis*.

Figura 2. Gel de agarosa al 2%, en donde se muestran los pares de oligonucleótidos generables a partir de las SEC ID NO. 1 y 2, útiles para la identificación de *M. tuberculosis*. En el carril 1 se muestra
10 el marcador de peso molecular. El carril marcado como 2 es control negativo solo agua bidestilada sin mezcla de reacción, carril 3 control negativo sin DNA templado y carril 4, con ADN de *M. tuberculosis*. Las bandas de amplificación positivas para *M. tuberculosis* son de 630 pb. El marcador de peso molecular utilizado es 1 Kb DNA Ladder (Life
15 technologies).

Figura 3. Gel de agarosa al 2% en donde se muestra la sensibilidad de la reacción de PCR al variar la cantidad de ADN genómico de la muestra para los oligonucleótidos de las SEC ID 1 y 2, a una temperatura de 60 °C, una concentración de iniciadores de 500
20 nM, una concentración de dNTPs de 30 µM. En el carril 1 se muestra el

marcador de peso molecular, y en los carriles 3 a 8 se muestran las concentraciones de 0, 0.5, 1, 5, 10, 20, 40 ng de ADN genómico de *M. avium*. Los productos de PCR obtenidos son de 630 pb. El marcador de peso molecular utilizado es Gel Pilot 1 Kb Plus (Qiagen).

5 **Figura 4.** Gel de agarosa al 2% en donde se demuestra la especificidad de los oligonucleótidos generables a partir de las SEC. ID No. 1 y 2 *M. tuberculosis* con especies filogenéticamente cercanas. Carril 1 marcador de peso molecular, carril 2 sin mezcla de reacción y carril 3 sin DNA templado. Carriles 4 al 9, se corrieron en orden las
10 siguientes muestras: Carril 4, *M. chelonae*; Carril 5, *M. smegmatis*; Carril 6, *M. avium*; Carril 7, *M. arupense*; Carril 8, *M. abscessus*; Carril 9, *M. tuberculosis*, en concentraciones de 40 ng de DNA. Se observa una banda de amplificación para los carriles 3 a 9 correspondientes a *M. tuberculosis*. El marcador de peso molecular utilizado es Gel Pilot 1 Kb
15 Plus (Qiagen).

Figura 5. Gel de agarosa al 2% en donde se demuestra la especificidad de los oligonucleótidos generables a partir de las SEC. ID No. 1 y 2 de *M. tuberculosis* con especies filogenéticamente cercanas. Carril 1 marcador de peso molecular, carril 2 sin mezcla de reacción y
20 carril 3 sin DNA templado. Carriles 4 al 9, se corrieron en orden las

siguientes muestras: Carril 4, *M. tuberculosis*; Carril 5, *S. aureus*; Carril 6, *Salmonella enterica*; Carril 7, *Echerichia coli*; Se observa una banda de amplificación en el carril 4 correspondiente a *M. tuberculosis* y ausencia de la banda en los carriles 5 a 7. El marcador de peso molecular utilizado es 1 Kb Ladder (Bio-Rad).

Figura 6. Gel de agarosa al 2%, en donde se muestran los pares de oligonucleótidos generables a partir de las SEC ID NO. 3 y 4, útiles para la identificación de *M. tuberculosis Complex*. En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular. El carril marcado como 2 es control negativo solo agua bidestilada sin mezcla de reacción, carril 3 control negativo sin DNA templado; carril 4, ADN DNA *M. chelonae*; Carril 5 DNA *M. smegmatis*; Carril 6 DNA *M. avium*; Carril 7 DNA *M. arupense*; Carril 8 DNA *M. abscessus*; Carril 9 muestra clínica de tuberculosis. Se observan amplicones de 630 pares de bases en todos los carriles con DNA de micobacteria y un amplificado de 137 pb en la muestra clínica de *M. tuberculosis Complex*. El marcador de peso molecular utilizado es Gel Pilot 1 Kb Plus (Qiagen).

Figura 7. Gel de agarosa al 2%, en donde se muestran los pares de oligonucleótidos generables a partir de las SEC ID NO. 5 y 6, útiles para la identificación de *M. bovis*. En el carril 1 se muestra el

marcador de peso molecular. El carril marcado como 2 es control negativo solo agua sin mezcla de reacción, carril 3 control negativo sin DNA templado; carril 4, DNA *M. chelonae*; Carril 5 DNA *M. smegmatis*; Carril 6 DNA *M. avium*; Carril 7 DNA *M. arupense*; Carril 8 DNA *M. abscessus*; Carril 9 muestra clínica de tuberculosis. Se observan amplicones de 630 pares de bases en todos los carriles con DNA de micobacteria y un amplificado de 255 pb en la muestra clínica de *M. tuberculosis*. El marcador de peso molecular utilizado es Gel Pilot 1 Kb Plus (Qiagen).

10 **Figura 8.** Gel de agarosa al 2%, en donde se muestran los pares de oligonucleótidos generables a partir de las SEC ID No. 1, 2, 3, 4, 5 y 6, útiles para la identificación de *M. bovis*. En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular. El carril marcado como 2 es control negativo solo agua bidestilada sin mezcla de reacción, carril 3 control negativo sin DNA templado; carril 4 muestra clínica de tuberculosis. Se observan amplicones de 630 pares de bases en todos los carriles con DNA de micobacteria y un amplificado de 255 pb en la muestra clínica de *M. tuberculosis* y 137 pb. El marcador de peso molecular utilizado es Gel Pilot 1 Kb Plus (Qiagen).

Figura 9. Gel de agarosa al 2%, en donde se muestran los pares de oligonucleótidos generables a partir de las SEC ID NO. 1, 2, 3, 4, 5 y 6 útiles para la identificación de *M. bovis*. En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular. El carril marcado como 2 es control negativo solo agua bidestilada sin mezcla de reacción, carril 3 *M. chelonae*; carril 5 DNA *M. avium*, Carril 7 DNA muestra clínica de *M. tuberculosis*, Carril 9 DNA *M. bovis*. Se observan amplicones de 630 pares de bases en todos los carriles con DNA de micobacteria y un amplificado de 255 pb en la muestra clínica de *M. tuberculosis* y su ausencia en la muestra de *M. bovis*. El marcador de peso molecular utilizado es Gel Pilot 1 Kb Plus (Qiagen).

Figura 10. Gel de agarosa al 2%, en donde se muestran los pares de oligonucleótidos generables a partir de las SEC ID NO. 1, 2, 3, 4, 5 y 6 útiles para la identificación de *Mycobacterium*. En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular. El carril marcado como 2 es control negativo solo agua bidestilada sin mezcla de reacción, carril 3 DNA de muestra de expectoración (individuo No. 1) que presenta dos bandas de 630 y 137 pb; carril 4 DNA *M. avium*; carril 5 DNA muestra clínica ganglionar, se observan amplicones de 630 pb, 255 pb y 137 pb en la muestra. El marcador de peso molecular utilizado es Gel Pilot 1 Kb Plus (Qiagen).

BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un método *in vitro* para la identificación específica de *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium tuberculosis Complex* y *Mycobacterium bovis*, (figura 5 1) caracterizado porque comprende los pasos de: a) amplificar fragmentos de ADN a partir de una muestra biológica mediante PCR con los oligonucleótidos de las secuencias SEQ ID No. 1, SEQ. ID. No. 2, SEQ. ID. No.3, SEQ. ID. No. 4, SEQ. ID. No. 5 y SEQ. ID. No. 6, b) identificar los fragmentos de ADN amplificados, en donde en el paso a) dichos 10 oligonucleótidos son utilizados de manera simultánea.

En una modalidad preferida, la muestra biológica es derivada de un sujeto en estudio, mismo que puede ser un animal mamífero y muy preferentemente un humano. Asimismo, la muestra biológica se selecciona de cualquier tipo de muestra que contenga 15 ADN.

En una modalidad adicional de la invención, se describe y reclama un kit para la identificación específica de *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium tuberculosis Complex* y *Mycobacterium bovis* caracterizado porque comprende los oligonucleótidos de las SEQ 20 ID No. 1, SEQ. ID. No. 2, SEQ. ID. No.3, SEQ. ID. No. 4, SEQ. ID. No. 5 y SEQ.

ID. No. 6; en donde en una modalidad preferida comprende al menos una muestra de ADN genómico de *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium tuberculosis Complex* (figura 4) (control positivo) y al menos una muestra de ADN genómico de al menos una especie filogenéticamente no relacionada con *M. tuberculosis* (figura 5, control negativo).

Finalmente, es una modalidad adicional describir y reclamar el uso de los oligonucleótidos de las secuencias SEQ ID No. 1, SEQ. ID. No. 2, SEQ. ID. No.3, SEQ. ID. No. 4, SEQ. ID. No. 5 y SEQ. ID. No. 6, para la identificación específica de *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium tuberculosis Complex*, en donde dichos oligonucleótidos se utilizan de manera simultánea.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención describe y reclama el uso de las SEQ ID Nos. 1 a 6 de manera simultánea para la identificación de *M. tuberculosis*, *M. tuberculosis Complex* y *M. bovis*, en una muestra biológica (figura 8). Este tipo de ensayo es importante dado que al ser una prueba de PCR múltiple, se abaten costos, tiempos para

obtención de resultados y se obtienen resultados específicos para las infecciones por tuberculosis frecuentes en humanos.

El método de la presente invención permite diseñar un sistema de PCR múltiple con iniciadores específicos capaces de identificar y diferenciar
5 *Mycobacterium* de otros géneros de bacterias, además de identificar *Mycobacterium* complex, y a la especie *M. bovis* en una única reacción de forma rápida y sensible (ver figura 1).

La detección en una sola reacción de los productos de PCR es rápida, fácil y objetiva, permitiendo un fácil y rápido diagnóstico de la
10 infección específica, permitiendo el monitoreo de la respuesta al tratamiento. Además permite el manejo simultáneo de un elevado número de muestras y disminuye el riesgo de manipulación de los microorganismos patógenos.

Obtención de las secuencias y sondas de identificación

15 A continuación se describe la utilidad y características de los oligonucleótidos diseñados para el diagnóstico de *M. tuberculosis*, *M. tuberculosis* complex y *M. bovis*. Los oligonucleótidos de la invención pueden ser utilizados después del cultivo para confirmar la identidad del organismo cultivado. Alternativamente, pueden ser utilizados antes

del cultivo o en lugar del cultivo para la detección e identificación de micobacterias utilizando métodos de amplificación de ácidos nucleicos conocidos. En los casos, los oligonucleótidos diseñados y los métodos de experimentación proveen un medio de discriminación rápida entre los ácidos nucleico de *M. tuberculosis* y otras especies de micobacterias, permitiendo a un técnico en la materia la rápida identificación de los microorganismos evitando los tardados procedimientos de caracterización fenotípica y bioquímica que aún se utilizan. Tales identificaciones de los agentes etiológicos involucrados en una infección micobacteriana provee información tal que puede ser utilizado para determinar la terapia apropiada en un corto periodo de tiempo.

Los iniciadores de PCR de *Mycobacterium tuberculosis* que tiene la siguiente secuencia: MYF: GGA AAC TGG GTC TAA TAC CGG (SEC ID NO: 1) y MYR: GAT CCC AAG GAA GGA AAC CCA CAC C (SEC ID NO: 2) se diseñaron a partir del segmento del alineamiento de secuencias genómica de *M tuberculosis*, *M bovis*, *M kansasii*, *M avium*, utilizando las secuencia genómica de GU142932.1 e incluyen el segmento que va del nucleótido 149 a 169 pb y de la 699 a 724 pb (figura 2). Como controles negativos en el alineamiento se utilizaron las secuencia de bacterias no pertenecientes al género *Mycobacterium* como *E. coli*, *S*

typhimurium, *S aureus* (figura 5). El oligonucleótido MYF está dirigido contra los 24 nucleótidos anteriores a la región V2 del gene ribosomal 16S. El oligonucleótido MYR corresponde a la región V5 del gen 16S ribosomal.

- 5 Para la identificación del Complejo *Mycobacterium tuberculosis* y *M. bovis* se analizó el gen IS6110 (figura 6) y la secuencia RD4 en la base de datos de las secuencias reportadas en el NCBI (figura 7).

Se realizaron alineamientos BLASTn para cada uno de los genes de la región RD4 y dentro de ese conjunto se seleccionó el gen Rv0222 del
10 genoma de *M. tuberculosis* H37Rv. Se alinearon en el programa BLASTn todas las secuencias genómicas de *Mycobacterias* y otros procariontes con alta similitud a los genes IS6110 y Rv0222. Este análisis permitió conocer el grado de conservación entre los genes objetivos de las diferentes especies.

- 15 Para el análisis BLAST del gen Rv0222 de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, se capturaron las secuencias de nucleótidos de los genes IS6110 y Rv0222 de la base de datos de NCBI y con los archivos en formato FASTA se realizó un alineamiento ClustalW2 para cada gen. Para determinar la especificidad de los iniciadores se incluyeron las cepas

control que presentan dichos genes parcialmente y secuencias con mediana homología.

Para *Mycobacterium tuberculosis Complex* se diseñaron los oligonucleótidos ISF: GGT TCA TCG AGG AGG TAC CCG (SEC ID NO: 3) y ISR: CGC GCA GCC AAC ACC AAG TAG (SEC ID NO: 4) e incluyen el segmento que va del nucleótido 10 a 30 y 118 a 141 de la secuencia del gen IS6110.

Para identificar *Mycobacterium bovis* se utilizaron los iniciadores RDF: ATG AGC AGC AAA GCG CGA CG (SEC ID NO: 5) y RDR: ACC TTC GAC GAC GAC ATT CTG (SEC ID NO: 6) e incluyen los segmentos de nucleótidos que comprende la región de 36 a 19 y de 270-292 de la secuencia del gen RD4.

Para verificar la especificidad, se realizaron alineamientos con secuencias similares o complementarias a la estructura molecular de los iniciadores diseñados (incluyendo genes humanos, animales y de plantas), esto con el fin de evitar amplificaciones de DNA inespecíficas de la PCR.

