

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 637 589**

51 Int. Cl.:

C12N 1/06 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.05.2011 PCT/EP2011/002303**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.11.2011 WO11144304**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.05.2011 E 11718666 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.07.2017 EP 2571976**

54 Título: **Solución reguladora de lisis de aplicación universal y métodos de procedimiento para la lisis de muestras corporales**

30 Prioridad:

17.05.2010 EP 10005128

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

13.10.2017

73 Titular/es:

**CURETIS GMBH (100.0%)
Max-Eyth-Strasse 42
71088 Holzgerlingen, DE**

72 Inventor/es:

**KLEIN, MATTHIAS;
LÜDKE, GERD y
BOOS, ANDREAS**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 637 589 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Solución reguladora de lisis de aplicación universal y métodos de procedimiento para la lisis de muestras corporales

Campo técnico de la invención

5 La invención se refiere al uso de una solución reguladora de aplicación universal para el procedimiento de una muestra respiratoria, en el que el procedimiento comprende lisis y licuefacción de dicha muestra respiratoria y un método de procedimiento para la lisis y licuefacción de una muestra respiratoria que es relevante para el diagnóstico de enfermedades respiratorias. Dicha muestra respiratoria se selecciona del grupo consistente en esputo, pus de la cavidad paranasal, secreción bronquial, secreción traqueal, secreción endotraqueal, aspirado bronquial, aspirado traqueal, aspirado endotraqueal, lavado bronquial, lavado broncoalveolar, hisopado bronquial, hisopado nasofaríngeo, hisopado laríngeo y biopsia pulmonar.

Antecedentes de la invención

15 Las técnicas moleculares, en particular los análisis de ácidos nucleicos ganan cada vez más importancia en el campo del diagnóstico. En particular, los diagnósticos moleculares en el campo de las enfermedades respiratorias, tales como neumonía o tuberculosis, a menudo requieren el análisis de muestras corporales tales como fluidos corporales que son muy diversos en su apariencia, por ejemplo, secreciones de sangre, esputo y traqueal. Hasta la fecha, cada tipo de muestra requiere una solución reguladora de lisis diferente, método de procedimiento y un procedimiento de lisis que a menudo no son transferibles a otros tipos de muestras. Hasta la fecha no se ha publicado ningún protocolo que abarque todos los tipos de muestras relevantes para el diagnóstico molecular de enfermedades respiratorias, por ejemplo, neumonía. De este modo, actualmente no es posible utilizar un protocolo de rutina estandarizado y fácil de usar para todos los tipos de muestras relevantes para el diagnóstico de pacientes con neumonía. De este modo, se desean soluciones reguladoras de lisis y métodos de procedimiento que son de aplicación universal a una amplia variedad de muestras corporales, en particular, muestras que son relevantes para el diagnóstico de enfermedades respiratorias, tales como neumonía.

25 Es particularmente importante que los pacientes con infecciones agudas graves de las vías respiratorias identifiquen rápidamente patógenos causantes y factores de riesgo concomitantes, tales como resistencias a fármacos, para permitir un cambio de la terapia antibiótica de banda ancha inicial a una terapia personalizada dirigida específicamente a patógenos causantes con sus resistencias a los fármacos identificados. Las directrices internacionales para los subtipos de neumonía grave, tal como la neumonía adquirida en el hospital, adquirida por el ventilador o asociada al cuidado de la salud, se recomiendan fuertemente la identificación de ciertos patógenos de riesgo (por ejemplo, *Pseudomonas aeruginosa*) o factores de riesgo para las resistencias a múltiples fármacos (por ejemplo, mecA) que tienen un impacto significativo en el diseño del régimen de antibióticos.

35 Los enfoques diagnósticos utilizados hasta la fecha para las enfermedades respiratorias, por ejemplo, radiografía de tórax, baciloscopia, examen físico, o pruebas de cultivo microbiano, por ejemplo, de cultivos de esputo, cultivos de muestras broncoscópicas, o hemocultivos, a menudo no son apropiados para identificar patógenos o factores de riesgo y/o tienen eficiencias muy bajas. De este modo, hasta la fecha, no existe un método de detección eficaz que esté apoyado por estudios clínicos validados para el diagnóstico de neumonía. Como consecuencia, las pautas de neumonía no recomiendan ningún método de diagnóstico como un método de referencia. Más bien, se utiliza una combinación de diferentes métodos de diagnóstico que cubren diferentes muestras, basándose en la experiencia y experiencia del médico que lo atiende. En este contexto, se utilizan varias muestras respiratorias, así como no respiratorias para el diagnóstico. Por ejemplo, los hemocultivos se utilizan como indicadores de bacteriemia o punciones pleurales como indicadores del empiema, lo que conduce a un alto riesgo de mortalidad para los pacientes con neumonía.

45 Por ejemplo, el documento US 2003/215845 A1 se refiere a la extracción selectiva de ADN a partir de grupos de células. El documento WO 2005/010186 A1 describe un método para el diagnóstico de la tuberculosis mediante baciloscopia, cultivo y reacción en cadena de la polimerasa usando muestras clínicas procesada y un kit de los mismos. El documento KR 20090110969 A describe una solución de soporte para el diagnóstico de tuberculosis y cáncer de pulmón.

50 Las muestras que son relevantes para el diagnóstico de enfermedades respiratorias son generalmente difíciles de manejar. Estas muestras abarcan esputo, pus, líquido pleural, aspirado gástrico, aspirado endotraqueal, aspirado transtraqueal, lavado broncoalveolar, hisopado laríngeo, hisopos nasofaríngeos y otros que son generalmente mezclas no homogéneas de muchos componentes diferentes de diferentes comportamientos químicos y físicos. Generalmente, tales muestras son altamente viscosas e incluso muestras del mismo tipo difieren enormemente en su composición. Sin embargo, la accesibilidad y la lisis de patógenos inflamatorios pueden ser menos eficientes si están atrapadas en un medio sólido y viscoso.

55 Todos los métodos de diagnóstico utilizados hasta ahora para detectar patógenos en muestras de las vías respiratorias requieren un procedimiento de muestras laborioso para descontaminación y licuefacción usando una combinación de enzimas tales como proteasas, lipasas, ADNasas o glicosidasas, detergentes, agentes caotrópicos,

agentes quelantes y agentes reductores, entre otros. Sin embargo, algunos de estos agentes tales como SDS son inhibidores conocidos de los métodos de amplificación y análisis de ácidos nucleicos. Además, debido al alto riesgo de infección, cualquier procedimiento de muestras sospechosas de tuberculosis requiere un ambiente S3 con flujo laminar certificado y medidas de protección extensivas para excluir cualquier exposición del personal a bacterias vivas. De este modo, para pruebas moleculares sería ventajoso utilizar muestras corporales directamente para el diagnóstico de ácidos nucleicos y eludir los procedimientos de descontaminación y licuefacción intensivos de manipulación.

De este modo, el diagnóstico molecular en las enfermedades respiratorias es actualmente largo, laborioso, propenso a errores y asociado con un alto riesgo de contaminación. Además, dado que cada tipo de muestra requiere un procedimiento de manipulación diferente, no es posible el procedimiento en un entorno de alto rendimiento.

Por lo tanto, el objetivo de la presente invención es proporcionar una solución reguladora de lisis y un método de procedimiento simple que sean de aplicación universal para la lisis de una variedad de diferentes tipos de muestras, tales como muestras corporales relevantes para el diagnóstico de enfermedades respiratorias, y que reducen la necesidad de una manipulación intensiva de las muestras y, de este modo, reducen el riesgo de contaminación y permiten el diagnóstico molecular en un entorno de alto rendimiento.

Los presentes inventores han encontrado sorprendentemente que una solución reguladora de lisis que contiene como único ingrediente activo un agente caotrópico, un agente reductor y una proteasa es de aplicación universal para la lisis de muestras corporales, en particular, de muestras corporales que son relevantes para el diagnóstico de enfermedades respiratorias. De este modo, la solución reguladora de lisis descrita en este documento es de aplicación universal, por ejemplo, para la lisis de jugos gástricos y muestras de esputo o secreción traqueal, que son muy diferentes en sus composiciones.

Además, los presentes inventores han desarrollado un método de procedimiento, que es fácil y seguro de llevar a cabo, de aplicación universal, automatizable, aplicable en un entorno de alto rendimiento, y que no requiere ningún pretratamiento de descontaminación o licuefacción demorado y laborioso de las muestras. En particular, el método de procedimiento de la presente invención permite realizar el procedimiento completo de lisis de una muestra corporal en un solo tubo de reacción, sin necesidad de centrifugación y transferencia de muestras o etapas de pipeteado, reduciendo sustancialmente el trabajo requerido y el riesgo de contaminación. El lisado resultante del método de procedimiento de acuerdo con la presente invención se puede transferir directamente a procedimientos de aislamiento de ácidos nucleicos, por ejemplo, basados en membranas de sílica, perlas de sílica o tecnología de perlas magnéticas, sin necesidad de otros métodos de purificación de ácidos nucleicos tales como extracción o precipitación con fenol-cloroformo. De este modo, los lisados son, por ejemplo, apropiados para la transferencia directa a una columna de aislamiento de ADN QiaAmp™ sin obstrucción significativa de la columna, lo que no se esperaba, en particular, para las muestras altamente viscosas de las vías respiratorias.

Resumen de la invención

En un aspecto, la presente invención proporciona el uso de una solución reguladora que comprende (i) al menos un agente caotrópico, (ii) al menos un agente reductor, y (iii) al menos una enzima proteolítica para el procedimiento de una muestra respiratoria, en la que el procedimiento comprende la lisis y licuefacción de dicha muestra respiratoria, y en la que dicha muestra respiratoria se selecciona del grupo que consiste en esputo, pus de la cavidad paranasal, secreción bronquial, secreción traqueal, secreción endotraqueal, aspirado bronquial, aspirado traqueal, aspirado endotraqueal, lavado bronquial, lavado broncoalveolar, hisopado bronquial, hisopado nasofaríngeo, hisopado laríngeo y biopsia pulmonar. Preferiblemente, la solución reguladora comprende además perlas. Preferiblemente, la solución reguladora es de aplicación universal para el procedimiento de muestras respiratorias que son relevantes para el diagnóstico de una enfermedad respiratoria.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método de procedimiento de una muestra respiratoria, en la que el procedimiento comprende la lisis y licuefacción de dicha muestra respiratoria, dicho método que comprende la etapa de (i) poner en contacto la muestra respiratoria que se va a tratar con al menos un agente caotrópico, al menos un agente reductor, y al menos una enzima proteolítica, y la mezcla de la muestra respiratoria, el al menos un agente caotrópico, el al menos un agente reductor y la al menos una enzima proteolítica, en la que la muestra respiratoria se selecciona del grupo que consiste en esputo, pus de la cavidad paranasal, secreción bronquial, secreción traqueal, secreción endotraqueal, aspirado bronquial, aspirado traqueal, aspirado endotraqueal, lavado bronquial, lavado broncoalveolar, hisopado bronquial, hisopado nasofaríngeo, hisopado laríngeo y biopsia pulmonar. Preferiblemente, el método comprende además la etapa de (ii) calentar la mezcla a una primera temperatura, preferiblemente a una temperatura a la que la enzima proteolítica es activa. Preferiblemente, el método comprende además la etapa de (iii) calentar la mezcla a una segunda temperatura, preferiblemente a al menos 80°C. Preferiblemente, el método comprende además la etapa de (iv) molienda con perlas de la mezcla. En una realización preferida, la molienda con perlas de la etapa (iv) se realiza en paralelo a la etapa de calentamiento (iii). En una realización preferida, las etapas (ii) a (iv), preferiblemente las etapas (i)(b) a (iv) del método de acuerdo con la presente invención, se llevan a cabo en un procedimiento automatizado. En una realización preferida, el método comprende además la etapa de (v) aislar un ácido nucleico de la mezcla.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método de análisis de una muestra respiratoria que comprende el procedimiento de la muestra respiratoria de acuerdo con el método de la presente invención para el procedimiento de una muestra respiratoria y (vi) aplicar la mezcla a un método de amplificación/análisis de ácido nucleico.

- 5 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método de detección de la presencia de un patógeno en una muestra respiratoria que comprende el procedimiento de la muestra respiratoria de acuerdo con el método de la presente invención para el procedimiento de una muestra respiratoria y (vi) aplicar la mezcla a un método de amplificación/análisis de ácido nucleico que es apropiado para la detección de dicho patógeno. Preferiblemente, dicho patógeno está asociado con una enfermedad respiratoria.
- 10 En otro aspecto, la presente invención proporciona un método de diagnóstico de una enfermedad respiratoria, tal como neumonía, tuberculosis, bronquitis, o infecciones patógenas durante la fibrosis quística o enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), o un tumor del sistema respiratorio, en un sujeto que comprende el procedimiento de una muestra respiratoria de acuerdo con el método de la presente invención para el procedimiento de una muestra respiratoria y (vi) aplicar la mezcla a un método que es apropiado para diagnosticar la enfermedad respiratoria.
- 15

Preferiblemente, los métodos de acuerdo con la presente invención son de aplicación universal a diferentes tipos de muestras respiratorias, preferiblemente a diferentes tipos de muestras respiratorias relevantes para el diagnóstico de una enfermedad respiratoria, y de este modo, los métodos de acuerdo con la presente invención preferiblemente son apropiados para ser aplicados en un entorno de alto rendimiento a una variedad de diferentes tipos de muestras.

- 20 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método de procedimiento de al menos dos muestras respiratorias que comprenden el procedimiento de cada una de las al menos dos muestras respiratorias de acuerdo con el método de la presente invención para el procedimiento de una muestra respiratoria, en la que las al menos dos muestras respiratorias son diferentes tipos de muestras respiratorias.

Breve descripción de los dibujos

- 25 Figura 1: Ejemplo de un método de lisis manual que utiliza la solución reguladora de lisis de acuerdo con la invención.

El ejemplo A del procedimiento es un procedimiento manual que utiliza un agitador tipo vórtex estándar para mezclar a 2500 rpm (velocidad máxima estándar para un agitador tipo vórtex IKA, los dispositivos de otros proveedores pueden variar) durante 30 segundos (otras veces podría funcionar también), bloques de calentamiento precalentados y un dispositivo de molienda capaz de alcanzar una velocidad de molienda de aprox. 100 g (otras velocidades pueden funcionar también, y la velocidad puede variar para otros dispositivos con geometría diferente). Obsérvese que para todas las etapas de mezcla/molienda los tubos se retiran del bloque de calentamiento y se procesan a temperatura ambiente.

30

- 35 Figura 2: Ejemplo de un método de lisis automatizado que utiliza la solución reguladora de lisis de acuerdo con la invención.

El ejemplo B de procedimiento es un procedimiento automatizado que utiliza un dispositivo de molienda con perlas que realiza todas las etapas del procedimiento (mezcla, calentamiento, molienda). Las velocidades de molienda se relacionan con fuerzas entre 50-100 g dependiendo de las geometrías del dispositivo. A medida que los tubos se calientan junto con las cámaras a las temperaturas objetivo, en este ejemplo se incluyen mayores velocidades de rampa, aún, los tiempos de rampa no son críticos y también pueden ser considerablemente más cortas.

40

Figura 3: Composición de muestras de diferentes tipos de muestras corporales.

Se puntuaron 76 muestras de diferentes orígenes (muestras respiratorias y otras relevantes, como puntas y drenajes) para determinar la viscosidad, la sangre, y el contenido de sedimentos para describir las diferencias de los tipos de muestra basándose en una puntuación promedio.

- 45 Figura 4: Realización de procedimientos de lisis con diferentes tipos de muestras corporales.

El número de muestras procesadas para cada tipo de muestra se indica entre paréntesis. De cada tipo de muestra, incluida la sangre, se seleccionaron muestras de referencia para cubrir toda la gama de muestras pertinentes para enfermedades respiratorias (total: 12 muestras). Cada una de estas muestras se sometió a tres protocolos de lisis diferentes: (a) protocolo de lisis completo manual como se muestra en la figura 1 y descrito en el ejemplo 1 (protocolo de lisis completo), (b) protocolo de lisis completo sin adición de proteinasa K, (c) protocolo de lisis sin segunda etapa de calentamiento (96°C), en su lugar las muestras se incubaron a temperatura ambiente. Todas las muestras se han sometido a una etapa final de molienda con perlas de cinco minutos como se describe en el ejemplo 1 (protocolo de lisis completo), el lisado se transfirió entonces, se mezcló con etanol y se aplicó a una columna de membrana de sílica (QiaAmp™, Qiagen). Las eficiencias de lisis se puntuaron tras la digestión con proteinasa K (primera etapa de calentamiento), la segunda etapa de calentamiento (96°C) y la molienda con perlas.

50

55

Además, se controló la turbidez de los sobrenadantes. El flujo directo después de la aplicación del lisado a las membranas de sílica se controló usando una centrifuga a velocidad reducida (4000 rpm en lugar de 8000 rpm recomendadas). Se examinó la membrana de sílica para detectar colorantes o componentes de muestra restantes que podrían indicar una lisis insuficiente.

5 Figura 5: Ejemplos típicos de muestras de pacientes lisadas usando el método de lisis manual de acuerdo con la presente invención.

Las muestras lisadas son también típicas para el protocolo automatizado.

A/B: esputos, C: secreción traqueal.

10 Figura 6: Impacto de la molienda con perlas y el calentamiento en la lisis de las muestras de secreción traqueal (sin digestión de proteinasa K).

15 En una primera etapa, las muestras se incubaron a 96°C durante 15 minutos directamente después de la adición de la solución reguladora de lisis y de la mezcla corta. La molienda con perlas se realizó durante 5 minutos ya sea durante la etapa de calentamiento (96°C) o a temperatura ambiente después de completar la etapa de incubación a 96°C [M]. El progreso de la lisis se controló a lo largo del tiempo basándose en la puntuación de lisis (puntuación de lisis 0: no o sólo insuficientemente lisada, grupos de mucosas todavía presentes, puntuación de lisis 1: lisado parcial, agrupaciones menores todavía presentes, puntuación de lisis 2: casi completamente lisado, aún algunos trozos sin lisar presentes; puntuación de lisis 3: lisado completo). Los sobrenadantes lisados se aplicaron a membranas de sílica esencialmente de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El flujo directo se controló al aumentar las fuerzas centrifugas comenzando a 4000 rpm. Las figuras 6A y 6B muestran cada una dos ejemplos de muestras de secreción traqueal que reflejan la variabilidad de muestras del mismo tipo.

20 Figura 7: Impacto de la digestión de proteinasa K en la lisis de muestras de secreción traqueal.

25 El protocolo de lisis se realizó como se describe para la figura 6 con la adición de una digestión de proteinasa K antes de la etapa de calentamiento (96°C) usando la misma muestra que en la figura 6. Para la digestión de proteinasa K, se adicionaron 20 µl de proteinasa K Qiagen (20 mg/ml) a las muestras con solución reguladora de lisis y las muestras se incubaron a 56°C, durante 10 minutos. La eficacia de la lisis se puntuó como se describe para la figura 6. Las figuras 7A y 7B muestran cada una dos ejemplos de muestras de secreción traqueal.

Figura 8: Calidad del ADN de los ADN purificados de diferentes tipos de muestras corporales.

30 Siete muestras de pacientes de diferentes orígenes se reforzaron con *Pseudomonas aeruginosa* (20000 patógenos/ml = 4400 patógenos/220 µl de muestra utilizada) y se lisaron usando el protocolo manual como se describe en la figura 1 y el ejemplo 1 (protocolo de lisis completo). El ADN se purificó con el Kit de sangre de ADN QuiaAmp usando una centrifuga y se eluyó en 200 µl de agua. La calidad del ADN aislado purificado a partir de muestras reforzadas se controló mediante análisis espectral del eluido diluido 5 veces (220-320 nm). BAL: lavado broncoalveolar.

Figura 9: Prueba de inhibición de PCR de muestras seleccionadas.

35 La copurificación putativa de los inhibidores de PCR se probó mediante una prueba de inhibición de PCR para los eluatos descritos en la figura 8. Para pruebas de inhibición, se adicionan 3 µl de un eluato de ADN a una PCR de 30 µl que contiene una plantilla no relacionada con una mezcla de cebadores correspondiente. En ausencia de cualquier efecto inhibidor, estos cebadores generan varios amplicones de molaridades conocidas. Una disminución significativa de molaridades de amplicón indicaría inhibición. Para los controles, se utilizaron eluatos generados a partir de solución salina regulada con fosfato (PBS). Para evaluar la eficacia de PCR y determinar la presencia de inhibidores de PCR, se han comparado las molaridades de los amplicones generados en presencia del ADN aislado de los lisados con las molaridades de los amplicones generados por los PCR de control (control: n = 4).

Figura 10: Eficacia de PCR del ADN aislado (PCR de *P. aeruginosa*).

45 Las PCR específicas para *P. aeruginosa* se han realizado usando ADN aislado de lisados de diferentes muestras corporales como se describe en la figura 8. La figura 10 muestra las molaridades de amplicón y los rendimientos de ADN de las diferentes PCR.

Figura 11: Resultados de PCR de muestras de pacientes procesadas de acuerdo con el método de la presente invención.

50 Se han procesado 27 muestras de pacientes usando el protocolo de lisis manual como se describe en la figura 1 y el ejemplo 1 (protocolo de lisis completo). Se analizó el ADN purificado con membrana de sílica con PCR múltiple que detecta patógenos indicativos de enfermedades respiratorias *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, y especie

Streptococcus como indicador de flora huésped). Las molaridades de amplicón se han determinado usando un bioanalizador Agilent.

Figura 12: Comparación de los resultados de PCR con datos de pruebas de cultivo microbiológico.

5 Los resultados de la PCR mostrados en la figura 11 se han comparado con los datos derivados de las pruebas de cultivo microbiológico realizadas para las mismas muestras que se muestran en la figura 11. Para cinco muestras se identificó un género patógeno mediante cultivo microbiológico, sin embargo, para la mayoría de las muestras el cultivo microbiológico no dio lugar a la identificación de los patógenos en un nivel de género. Los resultados obtenidos por los ensayos de cultivo microbiológico han sido confirmados por la prueba de PCR. Los cebadores de *Haemophilus* utilizados en esta prueba no discriminan entre las especies *influenzae* y *parainfluenzae*. En general, la PCR permitió la detección e identificación de patógenos en más muestras que las pruebas de cultivo microbiológico.

Figura 13: Comparación de lisis manual y automatizada con muestras clínicas.

15 Se ha desarrollado un dispositivo para la automatización completa del procedimiento de lisis y se probó el rendimiento de acuerdo con el "ejemplo B de procedimiento" (Figura 2 y Ejemplo 1, protocolo de lisis completo, procedimiento automatizado) y se comparó con el protocolo de lisis manual (Figura 1 y Ejemplo 1, protocolo de lisis completo, procedimiento manual) usando muestras clínicas que han sido probadas positivas mediante pruebas de cultivo microbiológico como se indica en el panel inferior. Se han seleccionado secreciones traqueales con altas viscosidades para esta prueba. El ADN aislado de los lisados usando membranas de sílica, se ha aplicado a la PCR triple usando cebadores específicos para *Pseudomonas*-, *Staphylococcus*-, y *Candida*-.

Figura 14: Comparación de lisis manual y automatizada usando muestras clínicas reforzadas.

20 Para excluir cualquier efecto de congelación y descongelación de la muestra en la lisis de patógenos, se reforzó un segundo conjunto de muestras con *Pseudomonas aeruginosa* (gramnegativo) y *Staphylococcus aureus* (grampositivo) a 20000 patógenos/ml y se procesaron con el protocolo manual o automatizado. El aislamiento del ADN y la PCR se ha realizado como se describe en la figura 13.