Obtención de muestras biológicas

Las muestras biológicas provienen de un sujeto de estudio, el cual es un animal, mamífero, y en una modalidad preferida, dicho mamífero es un humano. Dichas muestras biológicas pueden provenir de cualquier fluido, tejido, desecho o célula que contenga ADN en buenas
5 condiciones para llevar a cabo la PCR. Tales muestras se pueden seleccionar, pero no están limitadas a: esputo, lavados gástricos, raspado faríngeo, broncoscopia, lavado broncoalveolar, lavado bronquial, biopsia transbronquial, aspiración transtraqueal, aspiración transbronqueal, pleura, nódulos intratorácicos, entre otros.

10 **Método de diagnóstico in vitro de *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium tuberculosis* Complex por PCR.**

De manera general, el método de la presente invención consta de los siguientes pasos:

- 15
- Aislar el ADN proveniente de una muestra biológica.
 - Realizar una reacción de PCR utilizando simultáneamente los oligonucleótidos de las SEQ ID Nos. 1 a 6.

- Corroborar la presencia de *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium tuberculosis Complex* por medio de algún método convencional.

Dichos métodos convencionales son como se describen,
 5 pero no limitados a: Ausubel FM et al. (1999) Short protocols in molecular biology: a compendium of methods from Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons; Fasman GD (1989) Practical handbook of biochemistry and molecular biology. Florida CRC Press, 1989, Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning: a
 10 laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press., Innis MA et al. (1990); PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic Press; Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ (1999) PCR applications: protocols for functional genomics. Academic Press; McClelland M, Honeycutt R, Mathieu-Daude F, Vogt T, Welsh J (1997) Fingerprinting by
 15 arbitrarily primed PCR. Methods Mol Biol. 85:13-24; McClelland M, Welsh J (1994) DNA fingerprinting by arbitrarily primed PCR. PCR Methods Appl. 4:S59-65; McPherson MJ, Hames BD, Taylor GR (1995) PCR 2 : a practical approach. IRL Press; McPherson MJ, Quirke P, Taylor GR (1994) PCR : a practical approach. Oxford University Press; Evans IH (1996).

EXTRACCIÓN DEL DNA CULTIVO BACTERIANO

Crece *M. tuberculosis* en el medio adecuado, colectar 10 ml de un cultivo con una DO_{600nm} de 0.4-0.6 y centrifugar 5 min a 4000 rpm, desechar el sobrenadante. Resuspender las pastillas en 1 ml de GTE y

5 transferir o mantener la suspensión. Centrifugar por 5 min a 14000 rpm. Desechar el sobrenadante. Resuspender las pastillas en 450 μ l de GTE y añadir 50 μ l de lisozima (10mg/ml), mezclar e incubar toda la noche a 37°C. Añadir 100 μ l de SDS (10%) y mezclar suavemente. Añadir 50 μ l de

10 proteinasa K (10mg/ml) y mezclar suavemente. Añadir 5 μ l de Rnasa (10mg/ml). Incubar a 55°C durante media hora. Adicionar 200 μ l de NaCl 5M y mezclar suavemente. Añadir 160 μ l de la solución de CTAB precalentada e incubar a 65°C por 10 min. Añadir 1 ml de cloroformo: alcohol isoamilico (24:1), agitar suavemente para mezclar, durante 2

15 min, y luego centrifugar 5 min a 12000 rpm. Transferir la fase acuosa a un tubo nuevo y repetir la extracción con 1 ml de cloroformo: alcohol isoamilico (24:1), centrifugar. Transferir 800 μ l de la fase acuosa a un tubo nuevo. Añadir 560 μ l de isopropanol y mezclar suavemente por inversión hasta que se observen las hebras de DNA. Centrifugar a 12000 rpm por 10 min. Desechar el sobrenadante y lavar las pastillas con 1 ml

20 de etanol al 70%. Centrifugar 5 min. a 12000 rpm y desechar el

sobrenadante. Dejar secar la pastilla y disolver el DNA en 50-150 μ l de TE, almacenar a 4°C.

EXTRACCIÓN DEL DNA DE ESPECIMEN BIOLÓGICO

El proceso de extracción consiste en:

- 5 Obtener la muestra clínica del paciente; añadir n-acetil-L-cisteína; alicuotar en un tubo eppendorf; centrifugar a 12,000 rpm por 6min; resuspender la pastilla en 467 μ l de TE; adicionar 30 μ l de SDS; añadir 6 μ l de proteinasa K; envolver la boquilla del tubo eppendorf con parafilm; incubar a 37°C por 1 hora; añadir un volumen igual de fenol-
10 cloroformo y homogeneizar. Centrifugar a 14,000 rpm durante 7 min; extraer la fase acuosa (la superior) y colocarla en un nuevo tubo eppendorf (repetir esta última secuencia de centrifugación y extracción).

- Agregar un volumen de 1/10 en equivalencia de acetato de sodio;
- 15 agregar 0.6 volúmenes de Isopropanol; centrifugar a 14,000 rpm durante 5 min; resuspender la pastilla en etanol al 70%; centrifugar a 14,000 rpm durante 5 min; vaciar el líquido y secar la pastilla. Resuspender la pastilla en 100 μ l de TE.

20 **STANDARIZACION DE LA PCR**

Con el objeto de conocer cuales son las mejores condiciones para que los oligonucleótidos de la presente invención funcionen óptimamente de manera simultánea, se realizaron múltiples pruebas de estandarización de concentraciones de diversos reactivos (figura 3). A manera de ejemplo, en la siguiente tabla 1 se especifica la mejor manera de llevar a cabo la reacción de PCR para la identificación de M. tuberculosis, M. bovis y M. tuberculosis complex de manera simultánea.

Tabla 1

La concentración de los reactivos se ha estandarizado en la mezcla de PCR de triple reacción de 100 µl:

(La concentración mínima detectable de ADN de un organismo en particular se ajusta a la sensibilidad de la prueba)	
Agua destilada	64.5 µl
Solución amortiguadora 10 x	10.0 µl
Componentes de solución amortiguadora 10 X: 0.1 M Tris-HCl, pH 8.8, 15 mM de MgCl ₂ , 25 mM MgCl ₂	2.0 µl (en la reacción: 2.0 mM)
10 mM dNTPs	2,5 µl (a partir del 250 M)
50 pmoles / µl MYF	1,25 µl (a partir del 0.625 pmoles / µl)
50 pmoles / µl MYR	1,25 µl (a partir del 0.625 pmoles / µl)
50 pmoles / µl ISF	1,0 µl (a partir del 0.5 pmoles / µl)
50 pmoles / µl ISR	1,0 µl (a partir del 0.5 pmoles / µl)
50 pmoles / µl RDF	1,25 µl (a partir del 0.625 pmoles / µl)
50 pmoles / µl RDR	1,25 µl (a partir del 0.625 pmoles / µl)

5 μ / μ l de Taq ADN pol	2,0 μ l (a partir de 10 unidades)
ADN Templado	2.0 μ l de cada organismo

Condiciones de reacción:

Las reacciones en el termociclador se llevaron a cabo con 35 ciclos, con desnaturalización a 94 °C durante 45 segundos, alineamiento a 56 °C durante 45 segundos y extensión a 72 ° C. También durante 45 segundos con el último ciclo de extensión de 7 minutos.