Descripción detallada de la invención

25 Aunque la presente invención se describe con detalle más adelante, se debe entender que esta invención no se limita a las metodologías, protocolos y reactivos particulares descritos en este documento, ya que pueden variar. También se debe entender que la terminología usada en este documento es con el propósito de describir únicamente realizaciones particulares y no pretende limitar el alcance de la presente invención que estará limitado solamente por las reivindicaciones adjuntas. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen los mismos significados que comúnmente entienden por un experto en el arte.

35 A continuación, se describirán los elementos de la presente invención. Estos elementos se enumeran con realizaciones específicas, sin embargo, se debe entender que se pueden combinar de cualquier manera y en cualquier número para crear realizaciones adicionales. Los ejemplos descritos de manera diferente y las realizaciones preferidas no deben ser interpretados como limitando la presente invención solamente a las realizaciones explícitamente descritas. Esta descripción se debe entender como soporte y abarca realizaciones que combinan las realizaciones explícitamente descritas con cualquier número de los elementos divulgados y/o preferidos. Además, cualquier permutación y combinación de todos los elementos descritos en esta solicitud se debe considerar divulgada por la descripción de la presente solicitud a menos que el contexto indique lo contrario. Por ejemplo, si en una realización preferida el agente caotrópico de la solución reguladora de lisis descrita en este documento es clorhidrato de guanidinio y en otra realización preferida el agente reductor de la solución reguladora de lisis descrita en este documento es ditiotreitol, es una realización preferida que el clorhidrato de guanidinio y el ditiotreitol están presentes en la solución reguladora de lisis descrita en este documento.

45 Preferiblemente, los términos usados en este documento se definen como se describe en "A multilingual glossary of biotechnological terms: (IUPAC Recommendations)", H.G.W. Leuenberger, B. Nagel, and H. Kölbl, Eds., Helvetica Chimica Acta, CH-4010 Basilea, Suiza, (1995).

50 La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, métodos convencionales de química, bioquímica y técnicas de ADN recombinante que se explican en la bibliografía en el campo (véase, por ejemplo, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, J. Sambrook et al. eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 1989).

55 A lo largo de esta memoria descriptiva y de las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto lo exija de otro modo, la palabra "comprenden" y las variaciones, tales como "comprende" y "que comprende", se entenderá que implica la inclusión de un miembro, un número entero o un escalón o grupo de miembros, enteros o etapas, pero no la exclusión de ningún otro miembro indicado, número entero o etapa o grupo de miembros, números enteros o etapas. El término "comprender" también abarca los términos "que consiste esencialmente en" y "que consiste en" a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Como se usa en esta memoria descriptiva y en las

reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el" incluyen referentes plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Definiciones

5 Un "solución reguladora de lisis" en el contexto de la presente invención es apropiado para la lisis de células con el fin de analizar el contenido de las células, tal como el análisis de los ácidos nucleicos contenidos en las células. Preferiblemente, la solución reguladora de lisis descrita en este documento es apropiada para la lisis de células de mamífero y/o células microbianas, tales como células bacterianas y de levadura. De este modo, la solución reguladora de lisis descrita en este documento es preferiblemente apropiada para la lisis de bacterias de una familia seleccionada del grupo que consiste en *Mycobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Mycoplasmataceae*,
10 *Chlamydiaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcaceae*, *Streptococcaceae*, *Xantomonadaceae*, *Moraxellaceae*, *Legionellaceae*, *Burkholderiaceae*, *Corynebacteriaceae*, *Neisseriaceae*, *Bacteroides*, y *Pasteurellaceae*, y para la lisis de levaduras de una familia seleccionada del grupo que consiste en *Saccharomycetaceae*, *Sporidiobolaceae*, *Trichocomaceae*, y *Pneumocystidaceae*. Las propiedades líticas de la solución reguladora de lisis descrita en este documento pueden requerir etapas de procedimiento tales como calentamiento de la muestra que se va a lisar en dicha solución reguladora de lisis o molienda con perlas. Las etapas de procedimiento pueden depender del tipo de células que se va a lisar y del tipo de muestra en las que están contenidas. Preferiblemente, la solución reguladora de lisis descrita en este documento es una solución reguladora de lisis acuosa, esto es, una solución reguladora de lisis basada en agua. De este modo, una solución reguladora de lisis que, por ejemplo, consiste en (i) al menos un agente caotrópico, (ii) al menos un agente reductor, y (iii) al menos una enzima proteolítica significa que dicha
15 solución reguladora de lisis también puede contener agua y opcionalmente componentes de la solución reguladora, por ejemplo, para ajustar el pH de la solución reguladora de lisis.

El término "agente caotrópico" se refiere a un agente que altera la estructura tridimensional de macromoléculas tales como proteínas, ADN o ARN y las desnaturaliza. Los agentes caotrópicos interfieren con la estabilización de interacciones intramoleculares mediadas por fuerzas no covalentes tales como enlaces de hidrógeno, fuerzas de van der Waals, y efectos hidrófobos. Los iones caotrópicos son, por ejemplo, guanidinio, bario, tiocianato, yoduro y perclorato, según la denominada serie de Hofmeister (cationes: NH_4^+ > Rb^+ > K^+ > Na^+ > Cs^+ > Li^+ > Mg^{2+} > Ca^{2+} > Ba^{2+} > guanidinio; aniones: PO_4^{3-} > SO_4^{2-} > HPO_4^{2-} > acetato > citrato > tartrato > Cl^- > Br^- > NO_3^- > ClO_3^- > ClO_4^- > I^- > SCN^-). En la serie de Hofmeister, los cationes y aniones de la izquierda se dice que son "kosmotrópicos" (o anticautrópico) y aumentar la fuerza de las interacciones hidrófobas. Los iones de la derecha son "caotrópicos" y tienden a debilitar las interacciones hidrófobas. Para todos los aspectos de la invención, el agente caotrópico contiene al menos un catión de la serie de Hofmeister que está más a la derecha en la serie que el calcio o al menos un anión de la serie de Hofmeister que está más a la derecha en la serie que el anión clorato (ClO_3^-). Por ejemplo, el agente caotrópico en el contexto de la presente invención puede contener uno de los siguientes: bario, guanidinio, perclorato, yoduro, tiocianato o isotiocianato. Por ejemplo, el agente caotrópico en el contexto de todos los aspectos de la presente invención puede ser tiocianato de guanidinio, isotiocianato de guanidinio, clorhidrato de guanidinio, cloruro de guanidinio, tiocianato de álcali, isotiocianato de álcali, yoduro de álcali, o perclorato de álcali. En este contexto, el ion álcali es preferiblemente potasio o sodio.

Un "agente reductor" en el contexto de la presente invención es cualquier agente que sea capaz de romper un enlace disulfuro en o dentro de macromoléculas tales como proteínas. Para todos los aspectos de la presente invención, el agente reductor puede ser ditioneol (DTT), N-acetilcisteína (NALC), beta-mercaptoetanol, Tris(2-Carboxietil) fosfina (TCEP) o tiorredoxina. Preferiblemente, el agente reductor es DTT.

El término "enzima proteolítica" en el contexto de la presente invención se refiere a cualquier entidad que posea actividad proteolítica, esto es, que sea capaz de catalizar la hidrólisis de una proteína, preferiblemente la hidrólisis de un enlace peptídico. Preferiblemente, el término "enzima proteolítica" se refiere a una enzima que pertenece al grupo de enzimas con el número de la Comisión de Enzimas (número CE) EC 3.4, preferiblemente EC 3.4.21 o EC 3.4.22. Preferiblemente, la enzima proteolítica es una proteasa, preferiblemente una serina proteasa o una cisteína proteasa. Los términos "proteasa", "peptidasa" y "proteínasa" se usan indistintamente. Preferiblemente, la enzima proteolítica usada en la presente invención posee una amplia especificidad de sustrato. Preferiblemente, la enzima proteolítica es activa en presencia de uno o más agentes caotrópicos. Por ejemplo, se prefiere que la enzima proteolítica utilizada en la presente invención sea activa en presencia de tiocianato de guanidinio 400 mM, preferiblemente, 600 mM, preferiblemente 800 mM, preferiblemente 1 M, y/o en presencia de urea 2 M, preferiblemente 3 M, preferiblemente 4 M, preferiblemente 5 M, y/o en presencia de clorhidrato de guanidinio 1.5 M, preferiblemente 2 M, preferiblemente 4 M, preferiblemente 5 M. Preferiblemente, la enzima proteolítica usada en la presente invención es activa en presencia de uno o más agentes reductores. De este modo, se prefiere que la enzima proteolítica sea activa en presencia de DTT 10 mM, preferiblemente 20 mM, preferiblemente DTT 50 mM, preferiblemente DTT 80 mM, más preferiblemente DTT 100 mM. En una realización preferida particular, la enzima proteolítica es activa en presencia de aproximadamente DTT 20 mM. En el contexto de la presente invención, se considera que una enzima, tal como una enzima proteolítica, por ejemplo, una proteasa, está activa si la velocidad de reacción de la reacción catalizada por la enzima es al menos 10%, preferiblemente al menos 20%, preferiblemente al menos 30%, preferiblemente al menos 40%, preferiblemente al menos 50%, más preferiblemente

al menos 60%, más preferiblemente al menos 70%, e incluso más preferiblemente al menos 80% de la velocidad de reacción máxima de dicha enzima usando condiciones óptimas tales como condiciones de regulación y temperatura.

Ejemplos particularmente preferidos de enzimas proteolíticas usadas en la presente invención son proteinasa K (preferiblemente EC 3.4.21.64), subtilisina (preferiblemente EC 3.4.21.62), elastasa (preferiblemente EC 3.4.21.11, EC 3.4.21.36, EC 3.4.21.37, o EC 3.4.21.71), caspasa (preferiblemente EC 3.4.22.36). En una realización preferida particular, la enzima proteolítica es la proteinasa K, tal como la proteinasa K que se puede obtener de Qiagen (por ejemplo, 20 mg/ml, >600 mAU/ml, número de pedido 19131) o subtilisina. Una definición de unidad preferida de proteinasa K en el contexto de la presente invención es: 1 unidad es la actividad que es necesaria para liberar aminoácidos y péptidos folin-positivos que corresponden a 1 μmol de tirosina por minuto. Otra definición de unidad preferida de proteinasa K en el contexto de la presente invención es: 1 unidad hidrolizará hemoglobina desnaturada con urea para producir un equivalente en color de 1 μmol de tirosina por minuto a pH 7.5 a 37°C. Las unidades "unidad" y "mAU" (AU = unidad Anson) se usan indistintamente en este documento. El experto en la materia sabe muy bien cómo elegir diferentes enzimas proteolíticas para obtener una actividad similar.

En el contexto de la presente invención, el término "perlas" se refiere a partículas, que son preferiblemente de un tamaño en el intervalo de 200 μm a 2 mm, preferiblemente de 300 μm a 800 μm . Las perlas pueden presentar cualquier forma, por ejemplo, pueden tener forma de bola, forma de cubo, forma triangular, o pueden presentar cualquier forma irregular. Preferiblemente, las perlas están hechas de un material inerte sólido. De este modo, las perlas presentan preferiblemente una consistencia firme y preferiblemente no reaccionan químicamente con sustancias biológicas tales como proteínas o ácidos nucleicos en una extensión significativa. En realizaciones particularmente preferidas, las perlas no se unen a ácidos nucleicos en una extensión significativa. Preferiblemente, las perlas están hechas de vidrio, cerámica, plástico o metal tal como acero. El material de las perlas es más preferiblemente vidrio. Preferiblemente, el término "perlas", como se usa en la presente invención, no se refiere a perlas de sílica ni a ninguna perla utilizada para el aislamiento de ácido nucleico.

El término "lisis" o "reacción de lisis" se refiere a un procedimiento de lisis y se refiere preferiblemente a la lisis de una muestra corporal como se describe en este documento. En el contexto de todos los aspectos de la presente invención, una reacción de lisis comprende preferiblemente la provisión de una mezcla de reacción de lisis. Una "mezcla de reacción de lisis" en el contexto de la presente invención comprende preferiblemente una muestra, preferiblemente una muestra corporal, al menos un agente caotrópico, al menos un agente reductor y al menos una enzima proteolítica. Preferiblemente, la mezcla de reacción de lisis comprende además perlas como se describe en este documento. Por ejemplo, la mezcla de reacción de lisis puede ser una mezcla de la solución reguladora de lisis descrita en este documento y una muestra corporal o la mezcla de reacción de lisis puede ser una mezcla de la "composición de lisis premezclada" como se describe en este documento, una muestra corporal y al menos una enzima proteolítica. Preferiblemente, la naturaleza y la concentración del al menos un agente caotrópico y el al menos un agente reductor se eligen de tal manera que la al menos una enzima proteolítica sea activa en la mezcla de reacción de lisis. Preferiblemente, la naturaleza y concentración del agente caotrópico y/o la naturaleza y concentración del agente reductor y/o la naturaleza y concentración de la enzima proteolítica es tal que la licuefacción, preferiblemente la lisis, de la muestra corporal en la mezcla de reacción de lisis se logra. Preferiblemente, el al menos un agente caotrópico es como se describe en este documento, por ejemplo, en las definiciones y el primer aspecto de la presente invención, y preferiblemente está presente en la mezcla de reacción de lisis en una concentración en el intervalo de 0.1 M a 4 M, preferiblemente en el intervalo de 0.5 M a 3.5 M, más preferiblemente en el intervalo de 1.0 M a 3.0 M, más preferiblemente en el intervalo de 1.2 M a 2.6 M. Por ejemplo, el al menos un agente caotrópico, preferiblemente clorhidrato de guanidinio, puede estar presente en la mezcla de reacción de lisis en una concentración de 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 1.5, 1.75, 2.0, 2.25, 2.5, 2.75, 3.0, 3.25, 3.5, 3.75, o 4.0 M, más preferiblemente en una concentración de aproximadamente 2.0 ± 0.75 M. El experto en la materia reconocerá que la concentración óptima del agente caotrópico puede variar para variar los agentes caotrópicos, por ejemplo, dependiendo del tipo de muestra y/o de la enzima proteolítica. Por ejemplo, la concentración preferida de clorhidrato de guanidinio en la mezcla de reacción de lisis está en el intervalo de 1.0 a 3.0 M, preferiblemente 2.0 ± 0.75 M, mientras que la concentración preferida para el tiocianato de guanidinio está en el intervalo de 0.1 a 1.0 M, preferiblemente 0.5 ± 0.4 M, por ejemplo, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, o 0.9 M. En algunas realizaciones, el al menos un agente caotrópico en el sentido de la presente invención es una solución reguladora de lisis comercialmente disponible que contiene como componente un agente caotrópico, preferiblemente como un componente principal, por ejemplo, la solución reguladora de lisis Qiagen AL, como se describe con respecto al primer aspecto de la presente invención. En estas realizaciones, la mezcla de reacción de lisis preferiblemente comprende la solución reguladora de lisis comercialmente disponible, preferiblemente la solución reguladora de lisis Qiagen AL, en una concentración en el intervalo de 20% (vol/vol) a 80% (vol/vol), preferiblemente en el intervalo de 30% (vol/vol) a 70% (vol/vol), más preferiblemente en el intervalo de 40% (vol/vol) a 60% (vol/vol). Por ejemplo, Por ejemplo, la solución reguladora de lisis comercialmente disponible, preferiblemente la solución reguladora de lisis Qiagen AL, puede estar presente en la mezcla de reacción de lisis en una concentración de 20% (vol/vol), 30% (vol/vol), 40% (vol/vol), 50% (vol/vol), 60% (vol/vol), 70% (vol/vol), u 80% (vol/vol), preferiblemente en una concentración de $50 \pm 10\%$ (vol/vol), más preferiblemente $50 \pm 5\%$ (vol/vol). El experto en la materia comprenderá que el % en volumen de solución reguladora de lisis disponible comercialmente presente en la mezcla de reacción de lisis depende del tipo y/o de la concentración del agente caotrópico en dicha solución reguladora de lisis comercialmente disponible y será capaz de adaptar fácilmente el % en volumen de solución reguladora de lisis

comercialmente disponible en la mezcla de reacción de lisis basada en el tipo y/o la concentración del agente caotrópico en la solución reguladora de lisis comercialmente disponible. Preferiblemente, el al menos un agente reductor es como se describe en este documento y preferiblemente está presente en la mezcla de reacción de lisis en una concentración en el intervalo de 0.5 mM a 100 mM, preferiblemente en el intervalo de 2.5 mM a 50 mM, más preferiblemente en el intervalo de 10 mM a 30 mM. Por ejemplo, el al menos un agente reductor, preferiblemente DTT, puede estar presente en la mezcla de reacción de lisis en una concentración de 0.5 mM, 1.0 mM, 5.0 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM, 60 mM, 70 mM, 80 mM, 90 mM, o 100 mM, preferiblemente la concentración es superior a 10 mM, preferiblemente aproximadamente 20 ± 5 mM, más preferiblemente aproximadamente 20 mM. Preferiblemente, la al menos una enzima proteolítica es como se describe en este documento y preferiblemente está presente en la mezcla de reacción de lisis en una concentración en el intervalo de 5 a 200 unidades/ml, preferiblemente entre 10 a 100 unidades/ml, más preferiblemente entre 20 a 50 unidades/ml. Por ejemplo, la enzima proteolítica, preferiblemente proteinasa K, puede estar presente en la mezcla de reacción de lisis en una concentración de aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, o 100 unidades/ml, preferiblemente en una concentración de 25 ± 10 unidades/ml, más preferiblemente en una concentración de 25 ± 5 unidades/ml, en la que preferiblemente las definiciones de unidad son como se describe para proteinasa K. Preferiblemente, las perlas opcionales son como se describen en este documento y están preferiblemente presentes en la mezcla de reacción de lisis en una concentración en el intervalo de 50 a 500 mg/ml, preferiblemente en el intervalo de 100 a 400 mg/ml, más preferiblemente en el intervalo de 150 a 350 mg/ml, más preferiblemente en el intervalo de 250 a 350 mg/ml. Por ejemplo, las perlas opcionales pueden estar presentes en la mezcla de reacción de lisis en una concentración de 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, o 500 mg/ml, preferiblemente en una concentración de 300 ± 100 mg/ml, más preferiblemente en una concentración de 300 ± 50 mg/ml. Se debe entender que las concentraciones y porcentajes (por ejemplo, % en volumen) proporcionados en este documento no consideran el volumen de las perlas opcionales. En algunas realizaciones, la mezcla de reacción de lisis no contiene detergentes y/o agentes quelantes como se describe en este documento, por ejemplo, en las definiciones y para la solución reguladora de lisis. En algunas realizaciones, la mezcla de reacción de lisis comprende además uno o más detergentes y/o uno o más agentes quelantes como se describe en este documento. Preferiblemente, la mezcla de reacción de lisis se basa en agua y preferiblemente contiene componentes de la solución reguladora, tales como los descritos para la solución reguladora de lisis. Preferiblemente, el pH de la mezcla de reacción de lisis es aproximadamente neutro a alcalino. Preferiblemente, el pH de la mezcla de reacción de lisis está en el intervalo de 5.5 a 8.0, esto es, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, u 8.0, preferiblemente alrededor de 7. Preferiblemente, la mezcla de reacción de lisis no contiene ninguna otra enzima que la al menos una enzima proteolítica. Por ejemplo, la mezcla de reacción de lisis puede comprender, preferiblemente consistir esencialmente en, preferiblemente consistir en una muestra corporal como se describe en este documento, 1.2 a 2.6 M de agente caotrópico, preferiblemente clorhidrato de guanidinio, agente reductor 21 ± 5 mM, preferiblemente DTT, 25 ± 5 unidades de enzima proteolítica, preferiblemente proteinasa K, y preferiblemente 300 ± 50 mg/ml de perlas. Por ejemplo, la mezcla de reacción de lisis puede consistir en aproximadamente $48 \pm 3\%$ (vol/vol) de solución reguladora de lisis Qiagen AL, por ejemplo, $230 \mu\text{l} \pm 10 \mu\text{l}$, aproximadamente 2% (vol/vol) DTT 1 M, por ejemplo, $10 \mu\text{l} \pm 3 \mu\text{l}$, aproximadamente 4% (vol/vol) proteinasa K (>600 mAU/ml), por ejemplo, $20 \mu\text{l} \pm 6 \mu\text{l}$, aproximadamente $46 \pm 5\%$ (vol/vol) de muestra corporal, y preferiblemente aproximadamente $300 \text{ mg/ml} \pm 50 \text{ mg/ml}$ de perlas, por ejemplo, 140 ± 30 mg de perlas de vidrio. La proteinasa K también se puede adicionar a la mezcla de reacción de lisis en forma seca.

El término "composición de lisis premezclada" se refiere a una composición que comprende al menos un agente caotrópico y al menos un agente reductor. Preferiblemente, la composición de lisis premezclada comprende además perlas como se describe en este documento. Preferiblemente, la composición de lisis premezclada es la solución reguladora de lisis descrita en este documento carente de la al menos una enzima proteolítica. Preferiblemente, la naturaleza y concentración del agente caotrópico y/o la naturaleza y concentración del agente reductor en la composición de lisis premezclada es tal que la licuefacción, preferiblemente la lisis, de una muestra corporal se logra si dicha muestra corporal se mezcla con la composición de lisis premezclada, preferiblemente si dicha muestra corporal se mezcla con la composición de lisis premezclada en una proporción en volumen de aproximadamente 1:1. Preferiblemente, la naturaleza y concentración del agente caotrópico y/o la naturaleza y concentración del agente reductor en la composición de lisis premezclada es tal que una enzima proteolítica es activa en una mezcla de la composición de lisis premezclada y una muestra corporal, preferiblemente si la composición de lisis premezclada se mezcla con una muestra corporal en una proporción en volumen de aproximadamente 1:1. Preferiblemente, la concentración del al menos un agente caotrópico y el al menos un agente reductor en la composición de lisis premezclada es tal que después de mezclarla con una muestra corporal y la adición de una enzima proteolítica, las concentraciones del al menos un agente caotrópico y el al menos un agente reductor es como se ha definido para la mezcla de reacción de lisis. Preferiblemente, el al menos un agente caotrópico es como se describe en este documento, por ejemplo, en las definiciones y el primer aspecto de la presente invención, y preferiblemente está presente en la composición de lisis premezclada en una concentración en el intervalo de 0.2 M a 8.0 M, preferiblemente en el intervalo de 1.0 M a 7.0 M, más preferiblemente en el intervalo de 2.0 M a 6.0 M, más preferiblemente en el intervalo de 2.5 M a 5.2 M. Por ejemplo, el al menos un agente caotrópico, preferiblemente clorhidrato de guanidinio, puede estar presente en la composición de lisis premezclada en una concentración de aproximadamente 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, u 8.0 M, más preferiblemente en una concentración de aproximadamente 4.0 ± 1.5 M. El experto en la materia reconocerá que la concentración óptima

del agente caotrópico puede variar para variar los agentes caotrópicos, por ejemplo, dependiendo del tipo de muestra y/o de la enzima proteolítica. Por ejemplo, la concentración preferida de clorhidrato de guanidinio en la composición de lisis premezclada está en el intervalo de 2.0 a 6.0 M, preferiblemente 4.0 ± 1.5 M, mientras que la concentración preferida para tiocianato de guanidinio está en el intervalo de 0.2 a 2.0 M, preferiblemente 1.0 ± 0.8 M, por ejemplo, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, o 1.8 M. En algunas realizaciones, el al menos un agente caotrópico en el sentido de la presente invención es una solución reguladora de lisis comercialmente disponible que contiene como componente un agente caotrópico, preferiblemente como un componente principal, por ejemplo, la solución reguladora de lisis Qiagen AL, como se describe con respecto al primer aspecto de la presente invención. En estas realizaciones, la composición de lisis premezclada comprende preferiblemente la solución reguladora de lisis disponible comercialmente, preferiblemente la solución reguladora de lisis comercialmente disponible, preferiblemente la solución reguladora de lisis Qiagen AL, en una concentración en el intervalo de 40% (vol/vol) a 99% (vol/vol), preferiblemente en el intervalo de 60% (vol/vol) a 98% (vol/vol), más preferiblemente en el intervalo de 80% (vol/vol) a 96% (vol/vol). Por ejemplo, la solución reguladora de lisis comercialmente disponible, preferiblemente la solución reguladora de lisis Qiagen AL, puede estar presente en la composición de lisis premezclada en una concentración de 50% (vol/vol), 60% (vol/vol), 70% (vol/vol), 80% (vol/vol), 90% (vol/vol), 95% (vol/vol), o 98% (vol/vol), preferiblemente en una concentración de $90\% \pm 9\%$ (vol/vol), más preferiblemente $96 \pm 3\%$ (vol/vol). El experto en la materia comprenderá que el % en volumen de solución reguladora de lisis disponible comercialmente presente en la composición de lisis premezclada depende del tipo y/o de la concentración de agente caotrópico en dicha solución reguladora de lisis comercialmente disponible y será capaz de adaptar fácilmente el % en volumen de la solución reguladora de lisis comercialmente disponible en la composición de lisis premezclada basada en el tipo y/o la concentración del agente caotrópico en la solución reguladora de lisis comercialmente disponible. Preferiblemente, el al menos un agente reductor es como se describe en este documento, por ejemplo, en las definiciones y el primer aspecto de la presente invención, y preferiblemente está presente en la composición de lisis premezclada en una concentración en el intervalo de 1.0 mM a 200 mM, preferiblemente en el intervalo de 5.0 mM a 100 mM, más preferiblemente en el intervalo de 20 mM a 60 mM. Por ejemplo, el al menos un agente reductor, preferiblemente DTT, puede estar presente en la composición de lisis premezclada en una concentración de 1.0 mM, 5.0 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM, 60 mM, 70 mM, 80 mM, 90 mM, 110 mM, 120 mM, 130 mM, 140 mM, 150 mM, 160 mM, 170 mM, 180 mM, 190 mM, o 200 mM, preferiblemente la concentración es superior a 20 mM, preferiblemente la concentración es aproximadamente 40 ± 10 mM, más preferiblemente aproximadamente 40 mM. Preferiblemente, las perlas opcionales son como se describen en este documento y preferiblemente están presentes en la composición de lisis premezclada en una concentración en el intervalo de 100 a 1000 mg/ml, preferiblemente en el intervalo de 200 a 800 mg/ml, más preferiblemente en el intervalo de 300 a 700 mg/ml, más preferiblemente en el intervalo de 500 a 700 mg/ml. Por ejemplo, las perlas opcionales pueden estar presentes en la composición de lisis premezclada en una concentración de 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, o 1000 mg/ml, preferiblemente en una concentración de 600 ± 200 mg/ml, más preferiblemente en una concentración de 600 ± 100 mg/ml. Se debe entender que las concentraciones proporcionadas en este documento se calculan sin el volumen de las perlas opcionales. En algunas realizaciones, la composición de lisis premezclada no contiene detergentes y/o agentes quelantes como se describe en este documento, por ejemplo, en las definiciones o para la solución reguladora de lisis. En algunas realizaciones, la composición de lisis premezclada comprende además uno o más detergentes y/o uno o más agentes quelantes como se describe en este documento. Preferiblemente, la composición de lisis premezclada se basa en agua y contiene preferiblemente componentes de la solución reguladora, tales como los descritos para la solución reguladora de lisis. Preferiblemente, el pH de la composición de lisis premezclada es aproximadamente neutro a alcalino. Preferiblemente, el pH de la composición de lisis premezclada está en el intervalo de 5.5 a 8.0, esto es, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, u 8.0, preferiblemente alrededor de 7. Preferiblemente, la composición de lisis premezclada no contiene una enzima proteolítica, preferiblemente, la composición de lisis premezclada no contiene ninguna enzima. Por ejemplo, la composición de lisis premezclada puede comprender, preferiblemente esencialmente consistir en, preferiblemente consistir en un agente caotrópico, preferiblemente clorhidrato de guanidinio, en una concentración en el intervalo de 2 a 6 M, preferiblemente, 2.5 a 5.5 M, más preferiblemente 2.5 a 5.1 M, un agente reductor, preferiblemente DTT, en una concentración en el intervalo de 20 a 60 mM, preferiblemente 40 ± 10 mM, y preferiblemente perlas, preferiblemente en una concentración en el intervalo de 600 ± 100 mg/ml. Por ejemplo, la composición de lisis premezclada puede comprender, preferiblemente esencialmente consistir en, preferiblemente consistir en $96 \pm 3\%$ (vol/vol) de solución reguladora de lisis Qiagen AL, por ejemplo, $230 \mu\text{l} \pm 10 \mu\text{l}$, $4 \pm 1\%$ (vol/vol) de DTT 1 M, por ejemplo, $10 \pm 3 \mu\text{l}$, y preferiblemente perlas, preferiblemente en una concentración de 600 ± 100 mg/ml, por ejemplo, 140 ± 30 mg de perlas de vidrio.

En el contexto de la solución reguladora de lisis, la composición de lisis premezclada y la mezcla de reacción de lisis, en algunas realizaciones, el agente caotrópico no es tiocianato de guanidinio si el agente reductor es DTT. En algunas realizaciones, el agente reductor no es DTT si el agente caotrópico es tiocianato de guanidinio o urea. En algunas realizaciones, el agente reductor no es DTT. En algunas realizaciones, el agente reductor no es beta-mercaptoetanol. En alguna realización, el agente caotrópico no es tiocianato de guanidinio. En algunas realizaciones, el agente caotrópico no es urea.

Los términos "en el que la naturaleza y concentración del agente caotrópico es tal que se logra la licuefacción, preferiblemente lisis, de una muestra corporal", "en el que la naturaleza y concentración del agente reductor es tal que se logra la licuefacción, preferiblemente lisis, de una muestra corporal", y "en el que la naturaleza y

concentración de la enzima proteolítica es tal que se logra la licuefacción, preferiblemente lisis, de una muestra corporal" significan que el agente caotrópico y/o el agente reductor y/o la enzima proteolítica y sus concentraciones se eligen en base a su capacidad para la licuefacción, preferiblemente lisan una muestra corporal, preferiblemente una muestra corporal viscosa. En particular, esto significa preferiblemente que la muestra corporal presenta una viscosidad más alta antes del procedimiento con el agente caotrópico y/o el agente reductor y/o la enzima proteolítica en comparación con la viscosidad después de dicho procedimiento. Preferiblemente, la viscosidad antes del procedimiento es al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 veces mayor que después del procedimiento, más preferiblemente la viscosidad antes del procedimiento es 10 veces mayor que después del procedimiento. De este modo, con el fin de determinar la naturaleza del agente caotrópico y/o el agente reductor y/o la enzima proteolítica, así como las concentraciones apropiadas de los mismos, el experto en la materia puede incubar una muestra corporal, preferiblemente una muestra corporal viscosa, tal como esputo o secreción traqueal, con el agente caotrópico candidato y/o agente reductor y/o enzima proteolítica a diversas concentraciones, por ejemplo, a 0.2 M, 0.5 M, 1 M, 2 M, 3 M, 4 M, 5 M, y 6 M para el agente caotrópico y/o a 1 mM, 5 mM, 10 mM, 25 mM, 50 mM, y 100 mM para el agente reductor y/o a 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, o 100 unidades/ml para la enzima proteolítica, durante un cierto período de tiempo, tal como durante 5 minutos, 10 minutos, 20 minutos o 30 minutos, en el caso de la enzima proteolítica, preferiblemente a una temperatura a la que la enzima proteolítica es activa, y determinar la viscosidad de la muestra antes y después del procedimiento. Con respecto a las propiedades de lisis, las expresiones anteriores significan que la muestra corporal contiene un mayor número de células intactas antes del procedimiento con el agente caotrópico y/o el agente reductor y/o la enzima proteolítica en comparación con el número de células después de dicho procedimiento. Preferiblemente, el número de células intactas antes del procedimiento es al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 veces mayor que después del procedimiento, más preferiblemente el número de células intactas antes del procedimiento 10 veces mayor que después del procedimiento. De este modo, con el fin de determinar la naturaleza del agente caotrópico y/o el agente reductor y/o la enzima proteolítica, así como las concentraciones apropiadas de los mismos, el experto en la materia puede incubar una muestra corporal, como se describe anteriormente, y el número de células intactas en la muestra se determina antes y después del procedimiento, por ejemplo, mediante análisis microscópicos. A continuación, el agente caotrópico y/o el agente reductor y/o la enzima proteolítica se eligen en concentraciones apropiadas para la licuefacción, preferiblemente lisar la muestra corporal como se ha especificado anteriormente.

El término "muestra corporal" como se usa en la presente invención se refiere a cualquier muestra que se derive del cuerpo de un individuo. En este contexto, el término "individuo" se refiere preferiblemente a un animal, preferiblemente un animal de mamífero incluyendo un ser humano. Por ejemplo, un individuo en el contexto de la presente invención puede ser un ratón, rata, cobaya, conejo, gato, perro, cabra, oveja, cerdo, vaca, caballo u humano, preferiblemente un ser humano. El individuo puede ser un paciente, en el que el término "paciente" se refiere a un individuo que sufre de una enfermedad o que se sospecha que padece una enfermedad. En el contexto de la presente invención, la enfermedad es preferiblemente una enfermedad respiratoria. Preferiblemente, una muestra corporal es un fluido corporal o tejido corporal, preferiblemente tomado con el propósito de una prueba científica, tal como para diagnosticar una enfermedad, por ejemplo, una enfermedad respiratoria, por ejemplo, detectando y/o identificando un patógeno o la presencia de un marcador tumoral en una muestra corporal que es preferiblemente relevante para el diagnóstico de una enfermedad respiratoria. Preferiblemente, una muestra corporal en el contexto de la presente invención comprende células, por ejemplo, patógenos o células del individuo, la muestra corporal procede, por ejemplo, de células tumorales.

En el contexto de la presente invención, las muestras corporales preferidas son muestras que son relevantes para el diagnóstico de una enfermedad respiratoria. Tales muestras corporales pueden ser muestras respiratorias, esto es, muestras corporales derivadas de las vías respiratorias, y muestras no respiratorias, esto es, muestras corporales que no se derivan de las vías respiratorias. El tracto respiratorio en el contexto de la presente invención comprende preferiblemente la nariz, los conductos nasales, los senos paranasales, la garganta, la faringe, la caja vocal, la laringe, la tráquea, los bronquios, los bronquiolos y los pulmones, incluyendo bronquiolos respiratorios, conductos alveolares, sacos alveolares, alvéolos. Ejemplos de muestras respiratorias en el contexto de la presente invención son esputo, pus (por ejemplo, pus de la cavidad paranasal), secreción bronquial, secreción traqueal, secreción endotraqueal, aspirados bronquiales, aspirados traqueales, aspirados endotraqueales, lavado bronquial, lavado broncoalveolar (BAL), hisopado bronquial, hisopado nasofaríngeo, hisopado laríngeo y biopsias pulmonares. Las muestras no respiratorias preferidas utilizadas en la presente invención son relevantes para el diagnóstico de enfermedades respiratorias. Ejemplos preferidos de muestras no respiratorias en el contexto de la presente invención son sangre, pus, fluido pleural, punciones pleurales, jugo gástrico, aspirados gástricos y drenajes o fluidos punteados de otras localizaciones del cuerpo.

La expresión "diferentes tipos de muestras corporales" se refiere a dos o más muestras corporales que son de naturaleza diferente. Por ejemplo, los diferentes tipos de muestras corporales pueden diferir en su consistencia, por ejemplo, líquido, viscoso, grueso, sólido, etc. y/o su composición, por ejemplo, estructura y naturaleza de los componentes (proteínas, lípidos, mucinas, matriz extracelular, tejido, membranas, sales, polisacáridos, agua, etc.) pH, etc., o su origen. El grado de diferencia entre las muestras puede ser diferente para diferentes tipos de muestras. De este modo, cuanto más características de dos muestras son diferentes, más difieren las muestras. Por ejemplo, la sangre y el esputo o el jugo gástrico y el esputo son muy diferentes, mientras que el esputo y la secreción traqueal son menos diferentes, etc.

El término "de aplicación universal" como se usa en la presente invención significa "ampliamente utilizable". De este modo, una solución reguladora de lisis de aplicación universal es una solución reguladora de lisis ampliamente utilizable. Por ejemplo, una solución reguladora de lisis que es de aplicación universal para la lisis de muestras, tales como muestras corporales, es preferiblemente aplicable para la lisis de varios diferentes tipos de muestras, por ejemplo, de al menos 2, preferiblemente al menos 3, preferiblemente al menos 4, preferiblemente al menos 5, más preferiblemente al menos 6, más preferiblemente al menos 7, más preferiblemente al menos 8, incluso más preferiblemente al menos 9, y más preferiblemente al menos 10 diferentes tipos de muestras corporales. Preferiblemente, la solución reguladora de lisis de aplicación universal es eficaz en la lisis de varios diferentes tipos de muestras. Más preferiblemente, una solución reguladora de lisis que es de aplicación universal es aplicable para la lisis de varios, preferiblemente al menos 2, tipos altamente diferentes de muestras corporales como se describe a continuación. Preferiblemente, el término "aplicable a" en el contexto de la presente invención significa "efectivo en" o "apropiado para".

En el contexto de la presente invención, las expresiones "eficaz en la lisis de varios diferentes tipos de muestras" y "apropiado para la lisis de dos o más diferentes tipos de muestras corporales" significan preferiblemente que al menos 10%, preferiblemente al menos 20%, preferiblemente al menos 30%, preferiblemente al menos 40%, más preferiblemente al menos 50%, más preferiblemente al menos 60%, más preferiblemente al menos 70%, incluso más preferiblemente al menos 80%, incluso más preferiblemente al menos 90%, incluso más preferiblemente al menos 95%, más preferiblemente al menos 99% de las células contenidas en la muestra corporal se lisan en al menos 2, preferiblemente al menos 3, preferiblemente al menos 4, preferiblemente al menos 5, más preferiblemente al menos 6, más preferiblemente al menos 7, más preferiblemente al menos 8, incluso más preferiblemente al menos 9, y más preferiblemente al menos 10 diferentes tipos de muestras corporales.

En el contexto de la presente invención, "un amplio espectro de muestras corporales" significa al menos 2, preferiblemente al menos 3, preferiblemente al menos 4, preferiblemente al menos 5, más preferiblemente al menos 6, más preferiblemente al menos 7, más preferiblemente al menos 8, incluso más preferiblemente al menos 9, y más preferiblemente al menos 10 diferentes tipos de muestras corporales. En una realización preferida, "un amplio espectro de muestras corporales" se refiere a "un amplio espectro de muestras corporales relevantes para el diagnóstico de una enfermedad respiratoria". Más preferiblemente, "un amplio espectro de muestras corporales" se refiere a varios, preferiblemente al menos 2, tipos altamente diferentes de muestras corporales como se describe a continuación. Una "solución reguladora de lisis de aplicación universal" en el contexto de la presente invención es preferiblemente aplicable para la lisis de un "amplio espectro de muestras corporales". En este contexto, una solución reguladora de lisis de aplicación universal es una solución reguladora de lisis de amplio espectro.

Preferiblemente, la solución reguladora de lisis, el uso, los métodos, y/o el kit es/son de aplicación universal, preferiblemente para la lisis de muestras corporales, preferiblemente para la lisis de muestras corporales pertinentes para el diagnóstico de una enfermedad respiratoria, y/o son aplicables a la lisis de un amplio espectro de muestras corporales. Esto significa, por ejemplo, que la solución reguladora de lisis, el uso, los métodos o el kit son aplicables, aplicados preferiblemente para la lisis de al menos 2, preferiblemente al menos 3, preferiblemente al menos 4, preferiblemente al menos 5, más preferiblemente al menos 6, más preferiblemente al menos 7, más preferiblemente al menos 8, incluso más preferiblemente al menos 9, y más preferiblemente al menos 10 diferentes tipos de muestras corporales seleccionadas del grupo que consiste en sangre, esputo, pus (por ejemplo, pus de la cavidad paranasal), fluido pleural, punciones pleurales, secreción bronquial, secreción traqueal, secreción endotraqueal, aspirados bronquiales, aspirados traqueales, aspirados endotraqueales, lavado bronquial, lavado broncoalveolar (BAL), hisopado bronquial, hisopado nasofaríngeo, hisopado laríngeo, gástrico jugo, aspirados gástricos, y biopsias de pulmón, o que la solución reguladora de lisis, el uso, los métodos, o el kit es/son aplicables, aplicados preferiblemente a la lisis de al menos 2, preferiblemente al menos 3, más preferiblemente al menos 4, más preferiblemente al menos 5, más preferiblemente al menos 6 tipos de muestras corporales seleccionadas del grupo que consiste en sangre, esputo, secreción traqueal, secreción bronquial, lavado broncoalveolar, jugo gástrico, y punción pleural, o que la solución reguladora de lisis, el uso, la métodos, o el kit es/son aplicables, aplicados preferiblemente a la lisis de al menos 2, preferiblemente al menos 3 tipos de muestras corporales seleccionados del grupo que consiste en sangre, secreciones (tales como secreciones traqueales, secreciones bronquiales etc.), esputo, y lavados (tales como lavados bronquiales, lavados broncoalveolares, etc.), por ejemplo, sangre y secreciones; sangre y esputo; sangre y lavados; secreciones y esputo; secreciones y lavados; esputo y lavados; sangre, secreciones y lavados; sangre, secreciones y esputo, sangre, esputo y lavados; secreciones, esputo y lavados; y sangre, secreciones, esputo y lavados.

En realizaciones particularmente preferidas, la solución reguladora de lisis, el uso, los métodos, o el kit es/son aplicables, aplicados preferiblemente a la lisis de muestras que comprenden, que consisten esencialmente en, o que consiste en sangre, esputo, secreción traqueal, secreción bronquial, lavado broncoalveolar, jugo gástrico y punción pleural.

Preferiblemente, la solución reguladora de lisis, el uso, los métodos, o el kit es/son aplicables, preferiblemente aplicados a la lisis de al menos 2 tipos muy diferentes de muestras corporales, tales como sangre y esputo; sangre y secreción traqueal; sangre y secreción bronquial; sangre y lavado broncoalveolar; sangre y jugo gástrico; sangre y punción pleural; esputo y jugo gástrico; esputo y punción pleural; lavado broncoalveolar y punción pleural; lavado

broncoalveolar y jugo gástrico; lavado broncoalveolar y esputo; y punción pleural y jugo gástrico. Más preferiblemente, la solución reguladora de lisis, el uso, los métodos, o el kit es/son aplicables, preferiblemente aplicados a la lisis de al menos 3 muestras muy diferentes, tales como sangre, esputo, y jugo gástrico; sangre, esputo y punción pleural; sangre, secreción traqueal y jugo gástrico; sangre, secreción traqueal y punción pleural; sangre, secreción bronquial y jugo gástrico; sangre, secreción bronquial y punción pleural; sangre, lavado broncoalveolar y jugo gástrico; sangre, lavado broncoalveolar y punción pleural; esputo, jugo gástrico y punción pleural; secreción traqueal, jugo gástrico y punción pleural; secreción bronquial, jugo gástrico y punción pleural; y lavado broncoalveolar, jugo gástrico y punción pleural.

Una "enfermedad respiratoria" en el contexto de la presente invención es cualquier enfermedad que afecte al sistema respiratorio. Por ejemplo, las enfermedades respiratorias tal como se usan en este documento incluyen (i) enfermedades pulmonares obstructivas, (ii) enfermedades pulmonares restrictivas, (iii) infecciones de las vías respiratorias, tales como infecciones de las vías respiratorias superiores, por ejemplo, resfriado común, sinusitis, amigdalitis, otitis media, faringitis o laringitis e infecciones de las vías respiratorias inferior, por ejemplo, neumonía, (iv) tumores del sistema respiratorio, por ejemplo, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas (por ejemplo, adenocarcinoma, carcinoma no diferenciado de células grandes), otros cánceres de pulmón tales como carcinoides, sarcoma de Kaposi o melanoma, linfoma, cáncer de cabeza y cuello, mesotelioma y metástasis de cáncer en el pulmón, tales como cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer de células germinales, y carcinoma de células renales, (v) enfermedades de cavidad pleural, por ejemplo, empiema y mesotelioma, y (vi) enfermedades vasculares pulmonares. Las enfermedades respiratorias particularmente preferidas en el contexto de la presente invención son enfermedades respiratorias que pueden ser diagnosticadas usando diagnóstico molecular, preferiblemente usando métodos de amplificación y análisis de ácido nucleico. Por ejemplo, las infecciones respiratorias, tales como infecciones con patógenos, por ejemplo, bacterias, virus, levaduras u hongos, preferiblemente levaduras o bacterias, y tumores del sistema respiratorio son enfermedades respiratorias preferidas en el contexto de la presente invención. Las enfermedades respiratorias particularmente preferidas en el contexto de la presente invención son neumonías, en particular neumonías causadas por infecciones con patógenos, tales como neumonía bacteriana, viral, fúngica, parasitaria, atípica, adquirida en el hospital, adquirida en el ventilador, asociada con la asistencia sanitaria, adquirida en la comunidad, o síndrome respiratorio agudo severo, tuberculosis, bronquitis, infecciones patógenas durante la fibrosis quística o enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD) y un tumor del sistema respiratorio.

El término "detergente" tal como se usa en este documento significa "surfactante". Ejemplos de detergentes son las sales alquilsulfato, tales como dodecilsulfato de sodio (SDS) o laurilsulfato de amonio, surfactantes no iónicos, tales como Triton X-100, octilglucósido, Genapol X-100 o polisorbatos, por ejemplo, Tween 20 o Tween 80, y sarkosyl (N-lauroil-sarcosina). En algunas realizaciones, la solución reguladora de lisis, la composición de lisis premezclada y/o la mezcla de reacción de lisis no contienen un detergente. Preferiblemente, la solución reguladora de lisis, la composición de lisis premezclada y/o la mezcla de reacción de lisis no contienen SDS. Preferiblemente, la solución reguladora de lisis, la composición de lisis premezclada y/o la mezcla de reacción de lisis no contienen Triton X-100. Preferiblemente, la solución reguladora de lisis, la composición de lisis premezclada y/o la mezcla de reacción de lisis no contienen Tween 20 o Tween 80. Preferiblemente, la solución reguladora de lisis, la composición de lisis premezclada y/o la mezcla de reacción de lisis no contienen N-lauroilsarcosina. Preferiblemente, la solución reguladora de lisis, la composición de lisis premezclada y/o la mezcla de reacción de lisis no contienen ninguno de los detergentes anteriores, más preferiblemente la solución reguladora de lisis, la composición de lisis premezclada y/o la mezcla de reacción de lisis no contienen ningún detergente. En algunas realizaciones, la solución reguladora de lisis, la composición de lisis premezclada y/o la mezcla de reacción de lisis contienen uno o más detergentes, por ejemplo, uno o más de los detergentes anteriores. Por ejemplo, la mezcla de reacción de lisis puede contener uno o más detergentes en una concentración en el intervalo de 0.1 a 10% (p/v), preferiblemente 0.25 a 5% (p/v), tal como 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 1.5, 1.75, 2.0, 2.5, o 3% (p/v). Por ejemplo, la solución reguladora de lisis o la composición de lisis premezclada puede contener uno o más detergentes en una concentración en el intervalo de 0.2 a 20% (p/v), preferiblemente 0.5 a 10% (p/v), tal como 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, o 10% (p/v). Por ejemplo, si la solución reguladora de lisis, la composición de lisis premezclada o la mezcla de reacción de lisis comprende la solución reguladora de lisis Qiagen AL como agente caotrópico, la solución reguladora de lisis, la composición de lisis premezclada o la mezcla de reacción de lisis puede contener un detergente si la solución reguladora de lisis Qiagen AL contiene un detergente. En este caso, la solución reguladora de lisis, la composición de lisis premezclada, y/o la mezcla de reacción de lisis puede contener el detergente específico que está presente en la solución reguladora de lisis Qiagen AL y/o cualquier detergente adicional. Por ejemplo, la solución reguladora de lisis, la composición de lisis premezclada, y/o la mezcla de reacción de lisis puede contener Triton X-100, Tween 20 y/o Tween 80, por ejemplo, en una concentración como se describe anteriormente. Preferiblemente, la naturaleza y concentración del uno o más detergentes se elige de tal manera que la enzima proteolítica usada en la presente invención sea activa.