Análisis comparativo del método de diagnóstico tradicional vs. el método de detección de la presente invención.

Con el objeto de probar cabalmente la ventaja competitiva de los métodos de la presente invención contra los métodos de diagnóstico tradicionales, a continuación se hace un comparativo de los tiempos de ambas pruebas:

Método tradicional para la detección de Mycobacterium

Preparación de Medio Lowenstein-Jensen

Rehidratar 37.3 g del medio base en 600 ml de agua destilada. Adicionar 12 ml de glicerol. Reposar 10 a 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente hasta el punto de ebullición durante 1 minuto. Esterilizar en autoclave a 121°C (15 lbs de presión) durante 15 minutos.

Enfriar aproximadamente a 45°C. Conservar en refrigeración de 2° a 8°C. El medio preparado debe conservarse bien tapado hasta el momento de usarse.

Preparar un litro de huevo completo obtenido asépticamente y
5 mezclado sin formar burbujas. Mezclar el huevo y la base con suavidad. Distribuir en tubos de ensayo estériles con tapón de rosca. Colocarlos en posición inclinada, coagular y espesar el medio de 85° a 90°C durante 45 minutos. La superficie del medio tiene un color verde claro.

10 Dejar a temperatura ambiente antes de inocularlo.

Sembrar masivamente el medio de cultivo en la superficie con pipeta Pasteur estéril.

- Incubar 24 – 48 h a 35°C en posición inclinada con el tapón sin apretar.

15 - Continuar la incubación de los tubos inoculados cerrándolos herméticamente y en posición vertical.

- Examinar el crecimiento la primera semana, ya que entre 4 y 7 días puede haber desarrollo de las micobacterias de crecimiento rápido y después cada semana para identificar *M. tuberculosis* y otros cultivos

20 de desarrollo lento.

- Prolongar la incubación hasta 12 semanas.

- Realizar frotis y teñir por la Técnica de Ziehl Neelsen.

Después de realizar el primer nivel de identificación basado en la morfología de las colonias, afinidad tintorial y morfología de los bacilos, velocidad de desarrollo, pigmentación y producción de niacina, se
5 identifica las especies mediante pruebas bioquímicas.

Método de la presente invención:

El método de la presente invención permite la rápida identificación de *M. bovis*, *M. tuberculosis* y *M. tuberculosis complex* llevando a cabo
10 una reacción múltiple de PCR con los 6 oligonucleótidos de manera simultánea. Esto permite que el tiempo total de la prueba sea de no más de 4 horas, lo cual permite un diagnóstico rápido y oportuno para brindar una atención oportuna al paciente.

A continuación, se muestra como ejemplo un ensayo completo para
15 identificación de *M. bovis*, *M. tuberculosis* y *M. tuberculosis complex* en condiciones optimizadas (la estandarización se puede ver en los ejemplos de la presente solicitud).

La concentración de los reactivos se ha estandarizado en la mezcla de PCR de triple reacción de 100 µl:

(La concentración mínima detectable de ADN de un organismo en particular se ajusta a la sensibilidad de la prueba)

Agua destilada	64.5 μ l
Solución amortiguadora 10 x	10.0 μ l
Componentes de solución amortiguadora 10 X: 0.1 M Tris-HCl, pH 8.8, 15 mM de MgCl ₂ , 25 mM MgCl ₂	2.0 μ l (en la reacción: 2.0 mM)
10 mM dNTPs	2,5 μ l (a partir del 250 M)
50 pmoles / μ l MYF	1,25 μ l (a partir del 0.625 pmoles / μ l)
50 pmoles / μ l MYR	1,25 μ l (a partir del 0.625 pmoles / μ l)
50 pmoles / μ l ISF	1,0 μ l (a partir del 0.5 pmoles / μ l)
50 pmoles / μ l ISR	1,0 μ l (a partir del 0.5 pmoles / μ l)
50 pmoles / μ l RDF	1,25 μ l (a partir del 0.625 pmoles / μ l)
50 pmoles / μ l RDR	1,25 μ l (a partir del 0.625 pmoles / μ l)
5 μ / μ l de Taq ADN pol	2,0 μ l (a partir de 10 unidades)
ADN Templado	2.0 μ l de cada organismo

1. Colocar los reactivos en hielo para temperarlos.
2. Preparar la mezcla de reacción.
- 5 3. Añadir a cada tubo la mezcla de reacción, tomado en cuenta el número de muestras y además el blanco con agua.
4. Agregar DNA proveniente de una muestra biológica a cada uno de los tubos, con una concentración de al menos 20 ng/ μ l.
5. Tapar los tubos, para colocarlos en el termociclador,
- 10 programándolo con las condiciones adecuadas.

Condiciones de reacción:

A manera de ejemplo, las reacciones en el termociclador se llevaron a cabo con 35 ciclos, con desnaturalización a 94 °C durante 45 segundos, alineamiento a 56 °C durante 45 segundos y extensión a 72 °C. También durante 45 segundos con el último ciclo de extensión de 7 5 minutos.

De tal manera, el paso crítico es obtener ADN genómico suficiente de cualquiera de los tipos de muestras descritos anteriormente (ver sección de obtención de muestras clínicas), y a partir de las mismas, se utiliza el ADN genómico obtenido como el 10 templado del PCR donde se utilizan simultáneamente los oligonucleótidos de las SEQ ID Nos. 1 a 6, en condiciones óptimas de reacción. Los productos de PCR son obtenidos y analizados por cualquier método convencional, como por ejemplo, pero no limitado a electroforesis en gel de agarosa, hibridaciones tipo Dot-Blot, Southern 15 Blot, Northern Blot y similares; RT-PCR, PCR-ELISA, y los demás conocidos en el campo de la técnica (por ejemplo, pero no limitado a Molecular Diagnostic PCR handbook. (2005), Gerrit J. Viljoen, Louis H. Nel and John R. Crowther. Springer Publishers), para la correcta identificación de *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium* 20 *Complex*. Cabe señalar que dichos oligonucleótidos pueden estar conformados por nucleótidos sin marcar o marcados, como por

ejemplo, pero no limitado a, marca radioactiva, marca quimioluminiscente, luminiscente, fluorescente, biotinilada.

A fin de comprobar la utilidad del método de diagnóstico de la presente invención, se realizaron pruebas con muestras clínicas, utilizando combinatorias distintas de los oligos de las SEQ. ID. Nos. 1 a 6. Dichos experimentos se describen a continuación:

a) Identificación de *Mycobacterium tuberculosis* en muestras clínicas:

Los iniciadores diseñados para el gen 16S rDNA ID No. 1 y SEQ. ID. No. 2, identifican el género *Mycobacterium* como se observa en la figura No. 4. Un producto de PCR de 630 pb está presente se observa en todas las muestras de diferentes especies del género *Mycobacterium* como *M. chelonae*, *M. smegmatis*, *M. avium*, *M. arupense*, *M. abscessus* y *M. tuberculosis*. Demostrando así su utilidad para la identificación a nivel género mediante la técnica de PCR.

En la figura 4, se realizó un gel de agarosa al 2% en donde se demuestra la especificidad de los oligonucleótidos generables a partir de las SEC. ID No. 3 y 4 *M. tuberculosis* con especies filogenéticamente cercanas. Carril 1 marcador de peso molecular, carril 2 sin mezcla de reacción y carril 3 sin DNA templado. Carriles 4 al 9, se corrieron en

orden las siguientes muestras: Carril 4, *M. chelonae*; Carril 5, *M. smegmatis*; Carril 6, *M. avium*; Carril 7, *M. arupense*; Carril 8, *M. abscessus*; Carril 9, *M. tuberculosis*, en concentraciones de 40 ng de DNA. Se observa una banda de amplificación para los carriles 3 a 9 correspondientes a *M. tuberculosis*. El marcador de peso molecular utilizado es Gel Pilot 1 Kb Plus (Qiagen).

b) Identificación de *Mycobacterium tuberculosis Complex* en muestras clínicas:

Los iniciadores de PCR diseñados a partir del gen IS6110, identificaron las especie *M. tuberculosis* de forma específica como se muestra en la figura No. 6, en donde además de la muestra de DNA de *M. tuberculosis* (perteneciente al complejo) se probaron otras especies de mycobacterias no pertenecientes al Complejo *Mycobacterium tuberculosis* como *M. chelonae*, *M. smegmatis*, *M. avium*, *M. arupense*, *M. abscessus*. El producto de PCR fue específico de la muestra perteneciente al complejo de *M. tuberculosis* y ausente en las especies no pertenecientes a este complejo evidenciado la utilidad en la identificación de especies del complejo *Mycobacterium tuberculosis* mediante los iniciadores ID No. 3 y SEQ. ID. No. 4

Como se puede observar en la Figura 6, se realizó un gel de agarosa al 2%, en donde se muestran los pares de oligonucleótidos generables a partir de las SEC ID NO. 3 y 4, útiles para la identificación de *M. tuberculosis* Complex. En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular. El carril marcado como 2 es control negativo solo agua bidestilada sin mezcla de reacción, carril 3 control negativo sin DNA templado; carril 4, ADN DNA *M. chelonae*; Carril 5 DNA *M. smegmatis*; Carril 6 DNA *M. avium*; Carril 7 DNA *M. arupense*; Carril 8 DNA *M. abscessus*; Carril 9 muestra clínica de tuberculosis. Se observan amplicones de 630 pares de bases en todos los carriles con DNA de micobacteria y un amplificado de 137 pb en la muestra clínica de *M. tuberculosis* Complex. El marcador de peso molecular utilizado es Gel Pilot 1 Kb Plus (Qiagen).

15 c) Identificación de *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium* Complex ó *Mycobacterium bovis* en muestras clínicas:

El conjunto de iniciadores diseñados para que en una misma reacción de PCR, se identifique el género *Mycobacterium*, el Complejo *Mycobacterium tuberculosis* y la especie *M. bovis*, tiene utilidad para el
20 diagnostico molecular rápido y altamente sensible de estos

microorganismos causantes de infecciones en humanos. Como se observa en la figura número 9, las muestras de DNA de especies pertenecientes al género *Mycobacterium* se evidencia por el producto de PCR de 630 pb (carriles número 3, 5, 7 y 9). Las muestras de DNA de *M. tuberculosis* y *M.bovis* (carriles número 7 y 9) muestran además del producto de los iniciadores SEQ. ID No. 1 y SEQ. ID. No. 2, el producto de los iniciadores SEQ. ID No. 3 y SEQ. ID. No. 4, específico para las especies del *Mycobacterium Tuberculosis Complex*, comprobando su utilidad para la identificación de dicho complejo. Finalmente, en la muestra de *M. bovis* (carril numero 9), se observa la ausencia del producto de PCR de los iniciadores SEQ. ID No. 5 y SEQ. ID. No. 6, específicos para la identificación del gen RD4, y ausente en ésta especie.

En la figura 9, se observa un gel de agarosa al 2%, en donde se muestran los pares de oligonucleótidos generables a partir de las SEC ID NO. 1, 2, 3, 4, 5 y 6 útiles para la identificación de *M. bovis*. En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular. El carril marcado como 2 es control negativo solo agua bidestilada sin mezcla de reacción, carril 3 DNA de *M. chelonae*; carril 5 DNA *M. avium*, Carril 7 DNA muestra clínica de *M. tuberculosis*, Carril 9 DNA *M. bovis*. Se observan amplicones de 630 pares de bases en todos los carriles con

DNA de micobacteria y un amplificado de 255 pb en la muestra clínica de *M. tuberculosis* y su ausencia en la muestra de *M. bovis*. El marcador de peso molecular utilizado es Gel Pilot 1 Kb Plus (Qiagen).

Una modalidad adicional de la presente invención comprende un kit
5 de diagnóstico para la detección específica de *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium Complex*, el cual estará conformado por los oligonucleótidos de las secuencias SEQ. ID. No. 1 a 6, ya sean liofilizados o resuspendidos en un vehículo aceptable, una muestra de ADN genómico de *Mycobacterium*
10 *tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium Complex* como control positivo y una muestra de ADN genómico de alguna especie filogenéticamente no cercana a *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium Complex* como control negativo. Variantes en dichos elementos serán fácilmente deducibles
15 por un técnico en la materia y quedan comprendidas dentro del alcance de la presente solicitud.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Análisis de muestras clínicas de expectoración.

A manera de ejemplo, a continuación se muestra el análisis de una
20 muestra clínica, mediante el uso simultáneo de los 6 oligonucleótidos

de la presente invención. La muestras clínica de un individuo con signos claros de tuberculosis, fue recolectada y procesada como se describe previamente en la estandarización de la técnica. El DNA de la muestra de expectoración se procesó por la técnica de PCR utilizando el conjunto de iniciadores diseñados en esta invención de PCR múltiple. Como se observa en la figura número 9, la muestra de DNA se identifica dentro del género *Mycobacterium*, y del Complejo *Mycobacterium tuberculosis*, evidenciado por los productos de PCR de 630 pb y 137 pb (carril número 7). Además una muestra clínica de expectoración de un individuo con signos de tuberculosis muestra la presencia de *M. bovis* (carril numero 9), en el gel de electroforesis se observa la ausencia del producto de PCR de los iniciadores SEQ. ID No. 5 y SEQ. ID. No. 6, específicos para la identificación del gen RD4. De esta forma se manifiesta la utilidad de la invención, mediante la combinación del conjunto de iniciadores diseñados para los genes 16S rDNA, IS6110 y RD4.

En la Figura 9 antes mencionada, se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 2%, en donde se muestran los pares de oligonucleótidos generables a partir de las SEC ID NO. 1, 2, 3, 4, 5 y 6 útiles para la identificación de *M. bovis*. En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular. El carril marcado como 2 es control

negativo solo agua bidestilada sin mezcla de reacción, carril 3 DNA de *M. chelonae*; carril 5 DNA *M. avium*, Carril 7 DNA muestra clínica de *M. tuberculosis*, Carril 9 DNA *M. bovis*. Se observan amplicones de 630 pares de bases en todos los carriles con DNA de micobacteria, un
5 amplificado de 255 pb en la muestra clínica de *M. tuberculosis* y su ausencia en la muestra de *M. bovis*. El marcador de peso molecular utilizado es Gel Pilot 1 Kb Plus (Qiagen).