El término "agente quelante" como se usa en la presente invención se refiere a un "ligando polidentado". Los términos "agente quelante", "quelante", "quelante" y "agente secuestrante" se usan indistintamente. Preferiblemente, el agente quelante es capaz de formar múltiples enlaces a un solo átomo tal como un ion metálico, por ejemplo, Mg^{2+} o Ca^{2+} . Ejemplos de agentes quelantes son acetilacetona, etilendiamina, dietilentriamina, iminodiacetato, trietilentetramina, triaminotrietilamina, nitrilotriacetato, etilendiaminotriacetato, ácido etilendiaminotetraacético

(EDTA), ácido etilenglicol tetraacético (EGTA), ácido dietilentriamina pentaacético (DTPA), y 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético (DOTA). En algunas realizaciones, la solución reguladora de lisis, la composición de lisis premezclada, y/o la mezcla de reacción de lisis no contienen EDTA y/o EGTA. Más preferiblemente, la solución reguladora de lisis, la composición de lisis premezclada, y/o la mezcla de reacción de lisis no contienen ninguno de los agentes quelantes anteriores, más preferiblemente, la solución reguladora de lisis, la composición de lisis premezclada, y/o la mezcla de reacción de lisis no contienen ningún agente quelante. En algunas realizaciones, la solución reguladora de lisis, la composición de lisis premezclada, y/o la mezcla de reacción de lisis contienen uno o más agentes quelantes, por ejemplo, uno o más de los agentes quelantes anteriores. Por ejemplo, la mezcla de reacción de lisis puede contener uno o más agentes quelantes en una concentración en el intervalo de 0.5 a 100 mM, preferiblemente 1 a 50 mM, tales como en una concentración de aproximadamente 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, o 50 mM. Por ejemplo, la composición de lisis premezclada o la solución reguladora de lisis puede contener uno o más agentes quelantes en una concentración en el intervalo de 1 a 200 mM, preferiblemente 5 a 100 mM, tales como en una concentración de aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, o 100 mM. Por ejemplo, si la solución reguladora de lisis, la composición de lisis premezclada, o la mezcla de reacción de lisis comprende la solución reguladora de lisis Qiagen AL como agente caotrópico, la solución reguladora de lisis, la composición de lisis premezclada, o la mezcla de reacción de lisis puede contener un agente quelante si la solución reguladora de lisis Qiagen AL contienen un agente quelante. En este caso, la solución reguladora de lisis puede contener el agente quelante específico que está presente en la solución reguladora de lisis Qiagen AL o cualquier agente quelante adicional. Por ejemplo, la solución reguladora de lisis, la composición de lisis premezclada, o la mezcla de reacción de lisis puede contener EDTA o EGTA en una concentración como se describe anteriormente. Preferiblemente, la concentración del agente quelante se elige de tal manera que la enzima proteolítica utilizada en la presente invención sea activa.

El término "procedimiento" se refiere en general a cada procedimiento que comprende un cambio en una o más propiedades físicas de una muestra que se procesa cuando se determinan dichas propiedades/magnitudes físicas antes y después del tratamiento/procedimiento. El "procedimiento" en el sentido de la presente invención comprende lisis y licuefacción de una muestra de tal manera que la viscosidad de la muestra se reduce mediante el proceso del procedimiento. "Lisis" significa la desintegración de las células presentes en la muestra. Tales células pueden ser células procariotas o eucariotas, por ejemplo, células bacterianas, células de levadura, células fúngicas, células animales, células de mamífero, etc., en las que el procedimiento puede conducir a la lisis de todas las células en la muestra o solamente de un tipo específico de células o un subconjunto de bacterias. En el contexto de la presente invención, es más preferido que el procedimiento comprenda la lisis de un patógeno.

El término "licuefacción" en el contexto de la presente invención significa que la viscosidad de una muestra viscosa antes de la licuefacción es más alta, preferiblemente al menos 2 veces más alta en comparación con la viscosidad después de la licuefacción. Preferiblemente, la viscosidad de la muestra es al menos 3 veces mayor antes de la licuefacción comparada con la viscosidad después de la licuefacción. Más preferiblemente, la viscosidad de la muestra es al menos 5 veces, más preferiblemente al menos 10 veces más alta antes de la licuefacción comparada con la viscosidad después de la licuefacción.

La "viscosidad" en el contexto de la presente invención significa viscosidad dinámica, esto es, η , que se mide en $\text{kg}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1} = \text{Pa}\cdot\text{s}$. Otra unidad común para la viscosidad dinámica es centipoise (cP), donde 1 cP es igual a 1 mPa·s. El agua a 20°C tiene una viscosidad de 1.0020 cP. Algunos ejemplos de materiales con viscosidades más altas son: sangre a 37°C = 4-25 mPa·s, aceite de oliva = ~100 mPa·s, miel = 2000-10000 mPa·s, jarabe de chocolate = 10000-25000 mPa·s, chocolate fundido = 45000-130000 mPa·s, y mantequilla de maní = ~250000 mPa·s. El experto en la materia sabe perfectamente cómo determinar la viscosidad de una muestra. Por ejemplo, los instrumentos para la medición de viscosidad, esto es, viscosímetros, están disponibles comercialmente. Una "muestra viscosa" en el contexto de la presente invención significa un material con una alta viscosidad, preferiblemente una viscosidad de al menos 1×10^4 mPa·s, por ejemplo, secreciones traqueales o bronquiales, esputo, o muestras sanguíneas y purulentas en general.

El término "sin tratar" en el contexto de la presente invención significa "no procesado" o "crudo". De este modo, la expresión "muestra corporal no tratada" significa que la muestra corporal no se trata mediante la aplicación de uno o más agentes químicos o fuerzas físicas tales como temperatura o fuerzas de cizallamiento, o cualquier otro procedimiento tal como centrifugación, filtrado o tamizado. Para todos los aspectos de la presente invención, se prefiere que la muestra corporal no sea tratada antes de ponerse en contacto con la solución reguladora de lisis, la composición de lisis premezclada o antes de que se lleve a cabo la primera etapa de los métodos de acuerdo con la presente invención. Sin embargo, en el caso de que la muestra corporal se almacene durante un cierto período de tiempo, por ejemplo, durante más de 8 horas, antes de realizar los métodos de la presente invención o antes de ponerse en contacto con la muestra corporal con la solución reguladora de lisis o la composición de lisis premezclada, se prefiere que la muestra corporal se almacene a una temperatura por debajo de 0°C, preferiblemente por debajo de -5°C, más preferiblemente por debajo de -10°C, y más preferiblemente por debajo de -20°C. De este modo, se prefiere que el único tratamiento de la muestra corporal antes de realizar los métodos de acuerdo con la presente invención o antes de poner en contacto la muestra corporal con la solución reguladora de lisis o la composición de lisis premezclada sea la congelación de la muestra.

Un "procedimiento de aislamiento de ácido nucleico" en el contexto de la presente invención es un método que permite el aislamiento de ácidos nucleicos a partir de una mezcla compleja de sustancias y/o moléculas tales como un lisado celular. Preferiblemente, el procedimiento de aislamiento de ácido nucleico en el contexto de la presente invención es una tecnología basada en sílica o perla magnética. Por ejemplo, un procedimiento de aislamiento de ácidos nucleicos basado en sílica se puede basar en una membrana de sílica o en perlas de sílica, preferiblemente sobre una membrana de sílica. Los kits de aislamiento de ácidos nucleicos están comercialmente disponibles, por ejemplo, el kit de tejido de ADN EZ-1 (número de pedido 953034) o el kit de sangre de ADN QiaAmp™ (número de pedido 51104) de Qiagen. Dependiendo del procedimiento o kit de aislamiento de ácido nucleico usado, puede ser necesario suplementar la muestra corporal procesada con otros reactivos antes de realizar el procedimiento de aislamiento de ácido nucleico. Por ejemplo, para el aislamiento de ácido nucleico usando purificaciones de membrana de sílica, por ejemplo, usando el procedimiento de centrifugado QiaAmp™ de Qiagen, se requiere adicionar etanol (96-100%) a la muestra corporal lisada de acuerdo con las instrucciones del fabricante antes de transferir la mezcla sobre una columna de centrifugación QiaAmp™. Dependiendo de los componentes utilizados para la lisis de la muestra corporal, puede ser preferible adicionar una mezcla de solución reguladora de lisis Qiagen AL y etanol (96 a 100%) a la muestra corporal lisada, preferiblemente para conseguir una proporción final en volumen de muestra corporal (incluyendo los componentes usados para la lisis de la muestra corporal distinta de la solución reguladora de lisis Qiagen AL) con la solución reguladora de lisis Qiagen AL con el etanol de aproximadamente 1: 1: 1 antes de cargar la mezcla sobre la membrana de sílica. Más preferiblemente, el procedimiento de aislamiento de ácido nucleico contemplado por la presente invención no implica extracción con solventes orgánicos tales como fenol y/o cloroformo o precipitación con alcohol tal como etanol o isopropanol. El ácido nucleico aislado es preferiblemente 90%, más preferiblemente 95%, más preferiblemente 99% libre de cualquier otra estructura macromolecular tal como proteínas después de realizar el procedimiento de aislamiento de ácido nucleico.

El término "calentamiento" en el contexto de la presente invención significa "elevar la temperatura". De este modo, "calentar una mezcla a una primera temperatura" significa elevar la temperatura de una mezcla a una temperatura definida. Por ejemplo, una mezcla se puede calentar desde la temperatura ambiente a 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60°C, o a cualquier otra temperatura por encima de 60°C. Preferiblemente, "la primera temperatura" está en el intervalo de 25 a 80°C, más preferiblemente 30 a 60°C, más preferiblemente la primera temperatura es $56 \pm 5^\circ\text{C}$. Preferiblemente, la primera temperatura en el contexto de la presente invención es una temperatura a la cual una enzima proteolítica, preferiblemente la enzima proteolítica usada en la presente invención es activa. Preferiblemente, la primera temperatura es la temperatura de reacción óptima para la enzima proteolítica usada en la presente invención. Preferiblemente, el calentamiento de una mezcla también incluye mantener la mezcla a la temperatura a la que se calentó durante un cierto período de tiempo. Preferiblemente, la "segunda temperatura" es mayor que la primera temperatura. Preferiblemente, la segunda temperatura está en el intervalo de 50 a 120°C, preferiblemente 60 a 100°C, más preferiblemente 80 a 100°C. Por ejemplo, la segunda temperatura puede ser 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, o 100°C, preferiblemente $96 \pm 5^\circ\text{C}$. Preferiblemente, el término "calentamiento a" una temperatura particular también abarca el término "incubación a" una temperatura particular.

El término "molienda con perlas" significa agitación en presencia de perlas. De este modo, si una muestra o mezcla, preferiblemente una muestra o mezcla líquida, viscosa o semisólida, es molida con perlas, la muestra o mezcla contiene perlas y la muestra o mezcla y las perlas se agitan. La molienda con perlas conduce preferiblemente a la homogeneización de la muestra o mezcla y ruptura de las células debido a los gradientes de cizallamiento de alto líquido y colisión con las perlas. La velocidad y la eficacia de la homogeneización y la lisis celular pueden modificarse cambiando las velocidades de agitación, el tipo de movimiento de agitación y/o el tamaño de las perlas, así como las dimensiones del equipo. Preferiblemente, las condiciones de la etapa de molienda con perlas de los métodos de acuerdo con la presente invención son tales que una o más propiedades físicas de la mezcla son diferentes antes y después de la etapa de molienda con perlas. Preferiblemente, la mezcla es más homogénea después de molienda con perlas, más preferiblemente la mezcla es menos viscosa después de la molienda con perlas, por ejemplo, al menos por un factor de 2, y más preferiblemente la molienda con perlas comprende la lisis de células presentes en la mezcla, más preferiblemente lisis de células bacterianas y/o de levaduras. El experto en la materia conoce bien los procedimientos de molienda con perlas. Por ejemplo, los molinos de perlas en varias dimensiones están disponibles comercialmente.

Un "método de amplificación de ácido nucleico" en el contexto de la presente invención es cualquier técnica biológica molecular que sea apropiada para amplificar, esto es, multiplicar, un ácido nucleico, en la que la amplificación puede ser lineal o exponencial. Ejemplos de métodos de amplificación de ácidos nucleicos son la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos (NASBA), la reacción en cadena de la ligasa (LCR), la amplificación por desplazamiento de la cadena (SDA), la amplificación de desplazamiento múltiple (MDA), amplificación de replicasa Q-beta, y amplificación isotérmica mediada por bucle. El método de amplificación puede ser específico para un cierto ácido nucleico tal como un gen específico o un fragmento del mismo, o puede ser universal de tal manera que todo o un tipo específico de un ácido nucleico, tal como ARNm, se amplifique universalmente. Por ejemplo, el experto en la materia puede diseñar cebadores de oligonucleótidos que se hibriden específicamente con el ácido nucleico de interés y usar estos cebadores en un experimento de PCR.

Un "método de análisis de ácidos nucleicos" en el contexto de la presente invención es cualquier método que permita la detección y/o identificación de un ácido nucleico específico, en el que el término "detección" también comprende la determinación cuantitativa de un ácido nucleico. La detección y/o identificación puede estar basada en una amplificación específica, por ejemplo, mediante la amplificación de un fragmento de ADN específico usando cebadores de oligonucleótidos específicos para dicho fragmento de ADN en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El experto en la materia conoce bien cómo diseñar cebadores de oligonucleótidos que se hibridan específicamente con el ácido nucleico de interés. La detección y/o identificación también se puede conseguir sin amplificación, por ejemplo, secuenciando el ácido nucleico que se va a analizar o por hibridación específica de secuencia, por ejemplo, en el contexto de un experimento de micromatrices. Las técnicas de secuenciación y el análisis basado en micromatrices son procedimientos bien conocidos en el campo.

El ácido nucleico que se va a aislar, amplificar o detectar y/o identificar puede ser ADN, tal como ADN genómico o ADNc, o ARN, tal como ARN mensajero (ARNm) o ARN ribosómico (ARNr). Preferiblemente, el ácido nucleico es ADN. El experto en la materia conoce bien los métodos de aislamiento, amplificación y análisis de ácidos nucleicos teniendo en cuenta el conocimiento general y la bibliografía en el campo.

El término "tubo de reacción listo para el uso" se refiere a tubos de reacción repartidos en alícuotas previamente que se pueden usar directamente para el procedimiento de la muestra. Esto tiene la ventaja de que la solución reguladora de reacción no se tiene que preparar ni repartir en alícuotas antes de cada uso. En el contexto de la presente invención, se prefiere particularmente que la composición de lisis premezclada se proporcione en un tubo de reacción listo para usar. También se prefiere que la solución reguladora de lisis se proporcione en un tubo de reacción listo para usar. Preferiblemente, el tubo puede cerrarse bien, tal como un tubo de tapa de rosca. Preferiblemente, el tubo, preferiblemente el tubo de tapa de rosca tiene un volumen en el intervalo de 1 a 15 ml, preferiblemente 1 a 2 ml, preferiblemente 1.5 ml. Se prefiere un tubo de 1.5 ml, ya que se puede usar fácilmente con bloques de calentamiento estándar. Sin embargo, dependiendo de la naturaleza y cantidad de muestra que se va a tratar/analizar, se puede ajustar el volumen del tubo. Preferiblemente, el tubo contiene una cantidad máxima de solución reguladora de lisis o composición de lisis premezclada de 1/4 del volumen del tubo, más preferiblemente de 1/8 del volumen del tubo, en donde el volumen de la solución reguladora de lisis y la composición de lisis premezclada se determina sin el volumen de las perlas.

Los materiales y procedimientos descritos en este documento son apropiados para un procedimiento con un solo tubo de muestras biológicas tales como muestras corporales, en particular muestras corporales viscosas.

El término "procedimiento de un tubo" significa que todas las etapas de procedimiento se llevan a cabo en un tubo, omitiendo la necesidad de otras etapas de manipulación. La frase "en un tubo" significa de acuerdo con la invención que la muestra procesada o una parte de la misma que contiene el material deseado tal como un material de ácido nucleico no se transfiere de un recipiente a otro recipiente durante las etapas de procedimiento. Sin embargo, el término "tubo" de acuerdo con la invención pretende incluir todos los recipientes de reacción de un tamaño y forma apropiados. Preferiblemente, el "procedimiento en un solo tubo" en el contexto de la presente invención significa "licuefacción de un tubo", más preferiblemente "lisis de un tubo", esto es, todas las etapas de procedimiento hasta la licuefacción y/o lisis, respectivamente, se llevan a cabo en un recipiente. Más preferiblemente, el material procesado de este modo se puede aplicar directamente a procedimientos posteriores tales como procedimientos de aislamiento, amplificación, análisis y/o detección de ácido nucleico.

Un "procedimiento automatizado" en el contexto de la presente invención significa un procedimiento que es accionado y/o controlado por automatización. Preferiblemente, un "procedimiento automatizado" en el contexto de la presente invención no requiere ni incluye ninguna etapa de manipulación manual. De este modo, las etapas de método que se llevan a cabo en un procedimiento automatizado se realizan preferiblemente mediante un aparato o dispositivo que es preferiblemente programable para realizar dichas etapas de procedimiento en orden secuencial.

Un "patógeno" en el contexto de la presente invención puede ser cualquier organismo que cause una enfermedad en otro organismo. Preferiblemente, un "patógeno" se refiere a un organismo infeccioso tal como un virus, una bacteria, protozoos, levaduras, hongos o un parásito. Preferiblemente, el patógeno en el contexto de la presente invención es un microorganismo, tal como una bacteria, levadura, hongos o virus, más preferiblemente una bacteria patógena humana, levadura, hongos o virus. Preferiblemente, el patógeno está asociado con una enfermedad respiratoria. El término "patógeno asociado con una enfermedad respiratoria" significa un patógeno que aparece habitualmente en el contexto de una enfermedad respiratoria. Por ejemplo, un patógeno asociado con una enfermedad respiratoria puede ser la causa de una enfermedad respiratoria, sin embargo, también puede ser un patógeno oportunista que es indicativo de una enfermedad respiratoria pero no es la causa de la misma. Preferiblemente, una bacteria en el contexto de la presente invención es de la familia seleccionada del grupo que consiste en *Mycobacteriaceae* (por ejemplo, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium canetti*, *Mycobacterium caprae*, *Mycobacterium smegmatis*, y *Mycobacterium pinnipedii*), *Pseudomonadaceae* (por ejemplo, *Pseudomonas aeruginosa*), *Mycoplasmataceae* (por ejemplo, *Mycoplasma pneumoniae*), *Chlamydiaceae* (por ejemplo, *Chlamydia pneumoniae*), *Enterobacteriaceae* (por ejemplo, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*), *Staphylococcaceae* (por ejemplo, *Staphylococcus aureus*), *Streptococcaceae* (por ejemplo, *Streptococcus pneumoniae*), *Xantomonadaceae* (por ejemplo, *Stenotrophomonas maltophilia*), *Moraxellaceae* (por ejemplo, *Moraxella catarrhalis*, *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter lwoffii*), *Legionellaceae* (por ejemplo, *Legionella*

pneumophila), *Burkholderiaceae* (por ejemplo, *Burkholderia cepacia*), *Corynebacteriaceae* (por ejemplo, *Corynebacterium diphtheria*), *Neisseriaceae* (por ejemplo, *Neisseria meningitis*, *Neisseria flavescens*, *Neisseria sicca*), *Bacteroides* (por ejemplo, *Bacteroides fragilis*), y *Pasteurellaceae* (por ejemplo, *Haemophilus influenzae*), preferiblemente una levadura en el contexto de la presente invención es de una familia seleccionada del grupo que consiste en *Saccharomycetaceae* (por ejemplo, *Candida albicans*), *Sporidiobolaceae* (por ejemplo, *Cryptococcus neoformans*), *Trichocomaceae* (por ejemplo, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*), y *Pneumocystiaceae* (por ejemplo, *Pneumocystis jirovecii*).

Descripción

En un primer aspecto, la presente invención se refiere al uso de una solución reguladora que comprende, preferiblemente esencialmente que consiste en, preferiblemente que consiste en (i) al menos un agente caotrópico, (ii) al menos un agente reductor, y (iii) al menos una enzima proteolítica para el procedimiento de una muestra respiratoria, en la que el procedimiento comprende la lisis y licuefacción de dicha muestra respiratoria, y en la que dicha muestra respiratoria se selecciona del grupo que consiste en esputo, pus de la cavidad paranasal, secreción bronquial, secreción traqueal, secreción endotraqueal, aspirado bronquial, aspirado traqueal, aspirado endotraqueal, lavado bronquial, lavado broncoalveolar, hisopado bronquial, hisopado nasofaríngeo, hisopado laríngeo y biopsia pulmonar. Preferiblemente, la solución reguladora comprende además perlas. De este modo, preferiblemente la solución reguladora comprende, preferiblemente esencialmente consiste en, preferiblemente consiste en (i) al menos un agente caotrópico, (ii) al menos un agente reductor, (iii) al menos una enzima proteolítica, y (iv) perlas. Preferiblemente, dichas perlas tienen un diámetro en el intervalo de aproximadamente 300 μm a 800 μm , por ejemplo, un diámetro de 300 μm , 400 μm , 500 μm , 600 μm , 700 μm , u 800 μm , y preferiblemente tienen un diámetro de aproximadamente 600 μm . Preferiblemente, las perlas se lavan con ácido para disolver o hidrolizar cualquier contaminante que pueda estar presente en las perlas no tratadas. Por ejemplo, las perlas, preferiblemente perlas de vidrio, pueden ser lavadas con ácido por inmersión durante al menos una hora en HNO_3 2 M y enjuagarlas con agua hasta que el agua de enjuague ya no sea ácida. Alternativamente, las perlas de vidrio lavadas con ácido se pueden obtener comercialmente, por ejemplo, de Sigma-Aldrich (número de pedido G8772). Preferiblemente, las perlas, preferiblemente las perlas de vidrio están presentes en una cantidad en el intervalo de aproximadamente 200 a 1000 mg/ml, preferiblemente 300 a 900 mg/ml, preferiblemente 400 a 800 mg/ml. Por ejemplo, las perlas, preferiblemente de perlas de vidrio, están presentes en una cantidad de aproximadamente 200 mg/ml, 300 mg/ml, 400 mg/ml, 500 mg/ml, 600 mg/ml, 700 mg/ml, 800 mg/ml, 900 mg/ml, o 1000 mg/ml, más preferiblemente en una cantidad de aproximadamente 550 mg/ml. Por ejemplo, se pueden adicionar 140 mg de perlas de vidrio a 250 ml de solución reguladora para obtener una cantidad de perlas de vidrio de 560 mg/ml en la solución reguladora (de este modo no se tiene en cuenta el volumen de las perlas de vidrio). Preferiblemente, las perlas, preferiblemente las perlas de vidrio son apropiadas para la molienda con perlas.

Preferiblemente, la naturaleza y concentración del al menos un agente caotrópico y el al menos un agente reductor se eligen de tal manera que la al menos una enzima proteolítica sea activa.