Ejemplo 2. Análisis de muestras clínicas de expectoración y tejido ganglionar.

10 A manera de ejemplo, a continuación se muestra el análisis de muestras clínicas, mediante el uso simultáneo de los 6 oligonucleótidos de la presente invención. Las muestras clínicas de expectoración (individuo No. 1) y de tejido ganglionar (individuo No. 2) de pacientes con signos claros de tuberculosis, fueron recolectadas y procesadas
15 como se describe previamente en la estandarización de la técnica. El DNA de la muestras se analizaron por la técnica de PCR utilizando el conjunto de iniciadores. Como se observa en la figura número 10 (carril 3) la muestra de DNA del individuo No. 1 identifica la muestra dentro del género *Mycobacterium*, y del Complejo *Mycobacterium tuberculosis*, evidenciado por los productos de PCR de 630 pb y 137
20

pb, y la ausencia del producto de 255 pb, específicos para la identificación del gen RD4, evidenciado la presencia de la especie *M. bovis*. Una muestra de DNA de *M. avium* se analizó con el conjunto de iniciadores, presentando la banda correspondiente al gen 16S rDNA del género *Mycobacterium* (carril 4). Por último, se observa el patrón de bandeo de la muestra que corresponde al tejido ganglionar (individuo No. 2). Tres productos de 630, 255, y 137 pb amplifican con la PCR (carril 5), demostrando que la muestra pertenece a un individuo con infección de *Mycobacterium tuberculosis*.

10 Dicha Figura 10 representa un gel de agarosa al 2%, en donde se muestran los pares de oligonucleótidos generables a partir de las SEC ID NO. 1, 2, 3, 4, 5 y 6 útiles para la identificación de *Mycobacterium*. En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular. El carril marcado como 2 es control negativo solo agua bidestilada sin mezcla de reacción, carril 3 DNA de muestra de expectoración (individuo No. 1) que presenta dos bandas de 630 y 137 pb; carril 4 DNA *M. avium*; carril 5 DNA muestra clínica ganglionar, se observan amplicones de 630 pb, 255 pb y 137 pb en la muestra. El marcador de peso molecular utilizado es Gel Pilot 1 Kb Plus (Qiagen).

Puesto que se pueden hacer varios cambios a la materia ejemplificada anteriormente sin apartarse del alcance de la invención, se pretende que todos los asuntos contenidos en la descripción anteriormente dada y mostrada en las figuras acompañantes deben interpretarse

5 como ilustrativos y no en un sentido limitante.

NOVEDAD DE LA INVENCION

REIVINDICACIONES

1.- Un método *in vitro* para la identificación específica de
5 *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium*
Complex, caracterizado porque comprende los pasos de: a) amplificar
fragmentos de ADN a partir de una muestra biológica mediante PCR
con los oligonucleótidos de las secuencias SEQ ID No. 1, SEQ. ID. No. 2,
SEQ. ID. No.3, SEQ. ID. No. 4, SEQ. ID. No. 5 y SEQ. ID. No. 6, b) identificar
10 los fragmentos de ADN amplificados, en donde en el paso a) dichos
oligonucleótidos son utilizados de manera simultánea.

2.- El método de conformidad con la reivindicación 1, en
donde la muestra biológica es derivada de un sujeto en estudio.

3.- El método de conformidad con la reivindicación 2, en
15 donde el sujeto en estudio es un animal mamífero.

4.- El método de conformidad con la reivindicación 3, en
donde el sujeto en estudio es un humano.

5.- El método de conformidad con la reivindicación 1, en
donde la muestra biológica se selecciona de cualquier tipo de muestra
20 que contenga ADN.

6.- Un kit para la identificación específica de *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium Complex*, caracterizado porque comprende los oligonucleótidos de las SEQ ID No. 1, SEQ. ID. No. 2, SEQ. ID. No.3, SEQ. ID. No. 4, SEQ. ID. No. 5 y
5 SEQ. ID. No. 6.

7.- El kit de conformidad con la reivindicación 6, caracterizado además porque comprende al menos una muestra de ADN genómico de *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium Complex* (control positivo) y al menos una muestra
10 de ADN genómico de al menos una especie filogenéticamente no relacionada con *C. glabrata* (control negativo).

8.- El uso de los oligonucleótidos de las secuencias SEQ ID No. 1, SEQ. ID. No. 2, SEQ. ID. No.3, SEQ. ID. No. 4, SEQ. ID. No. 5 y SEQ. ID. No. 6, para la identificación específica de *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium Complex*, en
15 donde dichos oligonucleótidos se utilizan de manera simultánea.

RESUMEN DE LA INVENCION

En la presente invención se describe y reclama un método *in vitro* para la identificación específica de *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium Complex*, de manera
5 simultánea mediante PCR multiplex y el kit de diagnóstico que lo contiene, mediante el uso de los oligonucleótidos descritos en las SEQ ID No. 1, SEQ. ID. No. 2, SEQ. ID. No.3, SEQ. ID. No. 4, SEQ. ID. No. 5 y SEQ. ID. No. 6.