En una realización preferida, la naturaleza y concentración del agente caotrópico y/o la naturaleza y concentración del agente reductor y/o la naturaleza y concentración de la enzima proteolítica es tal que se consigue la licuefacción y la lisis de una muestra respiratoria cuando la solución reguladora se mezcla con la muestra, en la que la muestra es como se ha definido anteriormente. En una realización preferida, la naturaleza y concentración del agente caotrópico y/o la naturaleza y concentración del agente reductor y/o la naturaleza y concentración de la enzima proteolítica es tal que la solución reguladora es apropiada para la lisis de al menos 2 diferentes tipos de muestras respiratorias, preferiblemente tales que la solución reguladora es de aplicación universal.

Se prefiere particularmente que la solución reguladora sea de aplicación universal para el procedimiento de muestras respiratorias que son relevantes para el diagnóstico de una enfermedad respiratoria. La muestra respiratoria se selecciona del grupo que consiste en esputo, pus de la cavidad paranasal, secreción bronquial, secreción traqueal, secreción endotraqueal, aspirados bronquiales, aspirados traqueales, aspirados endotraqueales, lavado bronquial, lavado broncoalveolar (BAL), hisopado bronquial, hisopado nasofaríngeo, hisopado laríngeo y biopsias pulmonares. Preferiblemente, la solución reguladora es de aplicación universal para el procedimiento de muestras respiratorias.

Preferiblemente, en la solución reguladora, el agente caotrópico es tiocianato de guanidinio, isotiocianato de guanidinio, clorhidrato de guanidinio, cloruro de guanidinio, tiocianato de álcali, isotiocianato de álcali, yoduro de álcali, o perclorato de álcali, en la que el ion álcali es preferiblemente potasio o sodio. Más preferiblemente, el agente caotrópico se selecciona del grupo que consiste en clorhidrato de guanidinio, tiocianato de guanidinio, y isotiocianato de guanidinio, en la que más preferiblemente el agente caotrópico es clorhidrato de guanidinio o tiocianato de guanidinio. El experto en la materia reconocerá que pueden combinarse más de un agente caotrópico en la solución reguladora. Por ejemplo, se pueden combinar clorhidrato de guanidinio y tiocianato de guanidinio. En una realización, el agente caotrópico es una solución reguladora disponible comercialmente que contiene como componente un agente caotrópico, preferiblemente como un componente principal. En este contexto, "componente principal" significa que la solución reguladora contiene, además del agua, principalmente el agente caotrópico. Un

ejemplo de dicha solución reguladora comercialmente disponible que se considera un agente caotrópico es la solución reguladora de lisis Qiagen AL (Qiagen número de pedido 19075) que contiene clorhidrato de guanidinio.

En una realización preferida, el agente caotrópico o la combinación de agentes caotrópicos está presente en una concentración en el intervalo de 0.2 M a 8.0 M, preferiblemente en el intervalo de 1.0 M a 7.0 M, más preferiblemente en el intervalo de 2.0 M a 6.0 M, más preferiblemente en el intervalo de 2.5 M a 5.2 M. Por ejemplo, el al menos un agente caotrópico, preferiblemente clorhidrato de guanidinio, puede estar presente en una concentración de 0.2 M, 0.5 M, 0.8 M, 1.0 M, 1.5 M, 2.0 M, 2.5 M, 3.0 M, 3.5 M, 4.0 M, 4.5 M, 5.0 M, 5.5 M, 6.0 M, 6.5 M, 7.0 M, 7.5 M, u 8.0 M, preferiblemente en una concentración de más de 3.0 M, preferiblemente en una concentración de más de 4.0 M, incluso más preferiblemente entre 5.0 M y 6.0 M, y más preferiblemente en una concentración de 5.5 M. El experto en la materia reconocerá que la concentración óptima del agente caotrópico en la solución reguladora dependerá de la naturaleza del agente caotrópico, la muestra que se va a tratar, y/o la enzima proteolítica usada y se puede ajustar en base al agente caotrópico o la combinación de agente caotrópicos usados. Por ejemplo, si el agente caotrópico es tiocianato de guanidinio la concentración del agente caotrópico es preferiblemente en el intervalo de 0.2 M a 2.0 M, más preferiblemente 0.2 M a 1.5 M, por ejemplo, 0.2 M, 0.3 M, 0.4 M, 0.5 M, 0.6 M, 0.7 M, 0.8 M, 0.9 M, 1.0 M, 1.1 M, 1.2 M, 1.3 M, 1.4 M, o 1.5 M. Los agentes caotrópicos más preferidos son clorhidrato de guanidinio y tiocianato de guanidinio.

Como se ha descrito anteriormente, el agente caotrópico contenido en la solución reguladora se puede proporcionar mediante una solución reguladora de lisis disponible comercialmente. En este contexto, la solución reguladora de lisis comercialmente disponible, tal como se describe anteriormente, está presente en la solución reguladora preferiblemente al menos al 50% (vol/vol), preferiblemente al menos al 60% (vol/vol), preferiblemente al 70% (vol/vol), preferiblemente al menos al 80% (vol/vol), más preferiblemente al menos al 85% (vol/vol), incluso más preferiblemente al menos al 90% (vol/vol), y más preferiblemente al menos al 95% (vol/vol), y es más preferiblemente la solución reguladora de lisis Qiagen AL.

Preferiblemente, el agente reductor se selecciona del grupo que consiste en ditiotreitól (DTT), N-acetilcisteína (NALC), beta-mercaptoetanol, Tris (2-Carboximetil) fosfina (TCEP) y tiorredoxina. Preferiblemente, el agente reductor es NALC o DTT, más preferiblemente DTT. También se contempla una combinación de más de un agente reductor. El agente reductor o la combinación de agentes reductores están preferiblemente presentes en la solución reguladora en una concentración en el intervalo de 1.0 mM a 200 mM, preferiblemente en el intervalo de 5.0 mM a 100 mM, más preferiblemente en el intervalo de 20 mM a 60 mM. Por ejemplo, el al menos un agente reductor, preferiblemente DTT, puede estar presente en la solución reguladora en una concentración de 1.0 mM, 5.0 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM, 60 mM, 70 mM, 80 mM, 90 mM, 100 mM, 110 mM, 120 mM, 130 mM, 140 mM, 150 mM, 160 mM, 170 mM, 180 mM, 190mM, o 200 mM, preferiblemente la concentración es superior a 20 mM, preferiblemente la concentración es aproximadamente 40 ± 10 mM, más preferiblemente aproximadamente 40 mM. Sin embargo, el experto en la materia reconocerá que la concentración del agente reductor en la solución reguladora dependerá de la naturaleza del agente reductor, de la muestra que se va a tratar, y/o la enzima proteolítica usada y se puede ajustar en base al agente reductor o combinación de agentes reductores usados.

Preferiblemente, la enzima proteolítica en la solución reguladora es como se describe anteriormente. Preferiblemente, la enzima proteolítica está presente en una concentración en el intervalo de 10 a 200 unidades/ml, preferiblemente en el intervalo de 20 a 100 unidades/ml, más preferiblemente en el intervalo de 30 a 70 unidades/ml, más preferiblemente en el intervalo de 40 a 60 unidades/ml. Por ejemplo, la enzima proteolítica, preferiblemente proteinasa K, puede estar presente en la solución reguladora en una concentración de aproximadamente 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, o 100 unidades/ml, preferiblemente en una concentración de 50 ± 20 unidades/ml, más preferiblemente en una concentración de 50 ± 5 unidades/ml, en la que preferiblemente la definición de la unidad es como se describe anteriormente para la proteinasa K. La enzima proteolítica más preferida es la proteinasa K. La proteinasa K es una proteasa estable con una amplia especificidad de sustrato que es muy activa incluso en presencia de agentes caotrópicos y reductores, tolera una amplia gama de niveles de pH y condiciones de regulación, y tiene una óptima actividad a una temperatura de trabajo de 56°C.

Se prefiere particularmente que la solución reguladora no contenga ninguna otra enzima que la al menos una enzima proteolítica.

En una realización, la solución reguladora no contiene detergente, en particular, se prefiere que la solución reguladora no contenga ninguno de SDS, N-lauroil-sarcosina, Tween 20, Tween 80 y Triton-X-100. En una realización, la solución reguladora no contiene un agente quelante, en particular, se prefiere que la solución reguladora no contenga EDTA o EGTA. En una realización, la solución reguladora no contiene (i) una enzima distinta de la al menos una enzima proteolítica, (ii) un detergente, y (iii) un agente quelante.

En una realización preferida, la solución reguladora tiene un pH que es aproximadamente neutro. En una realización preferida, la solución reguladora tiene un pH en el intervalo de 5.5 a 8, esto es, un pH de 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, u 8, preferiblemente a pH de alrededor de 7. La solución reguladora puede comprender componentes de la solución reguladora que, por ejemplo, se pueden utilizar para ajustar el pH de la solución reguladora. Ejemplos de tales componentes de la solución reguladora incluyen, por ejemplo, ácido 3-

5 {{tris(hidroximetil)metil}amino}propanosulfónico (TAPS), N,N-bis(2-hidroxi-etil)glicina (Bicina), tris(hidroximetil)metilamina (TRIS), N-tris(hidroximetil)-metilglicina (Tricina), ácido 4-2-hidroxi-etil-1-piperazinaetanosulfónico (HEPES), ácido 2-{{tris(hidroximetil)metil}amino}etanosulfónico (TES), ácido 3-(N-morfolino)propano-sulfónico (MOPS), piperazina-N,N'-bis(ácido 2-etanosulfónico) (PIPES), ácido dimetilarsínico (Cacodylate), citrato de sodio salino (SSC), y ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES).

10 En una realización preferida, la solución reguladora comprende, preferiblemente consiste esencialmente en, preferiblemente consiste en un agente caotrópico en una concentración en el intervalo de 2 a 6 M, preferiblemente 2 a 5 M, preferiblemente 2.3 a 4.7 M, a agente reductor en una concentración en el intervalo de 25 a 75 mM, preferiblemente aproximadamente 50 mM, una enzima proteolítica en una concentración en el intervalo de 20 a 100 unidades/ml, preferiblemente aproximadamente 50 unidades/ml, y opcionalmente perlas, preferiblemente de perlas de vidrio, de un diámetro en el intervalo de 500 a 700 μ M, preferiblemente aproximadamente 600 μ M, en una concentración en el intervalo de 500 a 700 mg/ml, preferiblemente aproximadamente 600 mg/ml. Preferiblemente, el agente caotrópico es clorhidrato de guanidinio y/o el agente reductor es DTT y/o la enzima proteolítica es proteinasa K. Preferiblemente, las perlas, preferiblemente perlas de vidrio, están presentes en la solución reguladora.

15 En una realización particularmente preferida de la solución reguladora, la solución reguladora comprende, preferiblemente consiste esencialmente en, preferiblemente consiste en 80 a 95% (vol/vol) de solución reguladora de lisis Qiagen AL, 3 a 7% (vol/vol) de DTT 1 M, 6 a 14% (vol/vol) 20 mg/ml (>600 mAU/ml) de proteinasa K, y opcionalmente perlas de vidrio, preferiblemente la solución reguladora consiste en aproximadamente 88% (vol/vol) de DTT 1 M, aproximadamente 4% (vol/vol) y aproximadamente 8% (vol/vol) 20 mg/ml (>600 mAU/ml) de proteinasa K a las que se pueden adicionar o no perlas de vidrio. Por ejemplo, se pueden mezclar 230 μ l de \pm 5 μ l de solución reguladora de lisis Qiagen AL, 10 μ l \pm 2 μ l de DTT 1 M, 20 μ l \pm 4 μ l y opcionalmente 140 mg \pm 20 mg de perlas de vidrio de aproximadamente 600 μ m de diámetro para producir la solución reguladora, en la que se adicionan preferiblemente las perlas de vidrio.

25 En una realización preferida, la solución reguladora se proporciona en un tubo de reacción listo para usar. En esta realización, la enzima proteolítica se separa preferiblemente del agente caotrópico y el agente reductor. Por ejemplo, la enzima proteolítica puede estar presente en el tubo de reacción listo para usar como mancha seca en el interior de la tapa o tapa del tubo, por ejemplo, en el interior de una tapa de rosca.

30 También se describe en este documento, pero no se incluye en la presente invención, el uso de (i) al menos un agente caotrópico, (ii) al menos un agente reductor, y (iii) al menos una enzima proteolítica para la lisis de un ancho Espectro de muestras corporales. Preferiblemente, la lisis en este contexto abarca la provisión de una mezcla de reacción de lisis como se describe anteriormente en las definiciones. De este modo, se prefiere particularmente que el al menos un agente caotrópico, el al menos un agente reductor y la al menos una enzima proteolítica se use para la lisis como se ha definido anteriormente para la mezcla de reacción de lisis.

35 Preferiblemente, el al menos un agente caotrópico, el al menos un agente reductor, y la al menos una enzima proteolítica son como se describen anteriormente, por ejemplo, en las definiciones y para la solución reguladora usada en el primer aspecto de la presente invención. Preferiblemente, las muestras corporales son como se describen anteriormente.

40 Dos o más del al menos un agente caotrópico, el al menos un agente reductor y la al menos una enzima proteolítica pueden estar presentes en una composición, por ejemplo, en una composición que comprende al menos un agente caotrópico y el al menos un agente reductor, preferiblemente carente de la al menos una enzima proteolítica. En una realización preferida, dicha composición es la composición de lisis premezclada como se describe anteriormente en las definiciones. En otra realización, la composición es la solución reguladora usada en el primer aspecto de la presente invención. Preferiblemente, la composición está presente en un tubo de reacción listo para el uso. La muestra corporal y, si procede, también la enzima proteolítica, se adiciona preferiblemente al tubo de reacción listo para el uso y la lisis se realiza preferiblemente en dicho tubo. Preferiblemente, toda la lisis ocurre en un solo tubo, de manera que se omita cualquiera otra etapa de manipulación que pueda ir acompañado del riesgo de contaminación.

45 En una realización, el al menos un agente caotrópico, el al menos un agente reductor y la al menos una enzima proteolítica están presentes en una composición. Preferiblemente, dicha composición es la solución reguladora usada en el primer aspecto de la presente invención. En esta realización, dicha composición se usa preferiblemente como solución reguladora de lisis de amplio espectro, esto es, como solución reguladora de lisis de aplicación universal, que es preferiblemente apropiada para, preferiblemente aplicada para, la lisis de dos o más, tales como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más diferentes tipos de muestras corporales, preferiblemente las muestras corporales son relevantes para el diagnóstico de una enfermedad respiratoria, tal como sangre, esputo, pus, líquido pleural, punciones pleurales, secreción bronquial, secreción traqueal, secreción endotraqueal, aspirados bronquiales, aspirados traqueales, aspirados endotraqueales, lavado bronquial, lavado broncoalveolar (BAL), hisopado bronquial, hisopado nasofaríngeo, hisopado laríngeo, jugo gástrico, aspirados gástricos, y biopsias pulmonares. Preferiblemente, los diferentes tipos de muestras corporales son como se describen anteriormente.

De este modo, la presente invención describe el uso de una composición que comprende (i) al menos un agente caotrópico, (ii) al menos un agente reductor, y (iii) al menos una enzima proteolítica como solución reguladora de lisis de amplio espectro, preferiblemente para muestras corporales.

5 Se prefiere particularmente que las muestras corporales no sean tratadas o sólo se congelen antes de que se utilice la composición como solución reguladora de lisis de amplio espectro.

Se prefiere particularmente que, después de la lisis, la muestra corporal sea apropiada para ser aplicada directamente a un procedimiento de aislamiento de ácido nucleico, tal como procedimientos de aislamiento de ácido nucleico basados en tecnología de perlas magnéticas o de sílica, sin la necesidad de procedimiento adicional tales como extracción con solventes orgánicos o precipitación antes de la aplicación al procedimiento de aislamiento de ácido nucleico. Sin embargo, dependiendo del procedimiento de aislamiento de ácido nucleico, puede ser necesario complementar la muestra corporal lisada con reactivos adicionales como se describe anteriormente. Por ejemplo, en el contexto de la presente invención se pueden usar kits de aislamiento de ácidos nucleicos comercialmente disponibles, tales como el kit de tejido de ADN EZ-1 (tecnología de perlas magnéticas) o el kit de sangre de ADN QiaAmp™ (basado en membrana de sílica) de Qiagen. Para el aislamiento de ácido nucleico EZ-1, la muestra corporal lisada se coloca preferiblemente directamente en la estación de trabajo BioRobot® EZ-1 y el procedimiento adicional se realiza de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para el aislamiento de ácidos nucleicos QiaAmp™, se adiciona preferiblemente etanol (96-100%) a la muestra corporal lisada de acuerdo con las instrucciones del fabricante y la mezcla se transfiere sobre una columna de centrifugación QiaAmp™. Dependiendo de los componentes utilizados para la lisis de la muestra corporal, puede ser preferible adicionar una mezcla de solución reguladora de lisis Qiagen AL y etanol (96 a 100%) a la muestra corporal lisada, preferiblemente para conseguir una proporción final en volumen de muestra corporal (incluyendo los componentes usados para la lisis de la muestra corporal distinta de la solución reguladora de lisis Qiagen AL) con la solución reguladora de lisis Qiagen AL con el etanol de aproximadamente 1:1:1 antes de cargar la mezcla sobre la membrana de sílica. A continuación, se llevan a cabo las etapas adicionales del procedimiento según lo recomendado por el fabricante. Alternativamente al aislamiento basado en membrana de sílica usando una centrífuga, se puede usar una aplicación basada en vacío. Preferiblemente, se aplica una depresión de al menos 400 mbar, más preferiblemente de al menos 600 mbar y más preferiblemente de al menos 800 mbar para las etapas de unión y de lavado en esta configuración experimental.

La lisis de cada uno del amplio espectro de muestras corporales se realiza preferiblemente como se describe para el método del segundo aspecto de la presente invención, preferiblemente, usando para cada uno del amplio espectro de muestras corporales una realización esencialmente idéntica del método de acuerdo con el segundo aspecto de la presente invención.

En una realización particularmente preferida, el uso es para lisis de alto rendimiento de un amplio espectro de muestras corporales.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un método de procedimiento de una muestra respiratoria, en la que el procedimiento comprende la lisis y licuefacción de dicha muestra respiratoria, dicho método que comprende la etapa de (i) poner en contacto la muestra respiratoria que se va a tratar con al menos un agente caotrópico, al menos un agente reductor, y al menos una enzima proteolítica, y la mezcla de la muestra respiratoria, el al menos un agente caotrópico, el al menos un agente reductor y la al menos una enzima proteolítica, en la que la muestra respiratoria se selecciona del grupo que consiste en esputo, pus de la cavidad paranasal, secreción bronquial, secreción traqueal, secreción endotraqueal, aspirado bronquial, aspirado traqueal, aspirado endotraqueal, lavado bronquial, lavado broncoalveolar, hisopado bronquial, hisopado nasofaríngeo, hisopado laríngeo y biopsia pulmonar. Preferiblemente, los componentes de la mezcla son como se describen anteriormente, por ejemplo, en las definiciones y para el primer aspecto de la presente invención. Preferiblemente, dicha mezcla es la mezcla de reacción de lisis como se describe anteriormente en las definiciones.

Preferiblemente, el método de acuerdo con el segundo aspecto de la presente invención comprende además la etapa de (ii) calentar la mezcla a una primera temperatura. Preferiblemente, el método de acuerdo con el segundo aspecto de la presente invención comprende además la etapa de (iii) calentar la mezcla a una segunda temperatura. Preferiblemente, el método de acuerdo con el segundo aspecto de la presente invención comprende además la etapa de (iv) molienda con perlas de la mezcla.

Preferiblemente, el método de acuerdo con el segundo aspecto de la presente invención es de aplicación universal a muestras respiratorias, preferiblemente a muestras respiratorias relevantes para el diagnóstico de una enfermedad respiratoria. Preferiblemente, el método de acuerdo con el segundo aspecto de la presente invención es aplicable a, preferiblemente, aplicado a un amplio espectro de muestras respiratorias. Preferiblemente, el método es para el procedimiento de un amplio espectro de muestras respiratorias.

Preferiblemente, el método de acuerdo con el segundo aspecto de la presente invención comprende las etapas (i), (ii), (iii) y (iv), preferiblemente en este orden secuencial. Sin embargo, en el método de acuerdo con el segundo aspecto de la presente invención, se puede omitir una o más de las etapas (ii), (iii) y (iv). Por ejemplo, el método de acuerdo con el segundo aspecto de la presente invención puede comprender las etapas (i), (ii) y (iv) o las etapas (i), (iii) y (iv) o las etapas (i), (ii) y (iii), o las etapas (i) y (ii), o las etapas (i) y (iii), o las etapas (i) y (iv). Además, las

etapas individuales se pueden repetir. Por ejemplo, el método de acuerdo con el segundo aspecto de la presente invención puede comprender las siguientes etapas en este orden secuencial: etapa (i), (iv), (ii), (iv), (iii), (iv), (iii), y (iv), en la que dos o más de las etapas se pueden realizar simultáneamente y/o se puede realizar una etapa durante otra etapa. Por ejemplo, se prefiere que la etapa (iv) se realice una o más veces, por ejemplo, 1, 2, o 3 veces, durante la etapa (iii). También se prefiere que se lleve a cabo la etapa (iv) para mezclar la muestra respiratoria con la solución reguladora en la etapa (i). Además, se prefiere que la etapa (iv) se realice entre las etapas (ii) y (iii).

La etapa (i) comprende las etapas (a) poner en contacto (en el sentido de "que reúne") los componentes de la mezcla y (b) mezclar los componentes de la mezcla, preferiblemente de tal manera que se consigue una mezcla uniforme. Los componentes pueden ponerse en contacto y mezclarse en cualquier combinación posible de los componentes individuales.

Por ejemplo, esto incluye también la posibilidad de que un subconjunto de componentes de la mezcla sea (a_1) puesto en contacto y (b_1) mezclado, y entonces uno o más componentes restantes sean (a_2) puestos en contacto con la mezcla de (b_1) y luego (b_2) mezclado hasta que todos los componentes de la mezcla se ponen en contacto y se mezclan, o que dos o más componentes de la mezcla son (a_1) puestos en contacto y (b_1) mezclados y que otros dos o más componentes son (a_2) puestos en contacto y (b_2) mezclados, y luego las mezclas de (b_1) y (b_2) son (a_3) puestas en contacto y (b_3) mezcladas hasta que todos los componentes de la mezcla se ponen en contacto y se mezclan, etc.

Por ejemplo, en la etapa (i), (1) todos los componentes de la mezcla pueden ponerse en contacto y mezclarse, por ejemplo, adicionando todos los componentes a un tubo de reacción en cualquier orden secuencial posible y luego mezclando los componentes en el tubo de reacción, o (2) todos los componentes de la mezcla, excepto la muestra respiratoria, pueden ponerse en contacto y mezclarse, y luego la muestra respiratoria se pone en contacto y se mezcla con los otros componentes puestos en contacto previamente y preferiblemente premezclados, o (3) todos los componentes de la mezcla excepto de la muestra respiratoria y la al menos una enzima proteolítica se ponen en contacto y se mezclan, y después la muestra respiratoria se pone en contacto y se mezcla con los componentes previamente puestos en contacto y premezclados, y luego se pone en contacto la al menos una enzima proteolítica y se mezcla con los componentes previamente puestos en contacto y premezclados restantes, o (4) todos los componentes de la mezcla excepto de la muestra respiratoria y la al menos una enzima proteolítica se ponen en contacto y se mezclan, la muestra respiratoria y la enzima proteolítica se ponen en contacto y se mezclan, y después se ponen en contacto y se mezclan los componentes previamente puestos en contacto y premezclados, etc.

En la variante (1) de ejemplo anterior, es posible que todos los componentes individuales se adicionen por separado, por ejemplo, a un tubo de reacción, y se mezclen. Por ejemplo, los componentes individuales de la mezcla se pueden adicionar individualmente a la muestra respiratoria que se va a tratar.

En la variante (2) del ejemplo anterior, la mezcla de todos los componentes de la mezcla excepto de la muestra respiratoria es preferiblemente una composición que comprende al menos un agente caotrópico, al menos un agente reductor y al menos una enzima proteolítica, y es preferiblemente la solución reguladora usada en el primer aspecto de la presente invención.

En las variantes (3) y (4) del ejemplo anterior, la mezcla de todos los componentes de la mezcla excepto de la muestra respiratoria y la al menos una enzima proteolítica es preferiblemente una composición que comprende al menos un agente caotrópico y al menos un agente reductor, y es preferiblemente la composición de lisis premezclada como se describe anteriormente en las definiciones.

La variante (3) del ejemplo anterior es una realización particularmente preferida del método de acuerdo con el segundo aspecto de la presente invención.

En aquellas realizaciones, en las que algunos de los componentes de la mezcla se proporcionan como una composición previamente contactada y preferiblemente premezclada, dicha composición se proporciona preferiblemente en uno o más tubos de reacción, preferiblemente tubos de reacción listos para usar. En estas realizaciones, la muestra respiratoria se puede adicionar directamente al tubo de reacción, preferiblemente el tubo de reacción listo para usar, sin tener que preparar y repartir en alícuotas la solución reguladora o tener que adicionar cada componente de solución reguladora individualmente a la muestra. Los componentes que carecen opcionalmente, tales como la enzima proteolítica, se pueden adicionar, por ejemplo, junto con la muestra respiratoria o antes o posteriormente a la muestra respiratoria.

En una realización particularmente preferida del segundo aspecto de la presente invención, en la etapa (i) la muestra respiratoria se pone en contacto y se mezcla con una composición premezclada que comprende un subconjunto de componentes de la mezcla y luego los componentes restantes de la mezcla se ponen en contacto y se mezclan con la mezcla de la muestra respiratoria y la composición premezclada. Se prefiere particularmente que la composición premezclada que comprende un subconjunto de componentes de la mezcla comprende al menos un agente caotrópico y al menos un agente reductor, pero que no contiene la al menos una enzima proteolítica. Preferiblemente, la composición premezclada comprende todos los componentes de la mezcla, excepto la enzima

proteolítica y la muestra respiratoria. Se prefiere particularmente que esta composición premezclada sea la composición de lisis premezclada como se describe anteriormente.

5 En esta realización, la muestra respiratoria que se va a tratar se pone preferiblemente en contacto con la composición premezclada que comprende preferiblemente al menos un agente caotrópico y al menos un agente reductor (sin enzima proteolítica), preferiblemente la composición de lisis premezclada como se describe anteriormente, en la etapa (i), preferiblemente en una proporción en volumen de muestra respiratoria con la composición premezclada en el intervalo de 0.5:1 a 1:2, por ejemplo, en una proporción de 0.5:1, 0.6:1, 0.7:1, 0.8:1, 0.9:1, 1:1, 1:1.2, 1:1.4, 1:1.6, 1:1.8, o 1:2, preferiblemente 1:1.1, en la que si la composición premezclada contiene perlas el volumen de las perlas no se considera para el volumen de la composición premezclada. Por ejemplo, se
10 adicionan 220 $\mu\text{l} \pm 30 \mu\text{l}$ de una muestra respiratoria que se va a tratar, más preferiblemente de una muestra respiratoria no tratada, a 240 $\mu\text{l} \pm 30 \mu\text{l}$ de la composición de lisis premezclada (por ejemplo, que consiste en 230 $\mu\text{l} \pm 25 \mu\text{l}$ de solución reguladora de lisis Qiagen AL y 10 $\mu\text{l} \pm 3 \mu\text{l}$ de DTT 1 M), conteniendo opcionalmente 140 mg \pm 20 mg de perlas, preferiblemente perlas de vidrio, preferiblemente con un diámetro de aproximadamente 600 μm . La composición se mezcla. La al menos una enzima proteolítica se puede poner en contacto con la composición antes,
15 durante o después de la mezcla. Por ejemplo, se puede adicionar la al menos una enzima proteolítica durante el mezclado si la al menos una enzima proteolítica se proporciona como una mancha seca en la tapa del tubo de reacción y la composición se pone en contacto con la tapa del tubo de reacción durante el mezclado. La al menos una enzima proteolítica también se puede adicionar antes o después del mezclado, por ejemplo, como una solución. En el ejemplo anterior, por ejemplo, se pueden adicionar 20 μl de 20 mg/ml (>600 mAU/ml).

20 En la realización, en la que la muestra respiratoria se pone en contacto con la solución reguladora usada en el primer aspecto de la presente invención en la etapa (i), la muestra respiratoria se pone preferiblemente en contacto con la solución reguladora en una proporción en volumen de muestra respiratoria con la solución reguladora en el intervalo de 0.5:1 a 1:2, por ejemplo, en una proporción de 0.5:1, 0.6:1, 0.7:1, 0.8:1, 0.9:1, 1:1, 1:1.2, 1:1.4, 1:1.6, 1:1.8, o 1:2, preferiblemente 1:1.2, en la que el volumen de las perlas opcionales no se considera para el volumen de
25 la solución reguladora. Por ejemplo, se ponen en contacto 250 $\mu\text{l} \pm 30 \mu\text{l}$ de solución reguladora, que contiene opcionalmente 140 mg \pm 20 mg de perlas, preferiblemente perlas de vidrio, preferiblemente con un diámetro de aproximadamente 600 μm , se ponen en contacto con 220 $\mu\text{l} \pm 30 \mu\text{l}$ de una muestra respiratoria, más preferiblemente una muestra respiratoria no tratada.

30 El experto en la materia reconocerá que las cantidades exactas de alícuotas de una muestra respiratoria, tal como una muestra de esputo o una muestra de secreción traqueal, pueden ser difíciles de conseguir si las muestras son muy mucosas, sin embargo, el sistema no es sensible a alguna variación en la cantidad de entrada de la muestra, de este modo, la variación en el volumen de la muestra puede ser mayor.

35 Preferiblemente, la muestra respiratoria se mezcla con los otros componentes de la mezcla en la etapa (i) de tal manera que se garantiza un buen contacto entre todos los componentes de la mezcla. El experto en la materia sabe perfectamente cómo conseguir una mezcla completa de una muestra respiratoria con los otros componentes de la mezcla. Por ejemplo, la muestra respiratoria puede ponerse en contacto con los otros componentes de la mezcla, por ejemplo, con una composición premezclada de ciertos componentes de la mezcla como se describe anteriormente, y después se mezcla mediante vórtex o pipeteado hacia arriba y hacia abajo. Por ejemplo, la mezcla se puede mezclar mediante agitación en vórtex, preferiblemente vigorosamente, por ejemplo, durante varios
40 segundos hasta uno a dos minutos. La mezcla también se puede mezclar aplicando la etapa (iv). Si se utiliza el pipeteado hacia arriba y hacia abajo, puede ser aconsejable utilizar puntas de pipeta que tengan una abertura ancha, por ejemplo, puntas de pipeta de las que se ha cortado la punta misma. En una realización preferida, la mezcla de la etapa (i) se incuba durante un período de tiempo en el intervalo de 1 minuto a 1 hora, por ejemplo, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, o 60 minutos, preferiblemente a aproximadamente la temperatura ambiente, por ejemplo,
45 a 18, 20, 22, 24 o 26°C. El tiempo de incubación depende de si se llevan a cabo las etapas (ii) y/o (iii) y/o (iv). El experto en la materia reconocerá que al omitir la etapa (ii), (iii) y/o (iv) el tiempo de incubación puede ser más largo, por ejemplo, 60 minutos.

50 Preferiblemente, en la etapa (ii) la mezcla se calienta a una primera temperatura a la cual la enzima proteolítica es preferiblemente activa. Por ejemplo, si la enzima proteolítica es proteinasa K, la primera temperatura está preferiblemente en el intervalo de 45 a 60°C, preferiblemente de 50 a 60°C, más preferiblemente de 54 a 58°C, y más preferiblemente la primera temperatura es aproximadamente 56 \pm 1°C. Preferiblemente, la mezcla se mantiene a la primera temperatura, preferiblemente durante un período de tiempo que permite que la enzima proteolítica actúe sobre las proteínas en la muestra respiratoria, tal como durante un período de tiempo en el intervalo de 5 a 60 minutos, por ejemplo, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, o 60 minutos, preferiblemente al menos 10 minutos. El
55 experto en la materia será consciente de que el tiempo de incubación para conseguir un determinado resultado proteolítico puede tener que ajustarse a las condiciones de regulación y temperatura. Por ejemplo, si se utiliza una temperatura subóptima y/o la solución reguladora contiene componentes que inhiben la actividad de la enzima proteolítica, el tiempo de incubación se extiende idealmente.

60 Preferiblemente, la mezcla se calienta en la etapa (iii) hasta una temperatura suficiente y/o durante un tiempo suficiente para causar la licuefacción de la muestra, más preferiblemente para provocar la lisis de la muestra, esto

es, la lisis de las células presentes en la muestra. Preferiblemente, la mezcla se calienta en la etapa (iii) hasta una temperatura suficiente y/o durante un tiempo suficiente para provocar la solubilización de componentes viscosos y sólidos en la muestra. Preferiblemente, la etapa de calentamiento (iii) comprende la inactivación de las células de la muestra, en particular, la inactivación de microorganismos, tales como células bacterianas y/o de levadura.

5 Preferiblemente, las micobacterias son inactivadas por calentamiento de la etapa (iii). El experto en la materia puede determinar fácilmente una temperatura y una duración apropiadas de calentamiento para producir licuefacción y/o lisis mediante experimentos sencillos que determinan la viscosidad de las muestras y/o el número de células intactas o viables antes y después de tratamientos de calentamiento bajo condiciones variables, temperaturas variables y períodos de tiempo. Por ejemplo, las muestras se pueden calentar a 80°C durante 5 minutos, 85°C durante 5 minutos, 90°C durante 5 minutos, 95°C durante 5 minutos, 98°C durante 5 minutos, 80°C durante 10 minutos, 85°C durante 10 minutos, 90°C durante 10 minutos, 95°C durante 10 minutos, 98°C durante 10 minutos, 80°C durante 15 minutos, 85°C durante 15 minutos, 90°C durante 15 minutos, 95°C durante 15 minutos, o 98°C durante 15 minutos, y la viscosidad y/o el número de células intactas o viables se pueden determinar antes y después de la etapa de calentamiento. El experto en la materia reconocerá que la temperatura de calentamiento óptima y la duración del calentamiento dependen de la naturaleza de la muestra usada. Se prefiere particularmente que la etapa de calentamiento (iii) comprenda la lisis de al menos parte de las células, preferiblemente de todas las células presentes en la muestra. Más preferiblemente, después de la etapa de calentamiento (iii), no están presentes en la mezcla células viables, más preferiblemente ninguna micobacteria viable, en particular ningún *M. tuberculosis* viable. El experto en la materia sabe muy bien cómo determinar si las bacterias viables están presentes en la mezcla, por ejemplo, mediante pruebas de cultivo. Preferiblemente, la mezcla se calienta en la etapa (iii) hasta una temperatura en el intervalo de 80°C a 99°C, por ejemplo, a 80°C, 85°C, 90°C, 92°C, 94°C, 95°C, 96°C, 97°C, 98°C, o 99°C, más preferiblemente la mezcla se calienta al menos a 90°C, más preferiblemente hasta aproximadamente 96°C. Preferiblemente, la mezcla se mantiene a la temperatura a la que se calienta, preferiblemente durante un período de tiempo en el intervalo de 5 a 30 minutos, por ejemplo, durante 5, 10, 15, 20, 25 o 30 minutos, más preferiblemente durante al menos 10 minutos, más preferiblemente durante al menos 15 minutos. En una realización particularmente preferida del segundo aspecto de la presente invención, la mezcla se calienta a 96°C ± 5°C, preferiblemente a 96°C ± 1°C, y se mantiene a esta temperatura durante 15 minutos. El experto en la materia reconocerá que cualquier combinación de temperaturas y períodos de tiempo se contempla en la presente invención siempre que se alcancen los efectos descritos anteriormente. Por ejemplo, las muestras se pueden calentar a 90°C durante 5 minutos, 90°C durante 10 minutos, 90°C durante 15 minutos, 90°C durante 20 minutos, 90°C durante 25 minutos, 90°C durante 30 minutos, 96°C durante 5 minutos, 96°C durante 10 minutos, 96°C durante 15 minutos, 96°C durante 20 minutos, 96°C durante 25 minutos, o 96°C durante 30 minutos etc.

Preferiblemente, las condiciones de la etapa de molienda con perlas (iv) del método de acuerdo con el segundo aspecto de la presente invención son tales que una o más propiedades físicas de la mezcla son diferentes antes y después de la etapa de molienda con perlas. Preferiblemente, la mezcla es más homogénea después de molienda con perlas, más preferiblemente la mezcla es menos viscosa después de la molienda con perlas, por ejemplo, al menos por un factor de 2, y más preferiblemente la molienda con perlas comprende la lisis de células presentes en la mezcla, más preferiblemente lisis de células bacterianas y/o de levaduras. Preferiblemente, las perlas utilizadas para el procedimiento de molienda con perlas en la etapa (iv) del método de acuerdo con el segundo aspecto de la presente invención tienen un diámetro en el intervalo de aproximadamente 300 μm a 800 μm, por ejemplo, un diámetro de 300 μm, 400 μm, 500 μm, 600 μm, 700 μm, u 800 μm, y preferiblemente tienen un diámetro de aproximadamente 600 μm. Preferiblemente, las perlas, preferiblemente las perlas de vidrio se lavan con ácido para disolver o hidrolizar cualquier contaminante como se describe para el primer aspecto de la presente invención. Preferiblemente, la mezcla que contiene las perlas, preferiblemente las perlas de vidrio, se agita a una velocidad en el intervalo de 1500 a 3500 rpm, por ejemplo, 1500, 1750, 2000, 2250, 2500, 2750, 3000, 3250, 3500 rpm, más preferiblemente a una velocidad de 2000 ± 100 rpm, preferiblemente durante un periodo de tiempo de al menos 2 minutos, preferiblemente de al menos 5 minutos, preferiblemente usando un agitador tipo vórtex estándar tal como un agitador tipo vórtex IKA. Alternativamente o además de un agitador tipo vórtex, se puede usar un molino de perlas para la molienda con perlas. El molino de perlas se acciona preferiblemente a una velocidad de molienda relativa a una aceleración en el intervalo de 50 a 200 g, preferiblemente de 50 a 100 g, preferiblemente de aproximadamente 100 g, preferiblemente de 2 a 10 minutos, preferiblemente de 3 a 8 minutos, preferiblemente de aproximadamente 5 minutos. Preferiblemente, la etapa de molienda con perlas se realiza a una temperatura elevada, por ejemplo, a una temperatura por encima de 40°C, preferiblemente por encima de 50°C, preferiblemente por encima de 60°C, preferiblemente por encima de 70°C, más preferiblemente por encima de 80°C, más preferiblemente por encima de 90°C, y más preferiblemente la molienda con perlas de la etapa se lleva a cabo a aproximadamente 96°C.

En una realización preferida, la etapa de molienda con perlas (iv) se realiza en paralelo a la etapa de calentamiento (ii) o (iii), preferiblemente en paralelo a la etapa de calentamiento (iii). La expresión "una etapa se realiza en paralelo al otro", por ejemplo, puede significar que la etapa se realiza simultáneamente a la otra o que la etapa se realiza en la otra, en la que "simultáneamente" significa preferiblemente que se llevan a cabo ambas etapas durante el mismo período de tiempo y simultáneamente y en la que "durante" preferiblemente significa que se realiza una etapa más corta al menos una vez, tal como una vez, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más veces durante una etapa más larga. De este modo, se prefiere particularmente que la etapa (iv) se realice simultáneamente a, o al menos una vez, preferiblemente dos veces, durante la etapa (ii) o (iii). Por ejemplo, la etapa (iii) se puede llevar a cabo durante 15

minutos, por ejemplo, la mezcla se puede calentar a $96^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$, preferiblemente a $96^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, durante 15 minutos, y la etapa (iv) se puede una vez, preferiblemente dos veces, preferiblemente al menos 1 minuto, preferiblemente al menos 2 minutos, preferiblemente al menos 3 minutos, preferiblemente al menos 5 minutos, hasta 15 minutos durante la etapa (iii). Por ejemplo, la etapa más corta se puede iniciar al comienzo de la etapa más larga, la etapa más corta se puede iniciar después de que la etapa más larga ha comenzado y puede terminar antes de que la etapa más larga haya terminado o la etapa más corta se puede iniciar de tal manera que se termina junto con la etapa más larga. Preferiblemente, la etapa más corta se inicia al comienzo de la etapa más larga, preferiblemente cuando se ha alcanzado la temperatura objetivo de la etapa más larga.

En una realización particularmente preferida del método de acuerdo con el segundo aspecto de la presente invención, las etapas (i), opcionalmente (ii), opcionalmente (iii) y opcionalmente (iv), por ejemplo, en este orden secuencial, se llevan a cabo en un solo tubo sin la necesidad de transferir sobrenadantes u otras etapas de manipulación que requieran la eliminación de la muestra/mezcla del tubo de reacción. De este modo, preferiblemente, el método de acuerdo con el segundo aspecto de la presente invención es un método de "procedimiento de un tubo". Preferiblemente, estas etapas (i), opcionalmente (ii), opcionalmente (iii) y opcionalmente (iv) del método de acuerdo con el segundo aspecto de la presente invención se llevan a cabo en un tubo de reacción listo para usar.

En una realización preferida del método de acuerdo con el segundo aspecto de la presente invención, las etapas (ii) a (iv), preferiblemente las etapas (i)(b), esto es, mezclar los componentes de la mezcla a (iv) se llevan a cabo en un procedimiento automatizado. De este modo, es particularmente preferido mezclar los componentes de la mezcla de la etapa (i), opcionalmente (ii) calentar la mezcla a una primera temperatura, opcionalmente (iii) calentar la mezcla a una segunda temperatura, y opcionalmente (iv) la molienda con perlas de la mezcla se realiza totalmente automatizada en un solo tubo mediante un dispositivo, haciendo de este modo, que cualquier etapa de manipulación manual, aparte de la etapa (i)(a), poner en contacto los componentes de la mezcla, sea dispensable y, de este modo, reduzca el riesgo de contaminación. Preferiblemente, el dispositivo es programable para realizar las etapas deseadas en cualquier orden secuencial y/o repetir una o más de las etapas. Un ejemplo de un método automatizado de acuerdo con la presente invención se muestra en la figura 2. Generalmente, todas las características de las etapas del método descritas anteriormente son también aplicables al procedimiento automatizado. La automatización del método de acuerdo con el segundo aspecto de la presente invención es altamente ventajosa proporcionando las mejores eficiencias de lisis y tiempos de procedimiento reducidos y no sería posible sin la presente invención, ya que sólo la presente invención proporciona la oportunidad de realizar una lisis completa de una muestra respiratoria en un solo tubo, esto es, en un procedimiento de un tubo. El procedimiento automatizado es particularmente preferido para las muestras que se sospecha que contienen organismos altamente patógenos tales como micobacterias, por ejemplo, *M. tuberculosis*.

En una realización preferida del segundo aspecto de la presente invención, el método comprende la licuefacción de la muestra respiratoria, tal como esputo o secreción traqueal. Preferiblemente, el método de acuerdo con el segundo aspecto de la presente invención comprende la lisis de las células presentes en la muestra, más preferiblemente lisis e inactivación de patógenos, en particular de micobacterias, presentes en la muestra. Preferiblemente, la muestra respiratoria, no se trata, en particular no se aclaró o descontaminó, antes de la etapa (i). Esto significa que la muestra respiratoria no se trata con agentes tales como DTT o NALC o una combinación de estos reactivos para clarificar/licuar la muestra o con SDS, NaOH, NALC, o una combinación de estos reactivos para descontaminar la muestra antes de la etapa (i). La "descontaminación" significa preferiblemente que cualquier organismo distinto de las micobacterias, en particular *M. tuberculosis*, tal como las bacterias, la levadura o la flora huésped, se inactive antes de cultivar la mezcla para detectar la presencia de micobacterias en la muestra. Sin embargo, aunque el método del segundo aspecto de la presente invención se contempla para muestras respiratorias que no han sido descontaminadas antes de la etapa (i), preferiblemente que no han sido tratadas antes de la etapa (i), se hace hincapié en que el método es también apropiado para muestras respiratorias descontaminadas o previamente tratadas.

En una realización preferida, la muestra respiratoria no se trata antes de realizar la etapa (i) del método de acuerdo con el segundo aspecto de la presente invención. En otra realización, la muestra respiratoria se congela antes de realizar la etapa (i) del método de acuerdo con el segundo aspecto de la presente invención, sin embargo, preferiblemente el método no comprende ninguna etapa de procedimiento antes de la etapa (i) que no sea la congelación de la muestra. De este modo, en una realización preferida, el único procedimiento de la muestra respiratoria antes de realizar la etapa (i) es la congelación de la muestra.

En una realización particularmente preferida del segundo aspecto de la presente invención, la mezcla se calienta en las etapas (ii) y (iii) como se describe anteriormente y se muele con perlas en la etapa (iv) como se describe anteriormente. Por ejemplo, la mezcla se puede calentar a $56 \pm 3^{\circ}\text{C}$ durante 10 a 20 minutos, preferiblemente durante 10 minutos en la etapa (ii), a $96 \pm 5^{\circ}\text{C}$ durante 10 a 20 minutos, preferiblemente durante 15 minutos en la etapa (iii), y después se muele con perlas a 2000 ± 100 rpm o 100 ± 10 g durante al menos 5 minutos en la etapa (iv). También se contempla cualquier otra combinación de las condiciones de molienda con perlas y calentamiento descritas anteriormente. Sin embargo, se hace hincapié en que el método de acuerdo con el segundo aspecto de la presente invención puede omitir cualquiera de las etapas de calentamiento (ii) o (iii) y/o la etapa (iv) de molienda con

perlas. El experto en la materia reconocerá que si se omite una o más de las etapas (ii), (iii) y (iv) la mezcla de la etapa (i) se incuba preferiblemente durante un tiempo suficiente para causar cambios en una o más propiedades físicas de la muestra, preferiblemente disminución de la viscosidad, por ejemplo, al menos en un factor de 2, y más preferiblemente durante un tiempo suficiente para provocar la lisis y/o la inactivación de patógenos presentes en la muestra. Como se ha descrito anteriormente, el experto en la materia conoce bien cómo determinar tales cambios en las propiedades físicas.

En una realización adicional del segundo aspecto de la presente invención, el método comprende además la etapa de (v) aislar un ácido nucleico de la mezcla. La etapa (v) se realiza preferiblemente después de la última etapa del método como se describe anteriormente. De este modo, si el método comprende la etapa (i) y las etapas (ii), (iii) y (iv) se omiten, el ácido nucleico se aísla de la mezcla después de la etapa (i), si el método comprende las etapas (i) y (ii), el ácido nucleico se aísla de la mezcla después de la etapa (ii), etc. Más preferiblemente, las perlas que están opcionalmente presentes en la mezcla se eliminan antes de que la mezcla se aplique a un procedimiento de aislamiento de ácido nucleico. Por ejemplo, las perlas pueden ser eliminadas dejando que las perlas se depositen por gravedad y transfiriendo el sobrenadante a un tubo de reacción fresco. Más preferiblemente, la mezcla obtenida después de la última etapa del método, esto es, la etapa (i), (ii), (iii) o (iv) es apropiada para ser aplicada directamente a un procedimiento de aislamiento de ácido nucleico sin la necesidad de procesamiento adicional tal como extracción con solventes orgánicos o precipitación antes de la aplicación al procedimiento de aislamiento de ácido nucleico. De este modo, en una realización particularmente preferida, la mezcla se aplica directamente a un procedimiento de aislamiento de ácido nucleico sin ningún procedimiento adicional tal como extracción usando solventes orgánicos o precipitación antes de la aplicación al procedimiento de aislamiento de ácido nucleico. Sin embargo, dependiendo del procedimiento de aislamiento de ácido nucleico usado puede ser necesario suplementar la mezcla con reactivos adicionales como se describe anteriormente, por ejemplo, en las definiciones y el segundo aspecto de la presente invención. El procedimiento de aislamiento de ácido nucleico se lleva a cabo preferiblemente tal como se describe anteriormente, por ejemplo, usando preferiblemente una tecnología de aislamiento de ácido nucleico basada en perlas magnéticas o basada en sílica, tales como un procedimiento de aislamiento de ácido nucleico basado en membranas de sílica o perlas de sílica, preferiblemente basado en membranas de sílica.