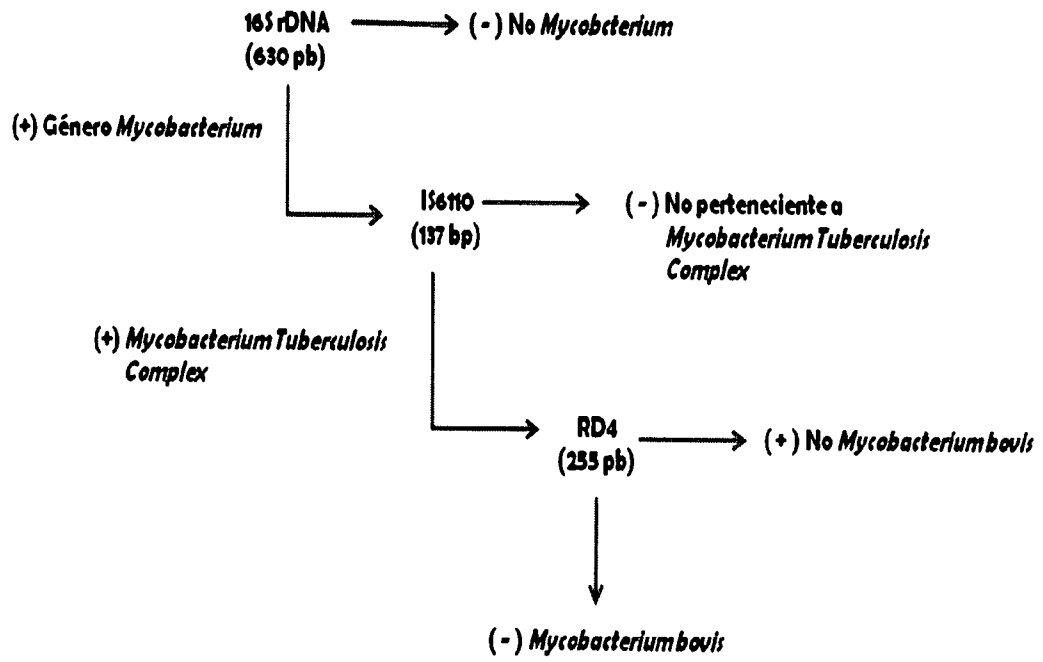


FIGURA 1

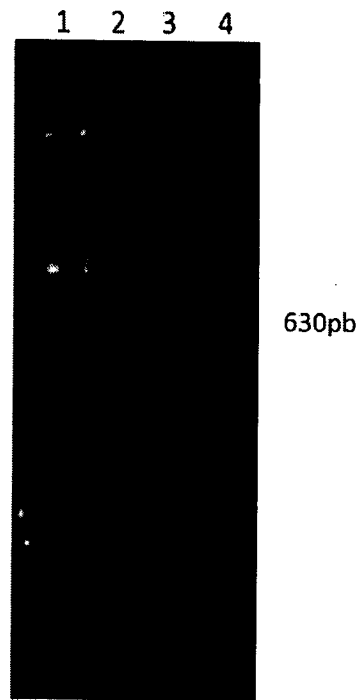


FIGURA 2

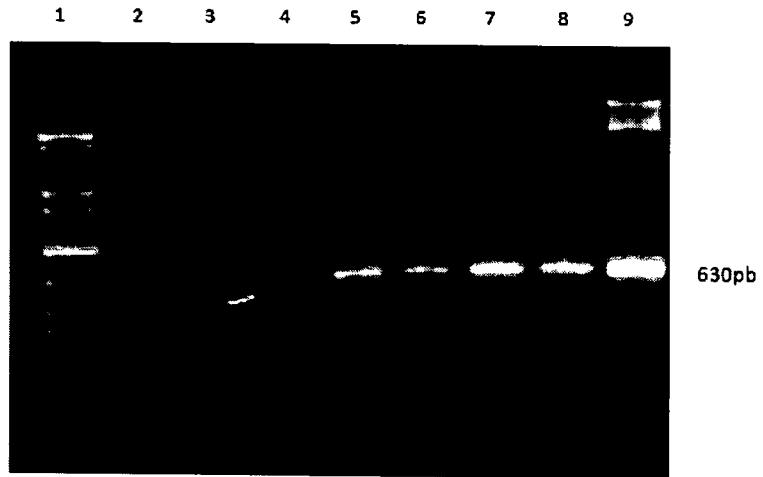


FIGURA 3

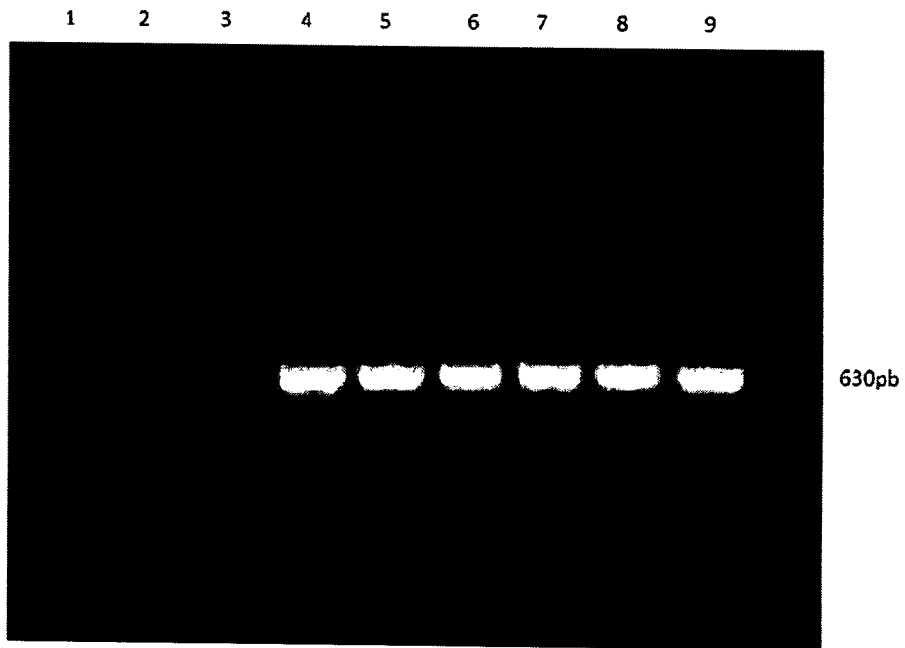


FIGURA 4

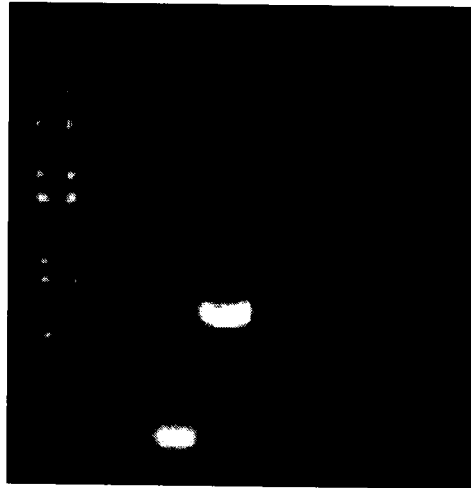


FIGURA 5

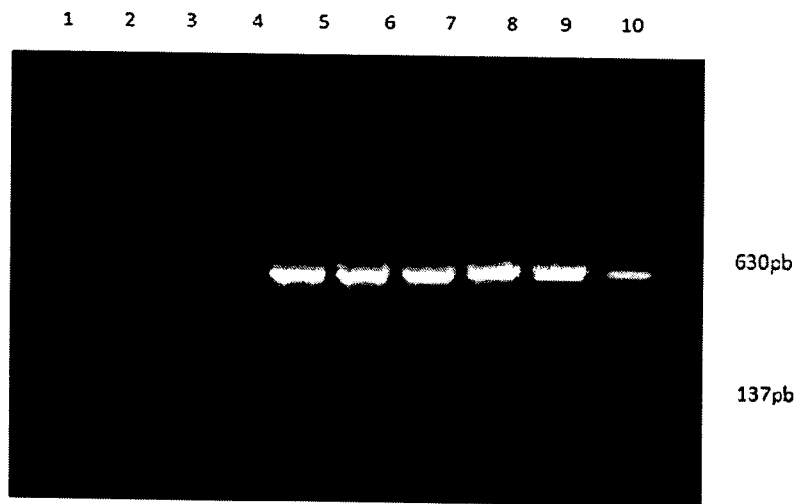


FIGURA 6



FIGURA 7

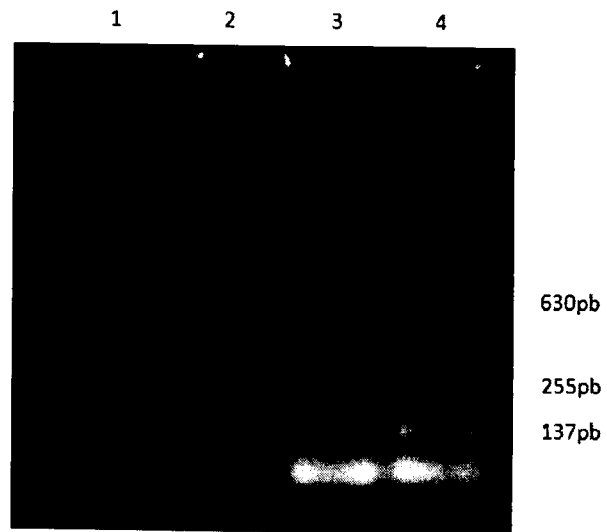


FIGURA 8

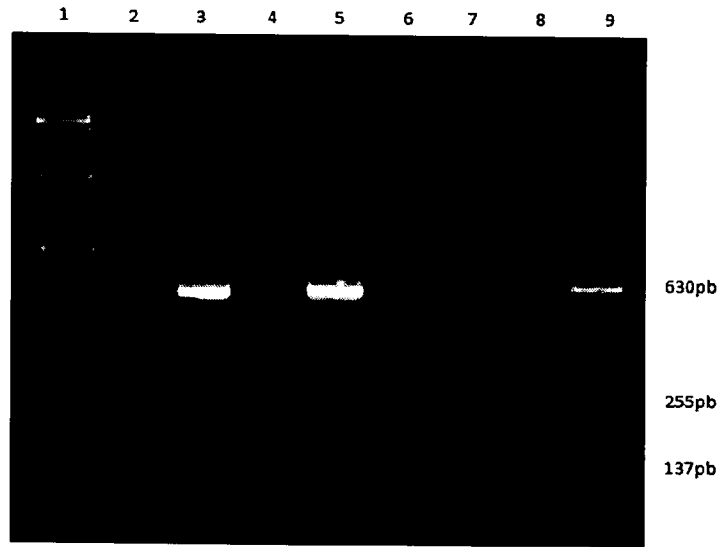


FIGURA 9

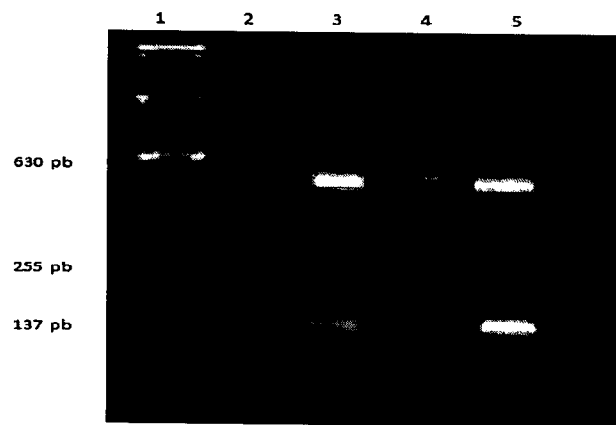


FIGURA 10

LISTADO DE SECUENCIAS

- (1) INFORMACION GENERAL
- (i) SOLICITANTES: Ikuri Alvarez Maya, Rubén Hipólito López Revilla y José Alberto Tlacuilo Parra
 - (ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: METODO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS, MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMPLEX Y MYCOBACTERIUM BOVIS EN UNA MUESTRA BIOLÓGICA, Y USO DE OLIGONUCLEOTIDOS ESPECIFICOS.
 - (iii) CAUSAHABIENTES: Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C.; Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., e Instituto Mexicano del Seguro Social.
 - (iv) NUMERO DE SECUENCIAS 6
 - (v) FORMA QUE PUEDE SER LEIDA EN COMPUTADORA: PatentIn Ver. 2.0
- (2) INFORMACION PARA LA SEQ. ID NO.1
- (i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 - (A) LONGITUD: 21 pb
 - (B) TIPO: ADN
 - (C) TIPO DE CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGIA: lineal
 - (ii) TIPO DE MOLECULA: ácido nucleico
 - (A) DESCRIPCION: ADN genómico
 - (vi) FUENTE ORIGINAL:
 - (A) ORGANISMO: Mycobacterium tuberculosis
 - (ix) CARACTERISTICAS: gen
 - (A) NOMBRE/CLAVE: **GU142932.1 region V2 Ribosomal 16 S**
 - (B) LOCALIZACION: cromosoma
 - (xi) DESCRIPCION DE LA SEQ ID NO: 1
 ggaaactggg tctaataccg g 21
- (2) INFORMACION PARA LA SEQ. ID NO.2
- (i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 - (A) LONGITUD: 25 pb
 - (B) TIPO: ADN
 - (C) TIPO DE CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGIA: lineal
 - (ii) TIPO DE MOLECULA: ácido nucleico
 - (A) DESCRIPCION: ADN genómico
 - (vi) FUENTE ORIGINAL:
 - (A) ORGANISMO: Mycobacterium tuberculosis