El método de acuerdo con el segundo aspecto de la presente invención puede comprender etapas adicionales, tales como ajustar el pH, preferiblemente neutralizar la mezcla, por ejemplo, antes de la etapa (ii) del método. Por ejemplo, el ajuste del pH, preferiblemente la neutralización de la mezcla se puede realizar usando uno o más componentes de la solución reguladora, por ejemplo, como se describe anteriormente para el primer aspecto de la presente invención.

En una realización particularmente preferida del segundo aspecto de la presente invención, el método comprende, preferiblemente consiste esencialmente en, preferiblemente consiste en las etapas, preferiblemente en este orden secuencial, (i) proporcionar una mezcla que comprende la muestra respiratoria que se va a tratar, al menos un agente caotrópico, al menos un agente reductor, y al menos una enzima proteolítica, preferiblemente, proporcionando preferiblemente una mezcla de reacción de lisis como se describe anteriormente, ajustando opcionalmente el pH preferiblemente a un pH aproximadamente neutro o alcalino, (iv) opcionalmente molienda con perlas de la mezcla durante 10 a 60 segundos, tales como 30 segundos, preferiblemente a aproximadamente temperatura ambiente, (ii) incubar la mezcla a $56 \pm 4^\circ\text{C}$ durante al menos 10 minutos, tal como durante 10, 12, 15, 20, o 25 minutos, opcionalmente realizar la etapa (iv) molienda con perlas durante 10 a 60 segundos, tal como durante 30 segundos, al menos una vez, preferiblemente dos veces durante la etapa previa (ii), opcionalmente (iv) molienda con perlas de la mezcla durante 10 a 60 segundos, tal como 30 segundos, (iii) incubar la mezcla a $96 \pm 5^\circ\text{C}$ durante preferiblemente 10 a 30 minutos, tal como 15 minutos, opcionalmente realizar la etapa (iv) molienda con perlas de durante 10 a 60 segundos, tal como durante 30 segundos, al menos una vez, preferiblemente dos veces durante la etapa previa (iii), y (iv) molienda con perlas de la mezcla, preferiblemente usando un molino de perlas, durante 2 a 10 minutos, tal como durante 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 minutos, preferiblemente durante 5 minutos, preferiblemente durante la etapa previa (iii), preferiblemente comenzando al principio de la etapa (iii), o aproximadamente a temperatura ambiente después de la etapa previa (iii). Preferiblemente, las etapas se realizan en un procedimiento automatizado a partir de la etapa de mezcla de los componentes de la mezcla en la etapa (i).

En un tercer aspecto, la presente invención proporciona un método de análisis de una muestra respiratoria que comprende el procedimiento de la muestra respiratoria de acuerdo con el método del segundo aspecto de la presente invención y (vi) aplicar la mezcla a un método de amplificación/análisis de ácido nucleico. Preferiblemente, la mezcla en este contexto es la muestra respiratoria considerablemente lisada, preferiblemente completamente lisada, más preferiblemente la mezcla en este contexto es el eluato obtenido a partir del procedimiento de aislamiento de ácido nucleico (v). Preferiblemente, la mezcla se refiere a la mezcla obtenida en la última etapa del método de acuerdo con el segundo aspecto de la presente invención.

En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona un método de detección de la presencia de un patógeno en una muestra respiratoria que comprende el procedimiento de la muestra respiratoria de acuerdo con el método del segundo aspecto de la presente invención y (vi) aplicar la mezcla a un método de amplificación/análisis de ácido nucleico que es apropiado para la detección de dicho patógeno. Preferiblemente, la mezcla en este contexto es la muestra respiratoria considerablemente lisada, preferiblemente completamente lisada, más preferiblemente la

mezcla en este contexto es el eluato obtenido a partir del procedimiento de aislamiento de ácido nucleico (v). Preferiblemente, la mezcla se refiere a la mezcla obtenida en la última etapa del método de acuerdo con el segundo aspecto de la presente invención.

Si el patógeno es una bacteria, la bacteria es preferiblemente de una familia seleccionada del grupo que consiste en *Mycobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Mycoplasmataceae*, *Chlamydiaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcaceae*, *Streptococcaceae*, *Xantomonadaceae*, *Moraxellaceae*, *Legionellaceae*, *Burkholderiaceae*, *Corynebacteriaceae*, *Neisseriaceae*, *Bacteroides*, y *Pasteurellaceae*. Si el patógeno es una levadura, la levadura es preferiblemente de una familia seleccionada del grupo que consiste en *Saccharomycetaceae*, *Sporidiobolaceae*, *Trichocomaceae*, y *Pneumocystidaceae*. Además, también se pueden detectar micobacterias que no están asociadas con una enfermedad usando el método de acuerdo con el cuarto aspecto de la presente invención. Las siguientes especies de la familia *Mycobacteriaceae* se pueden detectar usando el método de acuerdo con el cuarto aspecto de la presente invención: *M. abscessus*, *M. africanum*, *M. agr*, *M. aichiense*, *M. alvei*, *M. arosiense*, *M. arupense*, *M. asiaticum*, *M. aubagnense*, *M. aurum*, *M. austroafricanum*, complejo *Mycobacterium avium* (MAC) (grupo de especies que son una causa significativa de muerte en pacientes con AIDS, las especies en este complejo incluyen: *M. avium*, *M. avium paratuberculosis*, que ha estado implicado en la enfermedad de Crohn en humanos y la enfermedad de Johnes en ovejas, *M. avium silvaticum*, *M. avium "hominissuis"*, *M. colombiense*), *M. boenickei*, *M. bohemicum*, *M. bolletii*, *M. botniense*, *M. bovis*, *M. branderi*, *M. brisbanense*, *M. brumae*, *M. canariasense*, *M. caprae*, *M. celatum*, *M. chelonae*, *M. chimaera*, *M. chitae*, *M. chlorophenolicum*, *M. chubuense*, *M. conceptionense*, *M. confluentis*, *M. conspicuum*, *M. cookii*, *M. cosmeticum*, *M. diernhoferi*, *M. doricum*, *M. duvalii*, *M. elephantis*, *M. fallax*, *M. farcinogenes*, *M. flavescens*, *M. florentinum*, *M. fluoroanthenorivans*, *M. fortuitum*, *M. fortuitum subsp. acetamidolyticum*, *M. frederiksbergense*, *M. gadium*, *M. gastric*, *M. genavense*, *M. gilvum*, *M. goodii*, *M. gordonae*, *M. haemophilum*, *M. hassiacum*, *M. heckeshornense*, *M. heidelbergense*, *M. hiberniae*, *M. hodleri*, *M. holsaticum*, *M. houstonense*, *M. immunogenum*, *M. interjectum*, *M. intermedium*, *M. intracellular*, *M. kansasii*, *M. komossense*, *M. kubicae*, *M. kumamotoense*, *M. lacus*, *M. lentiflavum*, *M. leprae* (que causa la lepra), *M. lepraemurium*, *M. madagascariense*, *M. mageritense*, *M. malmoense*, *M. marinum*, *M. massiliense*, *M. microti*, *M. monacense*, *M. montefiorensis*, *M. moriokaense*, *M. mucogenicum*, *M. murale*, *M. nebraskense*, *M. neoaurum*, *M. neworleansense*, *M. nonchromogenicum*, *M. novocastrense*, *M. obuense*, *M. palustre*, *M. parafortuitum*, *M. parascrofulaceum*, *M. parmense*, *M. peregrinum*, *M. phlei*, *M. phocaicum*, *M. pinnipedii*, *M. porcinum*, *M. poriferae*, *M. pseudoshottsii*, *M. pulveris*, *M. psychrotolerans*, *M. pyrenivorans*, *M. rhodesiae*, *M. saskatchewanense*, *M. scrofulaceum*, *M. senegalense*, *M. seoulense*, *M. septicum*, *M. shimoidei*, *M. shottsii*, *M. simiae*, *M. smegmatis*, *M. sphagni*, *M. szulgai*, *M. terrae*, *M. thermoresistibile*, *M. tokaiense*, *M. triplex*, *M. triviale*, complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) (los miembros son agentes causantes de la tuberculosis humana y animal, las especies de este complejo incluyen: *M. tuberculosis*, la principal causa de la tuberculosis humana, *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. africanum*, *M. canetti*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*), *M. tusciae*, *M. ulcerans*, que causa la "Buruli", o "úlceras Bairnsdale", *M. vaccae*, *M. vanbaalenii*, *M. wolinskyi*, y *M. xenopi*.

Preferiblemente, la bacteria de la familia de *Mycobacteriaceae* se selecciona del grupo que consiste en *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium canetti*, *Mycobacterium caprae*, *Mycobacterium smegmatis*, y *Mycobacterium pinnipedii*, la bacteria de la familia de *Pseudomonadaceae* es *Pseudomonas aeruginosa*, la bacteria de la familia de *Mycoplasmataceae* es *Mycoplasma pneumoniae*, la bacteria de la familia de *Chlamydiaceae* es *Chlamydia pneumoniae*, la bacteria de la familia de *Enterobacteriaceae* se selecciona del grupo que consiste en *Citrobacter freundii*, *Citrobacter koseri*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter sakazakii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Proteus penneri*, *Salmonella enterica*, *Serratia marcescens*, y *Yersinia pseudotuberculosis*, la bacteria de la familia de *Pasteurellaceae* se selecciona del grupo que consiste en *Haemophilus influenzae* y *Haemophilus parainfluenzae*, la bacteria de la familia de *Staphylococcaceae* se selecciona del grupo que consiste en *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis* y otros estafilococos coagulasa negativos (flora huésped apatógena: *Gemella haemolysans*, *Gemella morbillorum*), la bacteria de la familia de *Streptococcaceae* se selecciona del grupo que consiste en *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, y *Streptococcus agalactiae* (flora huésped apatógena: *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus orals*, y *Streptococcus sanguinans*), la bacteria de la familia *Xantomonadaceae* es *Stenotrophomonas maltophilia*, la bacteria de la familia de *Moraxellaceae* se selecciona del grupo que consiste en *Moraxella catarrhalis*, *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter calcoaceticus* (flora), y *Acinetobacter Iwoffii*, la bacteria de la familia de *Legionellaceae* es *Legionella pneumophila*, la bacteria de la familia *Burkholderiaceae* es *Burkholderia cepacia*, la bacteria de la familia *Corynebacteriaceae* es *Corynebacterium diphtheria*, la bacteria de la familia *Neisseriaceae* se selecciona del grupo que consiste en *Neisseria meningitis*, *Neisseria flavescens*, y *Neisseria sicca*, y la bacteria de la familia de *Bacteroides* es *Bacteroides fragilis*.

Preferiblemente, la levadura de la familia *Saccharomycetaceae* se selecciona del grupo que consiste en *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida lusitania*, *Candida parapsilosis*, y *Candida tropicalis*, la levadura de la familia *Sporidiobolaceae* es *Cryptococcus neoformans*, la levadura de la familia *Trichocomaceae* se selecciona del grupo que consiste en *Aspergillus flavus* y *Aspergillus fumigatus*, y la levadura de la familia *Pneumocystidaceae* es *Pneumocystis jirovecii*.

En una realización preferida del tercer y cuarto aspecto de la presente invención, el método de amplificación/análisis de ácido nucleico se selecciona del grupo que consiste en reacción en cadena de polimerasa (PCR), amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos (NASBA), reacción de cadena de ligasa (LCR), amplificación de desplazamiento de cadena (SDA), amplificación de replicasa Q-beta, amplificación isotérmica mediada por bucle, amplificación de desplazamiento múltiple (MDA) y análisis de micromatrices. Sin embargo, se observa que se puede aplicar cualquier otro método de amplificación/análisis de ácido nucleico en el contexto de la presente invención. Basándose en el conocimiento general y en la bibliografía en el campo, el experto en la materia conoce bien los métodos de amplificación/análisis de ácidos nucleicos y cómo llevar a cabo tales métodos. En una realización preferida particular, el método de amplificación/análisis de ácido nucleico es PCR.

Más preferiblemente, el procedimiento de amplificación de ácido nucleico en el contexto de los aspectos tercero y cuarto de la presente invención es apropiado para detectar, incluso más preferiblemente para identificar, el patógeno, en el que el patógeno es preferiblemente una bacteria o levadura como se describe anteriormente. Por ejemplo, el ácido nucleico contenido en la mezcla, lisado, o eluato obtenido por el método de acuerdo con el segundo aspecto de la presente invención puede ser amplificado por PCR usando cebadores que son específicos para el patógeno que se va a detectar, por ejemplo, la micobacteria. El experto en la materia conoce muy bien cómo diseñar dichos cebadores específicos basados en la secuencia del genoma del patógeno que generalmente está disponible públicamente, por ejemplo, en el National Center for Biotechnology Information (NCBI) página de inicio (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

Un quinto aspecto de la presente invención se refiere a un método de diagnóstico de una enfermedad respiratoria en un sujeto que comprende el procedimiento de una muestra respiratoria de acuerdo con el método del segundo aspecto de la presente invención y (vi) aplicar la mezcla a un método que es apropiado para diagnosticar la enfermedad respiratoria. Preferiblemente, la mezcla en este contexto es la muestra respiratoria considerablemente lisada, preferiblemente completamente lisada, más preferiblemente la mezcla en este contexto es el eluato obtenido del procedimiento de aislamiento de ácido nucleico. Preferiblemente, la mezcla se refiere a la mezcla obtenida en la última etapa del método de acuerdo con el segundo aspecto de la presente invención. Preferiblemente, la muestra respiratoria es relevante para el diagnóstico de una enfermedad respiratoria. Preferiblemente, la enfermedad respiratoria es una enfermedad respiratoria infecciosa o un tumor del sistema respiratorio. Preferiblemente, la enfermedad respiratoria se debe a una infección viral, bacteriana, fúngica o de levadura, o es un tumor del sistema respiratorio. Preferiblemente, la enfermedad respiratoria es como se ha definido anteriormente, preferiblemente seleccionada del grupo que consiste en neumonía, tuberculosis, bronquitis, infecciones de patógenos durante la fibrosis quística o enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), y los tumores del sistema respiratorio.

Un método que es apropiado para diagnosticar la enfermedad respiratoria en este contexto es preferiblemente un método de diagnóstico molecular, preferiblemente un método de amplificación/análisis de ácido nucleico, preferiblemente como se describe anteriormente. Por ejemplo, las infecciones de las vías respiratorias se pueden detectar o diagnosticar detectando, preferiblemente identificando el patógeno infeccioso, y los tumores de las vías respiratorias pueden ser detectados o diagnosticados detectando ciertos antígenos asociados a tumores en las muestras respiratorias lisadas. Por ejemplo, el método de acuerdo con el quinto aspecto puede comprender el método de acuerdo con el tercer o cuarto aspecto de la presente invención. De este modo, por ejemplo, el método de detección de la presencia de un patógeno en una muestra respiratoria de acuerdo con el cuarto aspecto de la presente invención se puede utilizar para diagnosticar una enfermedad respiratoria, en particular una enfermedad respiratoria infecciosa, de acuerdo con el quinto aspecto de la presente invención.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método de procedimiento de al menos dos muestras respiratorias, tales como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 50, 60, 70, 80, 90 o más de 100 muestras respiratorias, que comprende el procedimiento de cada una de las al menos dos respiratorias corporales de acuerdo con el método del segundo aspecto de la presente invención, en la que las al menos dos muestras respiratorias son preferiblemente diferentes tipos de muestras respiratorias.

Se describe adicionalmente en este documento pero no se incluye en la presente invención un método de análisis de al menos dos muestras respiratorias, tales como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 50, 60, 70, 80, 90 o más de 100 muestras respiratorias, que comprende analizar cada una de las al menos dos muestras respiratorias de acuerdo con el método del tercer aspecto de la presente invención, en la que las al menos dos muestras respiratorias son preferiblemente diferentes tipos de muestras respiratorias y un método de detección de la presencia de un patógeno en al menos dos muestras respiratorias, tales como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 50, 60, 70, 80, 90 o más de 100 muestras respiratorias, que comprende detectar la presencia de un patógeno en cada una de las al menos dos muestras respiratorias de acuerdo con el método del cuarto aspecto de la presente invención, en la que las al menos dos muestras respiratorias son preferiblemente diferentes tipos de muestras respiratorias. Preferiblemente, las al menos dos muestras respiratorias se procesan usando una realización similar, preferiblemente idéntica, del método de acuerdo con el segundo, tercer o cuarto aspecto de la presente invención. Preferiblemente, los métodos según estos aspectos se llevan a cabo en un entorno de alto rendimiento.

Se describe adicionalmente en este documento, pero no se abarca en la presente invención un método para el procedimiento de un amplio espectro de muestras respiratorias que comprende el procedimiento de cada uno del amplio espectro de muestras respiratorias de acuerdo con el método del segundo aspecto de la presente invención,

5 un método de análisis de un amplio espectro de muestras respiratorias que comprende analizar cada uno del amplio espectro de muestras respiratorias de acuerdo con el método del tercer aspecto de la presente invención, y un método de detección de la presencia de un patógeno en un amplio espectro de muestras respiratorias que comprende detectar la presencia de un patógeno en cada uno del amplio espectro de muestras respiratorias de acuerdo con el método del cuarto aspecto de la presente invención. Preferiblemente, las muestras respiratorias del amplio espectro de muestras respiratorias se procesan usando una realización similar, preferiblemente idéntica del método de acuerdo con el segundo, tercer o cuarto aspecto de la presente invención. Preferiblemente, los métodos según estos aspectos se llevan a cabo en un entorno de alto rendimiento.

10 Se describe adicionalmente en este documento, pero no se incluye en la presente invención un lisado de una muestra corporal que comprende una muestra corporal, preferiblemente una muestra corporal que es apropiada para el diagnóstico de una enfermedad respiratoria, al menos un agente caotrópico, al menos un agente reductor, y al menos una enzima proteolítica. Preferiblemente, los componentes del lisado son como se describen anteriormente, por ejemplo, en las definiciones y en el primer aspecto de la presente invención. Preferiblemente, "muestra corporal" significa "los componentes de una muestra corporal". De este modo, "un lisado de una muestra corporal que comprende una muestra corporal" significa preferiblemente "un lisado de una muestra corporal que comprende los componentes de una muestra corporal".

15 En una realización, el lisado comprende una muestra corporal, preferiblemente como se describe anteriormente, y la solución reguladora usada en el primer aspecto de la presente invención. En una realización, el lisado es la mezcla de reacción de lisis como se describe anteriormente, en la que preferiblemente, la muestra corporal se desintegra, por ejemplo, licuada, preferiblemente lisada.

20 La enfermedad respiratoria se debe preferiblemente a una infección viral, bacteriana, fúngica o de levadura. Preferiblemente, la enfermedad respiratoria es como se describe anteriormente, y preferiblemente se selecciona del grupo que consiste en neumonía, tuberculosis, bronquitis, infecciones patógenas durante la fibrosis quística o enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD) y tumores del sistema respiratorio. Preferiblemente, la muestra corporal no se trata antes de ponerse en contacto con los otros componentes del lisado.

25 En una realización, el lisado se prepara mediante o se puede obtener mezclando la muestra y la solución reguladora de lisis descritas en este documento en una proporción en volumen de la muestra con la solución reguladora de lisis en el intervalo de 0.5:1 a 1:2, por ejemplo, en una proporción de 0.5:1, 0.6:1, 0.7:1, 0.8:1, 0.9:1, 1:1, 1:1.2, 1:1.4, 1:1.6, 1:1.8, o 1:1.2, en el que, si la solución reguladora de lisis contiene perlas, el volumen de la solución reguladora de lisis se determina sin el volumen de las perlas. En una realización preferida, el lisado no tiene perlas, por ejemplo, porque la solución reguladora de lisis no contiene perlas o las perlas se han eliminado del lisado. Preferiblemente, para producir el lisado, la mezcla de muestra corporal se calienta y/o se muele con perlas, preferiblemente se calienta y se muele con perlas como se describe anteriormente para el segundo aspecto de la presente invención.

30 Además, el lisado también puede prepararse o puede obtenerse adicionando la muestra corporal a uno o más componentes de la solución reguladora de lisis y luego adicionando el componente(s) opcionalmente remanente de la solución reguladora de lisis. Por ejemplo, el lisado se puede preparar o se puede obtener adicionando la muestra corporal a una composición que comprende al menos un agente caotrópico y al menos un agente reductor, preferiblemente a la composición de lisis premezclada como se describe anteriormente, y a continuación adicionar los componentes restantes del lisado, por ejemplo, la enzima proteolítica.

35 Se describe adicionalmente en este documento, pero no se incluye en la presente invención un lisado que se puede obtener mediante el procedimiento de una muestra respiratoria de acuerdo con el método del segundo aspecto de la presente invención.

40 Se describe adicionalmente en este documento, pero no se incluye en la presente invención un kit que comprende (i) un agente caotrópico, (ii) un agente reductor, (iii) una enzima proteolítica, y (iv) un folleto de instrucciones, preferiblemente un folleto de instrucciones para tratar una muestra corporal, preferiblemente un folleto de instrucciones para lisar una muestra corporal. Preferiblemente, los componentes del kit son como se describen anteriormente, por ejemplo, en las definiciones y en el primer aspecto de la presente invención. Preferiblemente, la muestra corporal es relevante para el diagnóstico de una enfermedad respiratoria, preferiblemente como se describe anteriormente. Preferiblemente, el kit comprende además perlas, preferiblemente hechas de un material sólido inerte tal como vidrio, cerámica, plástico o metal tal como acero, preferiblemente como se describe anteriormente.

45 En una realización preferida del kit, se proporcionan dos o más componentes del kit, por ejemplo, el agente caotrópico y el agente reductor, en una composición. Preferiblemente, la composición se proporciona en uno o más tubos de reacción, preferiblemente tubos de reacción listos para usar. Preferiblemente, dichos uno o más tubos de reacción comprenden una alícuota de dicha composición que es apropiada para la lisis de una muestra corporal. Preferiblemente, el volumen de dicha alícuota está entre 1/2 a 1/10, preferiblemente 1/4 a 1/10 del volumen del tubo de reacción, tal como 1/2, 1/3, 1/4, 1/5, 1/6, 1/7, 1/8, 1/9 o 1/10 del volumen del tubo de reacción. Dicha composición puede comprender componentes distintos del agente reductor y el agente caotrópico, tal como un componente de regulación, por ejemplo, como se describe anteriormente para el primer aspecto de la presente invención. Preferiblemente, dicha composición no comprende la enzima proteolítica. Se prefiere que uno o más tubos de

reacción comprendan también las perlas. Preferiblemente, dicha composición es la composición de lisis premezclada como se describe anteriormente en las definiciones.