 - (ix) CARACTERISTICAS: gen
 - (A) NOMBRE/CLAVE: **GU142932.1 region V5 Ribosomal 16 S**

(B) LOCALIZACION: cromosoma

(xi) DESCRIPCION DE LA SEQ ID NO: 2
gatcccaagg aaggaaaccc acacc

25

(2) INFORMACION PARA LA SEQ. ID NO.3

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 21 pb
- (B) TIPO: ADN
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ácido nucleico

(A) DESCRIPCION: ADN genómico

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: Mycobacterium tuberculosis complex

(ix) CARACTERISTICAS: gen

(A) NOMBRE/CLAVE: **IS6110**

(B) LOCALIZACION: cromosoma

(xi) DESCRIPCION DE LA SEQ ID NO: 3
ggttcatcga ggaggtaccc g

21

(2) INFORMACION PARA LA SEQ. ID NO.4

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 21 pb
- (B) TIPO: ADN
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ácido nucleico

(A) DESCRIPCION: ADN genómico

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: Mycobacterium tuberculosis complex

(ix) CARACTERISTICAS: gen

(A) NOMBRE/CLAVE: **IS6110**

(B) LOCALIZACION: cromosoma

(xi) DESCRIPCION DE LA SEQ ID NO: 4
cgcgagcca acaccaagta g

21

(2) INFORMACION PARA LA SEQ. ID NO.5

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 21 pb
- (B) TIPO: ADN
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ácido nucleico

- (A) DESCRIPCION: ADN genómico
- (vi) FUENTE ORIGINAL:
 - (A) ORGANISMO: Mycobacterium bovis
- (ix) CARACTERISTICAS: gen
 - (A) NOMBRE/CLAVE: **RD4**
 - (B) LOCALIZACION: cromosoma
- (xi) DESCRIPCION DE LA SEQ ID NO: 5

atgagcagca aagcgcgac g

21

- (2) INFORMACION PARA LA SEQ. ID NO.6
- (i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 - (A) LONGITUD: 21 pb
 - (B) TIPO: ADN
 - (C) TIPO DE CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGIA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLECULA: ácido nucleico
 - (A) DESCRIPCION: ADN genómico
- (vi) FUENTE ORIGINAL:
 - (A) ORGANISMO: Mycobacterium bovis
- (ix) CARACTERISTICAS: gen
 - (A) NOMBRE/CLAVE: **RD4**
 - (B) LOCALIZACION: cromosoma
- (xi) DESCRIPCION DE LA SEQ ID NO: 6

accttcgacg acgacattct g

21