5 Preferiblemente, el uno o más tubos de reacción son tubos de tapa de rosca, preferiblemente con un volumen en el intervalo de 0.2 a 50 ml, preferiblemente de 0.2 a 15 ml, preferiblemente de 0.5 a 10 ml, preferiblemente de 1 a 2 ml, preferiblemente de 1.5 ml. Los uno o más tubos de reacción pueden ser también recipientes de reacción de formato de pozos múltiples, tales como tiras de 8 o 12 recipientes de reacción o placas de 24, 48 o 96 recipientes de reacción, preferiblemente con una tapa que se puede cerrar con firmeza. La naturaleza y concentración de los componentes del kit son preferiblemente como se ha definido anteriormente, por ejemplo, en las definiciones y para los componentes de la solución reguladora usados en el primer aspecto de la presente invención.

10 En una realización preferida del kit, la enzima proteolítica se proporciona por separado del agente caotrópico y el agente reductor, por ejemplo, la enzima proteolítica se puede proporcionar en el kit en un tubo de almacenamiento separado. Alternativamente, la enzima proteolítica puede proporcionarse dentro de uno o más tubos de reacción que comprenden la composición, preferiblemente la composición de lisis premezclada, por ejemplo, en una mancha seca en la tapa del tubo, por ejemplo, en la tapa de la tapa de rosca.

15 En una realización preferida, el kit comprende además medios para aislar el ADN, preferiblemente una matriz de aislamiento de ácido nucleico basada en una base de sílica o base magnética, preferiblemente como se describe anteriormente.

20 En una realización preferida, el kit es para la lisis de una muestra respiratoria corporal, preferiblemente como se describe anteriormente. En esta realización, el kit puede contener un folleto de instrucciones que describe el método de acuerdo con el segundo aspecto de la presente invención. En otra realización preferida, el kit es para el análisis de una muestra respiratoria, preferiblemente como se describe anteriormente. En esta realización, el kit puede contener un folleto de instrucciones que describe el método de acuerdo con el tercer aspecto de la presente invención. En otra realización preferida, el kit es para detectar la presencia de un patógeno en una muestra respiratoria, preferiblemente como se describe anteriormente. En esta realización, el kit puede comprender además medios para la detección de un patógeno, por ejemplo, oligonucleótidos, tales como cebadores o sondas, específicos para el ácido nucleico derivado de dicho patógeno. En esta realización, el kit puede contener un folleto de instrucciones que describe el método de acuerdo con el cuarto aspecto de la presente invención.

25 En otra realización preferida, el kit es para lisis de un amplio espectro de muestras corporales, preferiblemente para lisis de al menos 2, preferiblemente al menos 3, preferiblemente al menos 4, preferiblemente al menos 5, preferiblemente al menos 6, preferiblemente al menos 7 diferentes tipos de muestras corporales, preferiblemente como se describe anteriormente. En otra realización preferida, el kit es para análisis de un amplio espectro de muestras corporales, preferiblemente para análisis de al menos 2, preferiblemente al menos 3, preferiblemente al menos 4, preferiblemente al menos 5, preferiblemente al menos 6, preferiblemente al menos 7 diferentes tipos de muestras corporales, preferiblemente como se describe anteriormente. En otra realización preferida, el kit es para detectar la presencia de un patógeno en un amplio espectro de muestras corporales, preferiblemente para detectar la presencia de un patógeno en al menos 2, preferiblemente al menos 3, preferiblemente al menos 4, preferiblemente al menos 5, preferiblemente al menos 6, preferiblemente al menos 7 diferentes tipos de muestras corporales, preferiblemente como se describe anteriormente. En esta realización, el kit puede comprender además medios para la detección de un patógeno, por ejemplo, oligonucleótidos, tales como cebadores o sondas, específicos para el ácido nucleico derivado de dicho patógeno. Preferiblemente, las muestras corporales son relevantes para el diagnóstico de una enfermedad respiratoria.

30 En otra realización, el kit es para el diagnóstico de una enfermedad respiratoria, preferiblemente mediante diagnóstico molecular, preferiblemente mediante análisis de ácidos nucleicos, por ejemplo, detectando y/o identificando patógenos o un marcador de tumor del sistema respiratorio, como se describe anteriormente. En esta realización, el kit comprende además preferiblemente medios para la detección de un patógeno o un marcador de tumor del sistema respiratorio, por ejemplo, oligonucleótidos, tales como cebadores o sondas, específicos para el ácido nucleico derivado de dicho patógeno o para el marcador de tumor del sistema respiratorio. En esta realización, el kit comprende además preferiblemente un folleto de instrucciones que describe el método de acuerdo con el quinto aspecto de la presente invención.

35 40 45 50 Preferiblemente, el kit es de aplicación universal para la lisis de muestras corporales, preferiblemente muestras corporales relevantes para el diagnóstico de una enfermedad respiratoria.

En las realizaciones preferidas, el kit es para realizar el método de acuerdo con el segundo aspecto de la presente invención, el método de acuerdo con el tercer aspecto de la presente invención, el método de acuerdo con el cuarto aspecto de la presente invención, o el método según el quinto aspecto de la presente invención.

55 La presente invención proporciona describe por primera vez una solución reguladora de lisis, un uso, un método de procedimiento y un kit que son de aplicación universal para la lisis de muestras corporales. Esto permite por primera vez realizar la lisis de varios tipos de diferentes muestras corporales, tales como muestras corporales relevantes para el diagnóstico de una enfermedad respiratoria, en paralelo usando la misma solución reguladora de lisis y

protocolo de procedimiento, y de este modo tratar diferentes tipos de muestras corporales en un entorno de alto rendimiento. Además, la presente invención proporciona una valiosa alternativa a los enfoques existentes para el procedimiento, en particular la lisis, de muestras respiratorias, en particular tales muestras respiratorias que son difíciles de manejar, por ejemplo, muestras respiratorias tales como esputo o secreciones traqueales, especialmente si se requiere el aislamiento de ácidos nucleicos y su posterior análisis. Algunas de las ventajas de la presente invención son un riesgo de infección bajo, especialmente si se van a detectar organismos altamente patógenos, una solubilización/licuefacción eficiente y/o lisis de muestras respiratorias, una manipulación reducida, la posibilidad de automatizar el procedimiento y llevar a cabo el procedimiento en un entorno de alto rendimiento, incluso para diferentes tipos de muestras, y compatibilidad con diferentes métodos de aislamiento de ADN.

5

10 Ejemplos

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar realizaciones particularmente preferidas de la presente invención y no deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención de ninguna manera. Los expertos en la materia reconocerán que se pueden hacer diversas modificaciones a la descripción anterior y a los siguientes ejemplos sin apartarse del espíritu y alcance de la invención.

15 Ejemplo 1: Detalles del procedimiento y descripción general

Materiales y equipos

Consumibles y productos químicos		
artículo	proveedor	número de pedido
Tubos de tapa de rosca (1.5 ml)	por ejemplo, neolab	1-6186
Tapa de rosca	por ejemplo, neolab	1-6193
Perlas de vidrio, 425 - 600 µm, lavadas con ácido	Sigma-Aldrich	G8772
Solución reguladora de lisis AL	Qiagen	19075
Solución de DL-ditiotreitol (DTT) 1 M	Sigma-Aldrich	43816
Proteinasa K (20 mg/ml, > 600 mAU/ml)	Qiagen (solución lista para usar) alternativamente Sigma - Aldrich (sólido)	19131 P2308
Etanol 96%	Carl Roth	P075.3
Kit de Sangre QiaAmp™ Mini	Qiagen	51104
Eppendorf Dualfilter T.I.P.S. (50 - 1000 µl)	neolab	E6513

Equipos		
artículo	proveedor	comentario
Bloque de calentamiento (56 - 96°C)	por ejemplo, Eppendorf thermomixer	o equivalente
Dispositivo de molino de perlas	Curetis	
Mezclador tipo vórtex	por ejemplo, IKA	o equivalente
Centrifugadora (13000 rpm)	por ejemplo, Heraeus Biofuge fresco	o equivalente

Composición del tubo de lisis	
artículo	cantidad/concentración
Perlas de vidrio, 600 µm, lavadas con ácido	140 mg
Solución reguladora de lisis AL	230 µl

Solución de DTT 1 M	10 µl
Proteinasa K	20 µl (adicionada junto con la muestra)
Muestra del paciente	220 µl
Volumen total (reacción final)	480 µl

Preparación y almacenamiento de tubos de lisis (tubos de reacción listos para el uso)

5 Los tubos de lisis contienen 140 mg +/- 20 mg de perlas de vidrio, 230 µl +/- 5 µl de solución reguladora de lisis AL, 10 µl +/- 2 µl de DTT 1M. Los tubos se almacenan a una temperatura entre 15 y 25°C. La proteinasa K se almacena por separado sin contacto con solución reguladora AL entre 15 y 25°C, ya sea en forma líquida o como mancha seca (por ejemplo, en el interior de una tapa de rosca).

Vista general del procedimiento

10 El método de acuerdo con la presente invención se puede llevar a cabo ya sea manualmente usando equipos de laboratorio estándar como mezcladores (agitador tipo vórtex) y bloques de calentamiento o automatizados usando un dispositivo automatizado tal como un molino de perlas. Los ejemplos para un procedimiento manual y un procedimiento automatizado de acuerdo con la presente invención se proporcionan en las figuras 1 y 2, respectivamente.

15 Más preferiblemente, para mejores eficiencias y tiempos de procedimiento reducidos, el procedimiento se realiza usando un dispositivo de molienda con perlas, que es capaz de realizar agitación, tal como rotación alrededor de varios ejes, y etapas de calentamiento simultáneamente, lo que permite la automatización completa del método de procedimiento de acuerdo con la presente invención.

20 El ejemplo A del procedimiento (Figura 1) es un procedimiento manual que utiliza un agitador tipo vórtex estándar para mezclar a 2500 rpm (velocidad máxima estándar para un agitador tipo vórtex IKA, los dispositivos de otros proveedores pueden variar) durante 30 segundos (otros tiempos podrían funcionar también), bloques de calentamiento precalentados y un dispositivo de molienda con perlas capaz de alcanzar una velocidad de molienda relativa de aprox. 100 g (otras velocidades pueden funcionar también, y la velocidad puede variar para otros dispositivos con geometría diferente). Obsérvese que para todas las etapas de molienda/mezcla se retiraron los tubos del bloque de calentamiento y se procesaron a temperatura ambiente.

25 El ejemplo B del procedimiento (figura 2) es un procedimiento automatizado que utiliza un dispositivo de molienda con perlas que realiza todas las etapas del procedimiento. Las velocidades de molienda se relacionan con fuerzas entre 50-100 g dependiendo de las geometrías del dispositivo. A medida que los tubos se calientan junto con las cámaras a las temperaturas objetivo se incluyen velocidades de rampa más largas en este ejemplo, aun así, los tiempos de rampa no son críticos y también pueden ser considerablemente más cortos.

Etapas del método

30 Entrada de muestra

35 El volumen de la muestra fue de 220 µl +/- 10 µl. Después de adicionar la muestra y la proteinasa K al tubo de lisis, el tubo se mezcló vigorosamente usando un agitador tipo vórtex o molino de perlas a alta velocidad (hasta 100 g) durante 1 minuto para asegurar una buena homogeneización de la muestra y de la solución reguladora de lisis. La adición de la muestra se realizó bajo un flujo laminar. Si se sospechaba de infección por el complejo de *Mycobacterium tuberculosis*, todos los trabajos se llevaron a cabo hasta que se realizó la etapa de calentamiento a 96°C en un laboratorio S3. En general, también se usaron puntas de filtro para la pipeteado para evitar la contaminación cruzada de las muestras. Se recomienda el uso de puntas de filtro inclinadas con abertura ensanchada para pipetear alícuotas de muestras altamente viscosas.

Etapas de calentamiento

40 La primera etapa de calentamiento se realizó a 56°C +/- 1°C durante 10 minutos para la digestión con proteinasa K. La segunda etapa de calentamiento se realizó a 96°C +/- 1°C durante 15 minutos para la lisis térmica. Esta etapa preferiblemente no se reduce por debajo de 5 minutos para asegurar la licuefacción completa. Si esta etapa se realiza para reducir el riesgo de infección, los requisitos legales pueden ser aplicables en diferentes entornos clínicos para la duración mínima del calentamiento. Durante y entre etapas de incubación de 56°C y 96°C, los tubos se pueden mezclar o moler brevemente hasta 1 minuto a varias velocidades para resolver cualquier trozo de muestra no licuado.

Molienda con perlas

- La molienda con perlas se realizó con un dispositivo de molienda con perlas capaz de moler y calentar en paralelo. Alternativamente, la muestra puede ser procesada manualmente mediante mezcla vigorosa usando un agitador tipo vórtex. Pueden realizarse etapas de molienda cortas a lo largo de todo el protocolo, ya sea manualmente usando un agitador tipo vórtex o usando el dispositivo de molienda con perlas con 50-100 g. Una etapa de molienda final se realizó a temperatura ambiente durante varios minutos (5 minutos) después de completar la etapa de calentamiento a 96°C o, preferiblemente, para mejorar las eficiencias de lisis y reducir los tiempos de procedimiento, durante la etapa de calentamiento a 96°C con una fuerza de hasta 100 g y un tiempo de molienda de varios minutos (5 minutos) usando el dispositivo de molienda con perlas. Si el tiempo de incubación a 96°C excedía el tiempo de molienda, se llevó a cabo otra etapa de molienda corta al final del procedimiento.
- 5
- 10 Finalización del procedimiento
- Los tubos de lisis se enfriaron a una temperatura razonable después de que el procedimiento haya terminado para evitar cualquier peligro (quemaduras) para el usuario cuando se retira el tubo del lisador.
- Transferencia de sobrenadante y purificación de ADN
- Se han utilizado puntas de filtro para todas las etapas de pipeteo. Se transfirieron 400 μl +/- 10 μl de sobrenadante licuado a un nuevo tubo de tapa de rosca de 1.5 ml. Se adicionaron 200 μl +/- 10 μl de etanol al 96% al sobrenadante y el tubo se mezcló brevemente. La mezcla (aproximadamente 600 μl) se cargó en una columna de membrana de sílica (QiaAmp™) y se trató ya sea por centrifugación o por vacío de hasta -800 mbar de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.
- 15
- Protocolo completo de lisis
- 20 Se han almacenado tubos de lisis listos para usar que contienen todos los reactivos necesarios y proteinasa K (ya sea líquida o seca) a temperatura ambiente. Se recogieron muestras de pacientes frescas de acuerdo con los procedimientos clínicos estándar. Se transfirió una alícuota de la muestra (220 μl) a un tubo de lisis. Se adicionó proteinasa K (20 μl) y la tapa de rosca del tubo de lisis se cerró herméticamente. Para la transferencia de las partes alícuotas de la muestra mucosa, se utilizaron puntas de pipeta de 1000 μl cortadas al sesgo.
- 25 Para el procedimiento manual, el tubo se mezcló brevemente por vórtex para asegurar un contacto óptimo de la solución reguladora de lisis con la muestra, en particular, para especímenes altamente viscosos. El tubo se colocó entonces en un bloque de calentamiento (56°C) durante 10 minutos para una digestión óptima de proteinasa K. Después de la digestión, el tubo se mezcló brevemente y se transfirió a un bloque de calentamiento (96°C) para una segunda etapa de calentamiento de 15 minutos. Una o dos veces durante las dos etapas de calentamiento, la muestra se puede extraer, se agita brevemente en agitador tipo vórtex y se transfiere de nuevo al bloque de calentamiento. Después de completarse la etapa de calentamiento a 96°C, la muestra se transfirió a un dispositivo de molienda con perlas (alternativamente, se pudo usar un agitador tipo vórtex) y se realizó la molienda con perlas durante 5 minutos (hasta 100 g) para resolver cualquier partícula de muestra no lisada. Después de que se completaran todas las etapas de lisis, se transfirieron 400 μl del sobrenadante licuado a un nuevo tubo con tapa de rosca.
- 30
- 35 Para el procedimiento automatizado, el tubo de lisis se colocó en el dispositivo de molienda con perlas inmediatamente después de la adición de la muestra y de la proteinasa K, y se inició el procedimiento de lisis sin ningún otro requisito de manipulación o mezclado para el usuario (Figura 2). Una vez completado el procedimiento, los tubos que contenían las muestras lisadas se retiraron del dispositivo y los sobrenadantes se transfirieron como se ha descrito.
- 40 Para la purificación del ADN QiaAmp™, se adicionaron 200 μl de etanol (96%) al sobrenadante transferido. Después de mezclar brevemente, el lisado se transfirió a una columna de centrifugación QiaAmp™ (Qiagen). Se llevaron a cabo otras etapas de purificación de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. El ADN se eluyó con 200 μl de agua pura.
- 45 Ejemplo 2: Variabilidad del tipo de muestra e impacto de las características de lisis
- Se puntuaron 76 muestras de diferentes orígenes (respiratorias y otras muestras relevantes, como punciones y drenajes) para determinar la viscosidad, la sangre y el contenido de sedimentos para describir las diferencias de los tipos de muestra basándose en el puntaje promedio (Figura 3). El número de muestras incluido para cada tipo se indica entre paréntesis. De cada tipo de muestra, incluida la sangre, se seleccionaron muestras de referencia para cubrir toda la gama de muestras pertinentes para enfermedades respiratorias (total: 12 muestras).
- 50 Cada una de estas muestras se sometió a tres protocolos de lisis diferentes para determinar el impacto de características individuales de lisis: (a) protocolo completo manual como se describe anteriormente, (b) protocolo completo sin adición de proteinasa K, (c) protocolo sin etapa de calentamiento a 96°C (en lugar de la muestra se colocó a temperatura ambiente). Todas las muestras han sido sometidas a una etapa final de molienda con perlas de 5 minutos, el lisado se transfirió entonces, se mezcló con etanol y se aplicó a una columna de membrana de sílica
- 55

como se describe. Las eficiencias de lisis se puntuaron tras la digestión con proteinasa K (primera etapa de calentamiento), la etapa de calentamiento a 96°C, y la molienda con perlas, y se determinaron las eficiencias de lisis.

El flujo directo de las membranas de sílica se controló usando una centrifuga a velocidad reducida (4000 rpm en lugar de 8000 rpm recomendadas), después de la aplicación de todo el volumen de la muestra, se verificaron las membranas para el colorante o los componentes restantes de la muestra lo que podría indicar una lisis insuficiente (Figura 4). Dos muestras resultaron en membranas ligeramente coloreadas, sin embargo, esto no tuvo ningún impacto en el flujo directo. No se han detectado trozos de muestra no lisados en las membranas de sílica. Para otra muestra se detectó una ligera coloración y alguna restricción de flujo, aunque la lisis se completó. La figura 5 muestra ejemplos típicos de muestras de pacientes lisadas con éxito usando el método de procedimiento de la presente invención (A/B: esputo, C: secreción traqueal).

Ejemplo 3: Eficacia de la lisis y comportamiento del flujo directo de membranas de sílica sin tratamiento con proteinasa K

En un segundo conjunto de experimentos, se examinó el impacto de la digestión con proteinasa K, calentamiento, molienda y calentamiento/molienda paralelos con secreciones traqueales. En particular, se han seleccionado muestras con altas viscosidades y/o sedimentos. Es probable que tales muestras sean difíciles de lisar. En una primera etapa, las muestras se incubaron a 96 °C durante 15 minutos directamente después de la adición a la solución reguladora de lisis (sin proteinasa K) y una mezcla de corta duración. La molienda con perlas se realizó durante 5 minutos a temperatura ambiente después de completar la etapa de incubación a 96°C [M] o paralela a la etapa de calentamiento. El progreso de la lisis se controló con el tiempo. Los sobrenadantes lisados se mezclaron entonces con etanol y se aplicaron a membranas de sílica como se describe anteriormente. El flujo directo se controló al aumentar las fuerzas centrífugas comenzando a 4000 rpm. Las figuras 6A y 6B muestran cada una dos ejemplos que reflejan la variabilidad observada para diferentes muestras.

Varias muestras mostraron restricciones de flujo, aunque la lisis parecía ser suficiente mediante observación visual. A veces se observaba una ligera turbidez que no se correlacionaba con flujos reducidos. Una muestra (secreción traqueal 1) no se lisó completamente cuando no se realizó una molienda paralela a 96°C.

La molienda paralela durante la etapa de incubación a 96°C disminuyó el tiempo requerido para la lisis completa y tuvo un efecto significativo sobre la velocidad del procedimiento y el éxito de la lisis.

Ejemplo 4: Eficacia de la lisis y comportamiento del flujo directo de membranas de sílica con procedimiento con proteinasa K

Se incluyó una etapa de digestión con proteinasa K (56°C durante 10 minutos) y se lisaron y se monitorizaron alícuotas de las mismas muestras que se usaron para el ejemplo 3 como se describe para el ejemplo 3.

Algunas muestras ya se lisaron durante la etapa de digestión de proteinasa K, mientras que otras no cambiaron por digestión con proteinasa K. Se redujo la turbidez y se mejoró mucho el flujo directo. Ciertas muestras que requirieron mayores fuerzas centrífugas cuando se lisaron sin la etapa de digestión con proteinasa K se realizaron ya muy bien ya a fuerzas centrífugas bajas. No se ha observado más la muestra residual no lisada (Figura 7).

De este modo, la etapa de digestión con proteinasa K es ventajosa para la lisis de muestras corporales, por ejemplo, para esputos o secreciones, en particular, si se pretende un procedimiento de aislamiento de ácido nucleico usando fuerzas centrífugas bajas o un sistema basado en vacío. Como en el ejemplo 3, la molienda paralela durante el calentamiento mostró un claro aumento en la eficiencia de la lisis y la reducción del tiempo de procedimiento.

Ejemplo 5: Calidad de ADN y rendimiento de PCR con diferentes tipos de muestras

Siete muestras de pacientes de diferentes orígenes se reforzaron con *Pseudomonas aeruginosa* (20000 patógenos/ml = 4400 patógenos/220 µl de muestra usada) y se lisaron usando el protocolo manual como se describe anteriormente en el ejemplo 1 y se muestra en la figura 1. El ADN se aisló con Kit de sangre de ADN Qia Amp usando una centrifuga. La calidad del ADN que se aisló de las muestras de pacientes reforzadas se controló mediante análisis espectral del eluato diluido 5 veces (220-320 nm) (Figura 8).

La copurificación putativa de los inhibidores de la PCR se comprobó mediante una prueba de inhibición de la PCR. En resumen, se adicionaron 3 µl de 200 µl de eluato a los PCR, que producen, en ausencia de cualquier efecto inhibidor, 3 amplicones de tamaño diferente con una molaridad promedio conocida. Para las pruebas de inhibición, las molaridades generadas en presencia de los eluatos de ADN se compararon con 4 PCR de control (eluatos generados a partir de solución salina regulada con fosfato)

Además, se realizó una PCR de *P. aeruginosa* y se compararon las molaridades de amplicón y los rendimientos de ADN de los eluatos (Figura 10).

Todos los espectros muestran la apariencia típica de ADN puro. Además, no se observó inhibición frente a los controles. El rendimiento de ADN, sin embargo, varía fuertemente, reflejando el nivel de referencia de ADN de

muestras individuales. Sin embargo, el nivel de amplificación de *P. aeruginosa* se encontraba en un rango comparable, aunque hubo cierta variabilidad, en particular, para muestras viscosas que son difíciles de mezclar con las suspensiones de patógenos durante el refuerzo.

Ejemplo 6: Detección de patógenos en diferentes tipos de muestras de pacientes corporales

5 Se analizaron 27 muestras de pacientes usando el protocolo de lisis manual como se describe anteriormente en el ejemplo 1 y la figura 1. El ADN purificado con membrana de sílica se analizó usando PCR múltiples para detectar patógenos respiratorios comunes (*Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, y especie *Streptococcus* como indicador de flora huésped). En resumen, se amplificaron 3 µl de eluato de ADN con el Kit Multiplex PCR (Qiagen) junto con
10 cebadores multiplexados (concentración final de cada uno 350 nM) en un volumen total de 30 µl durante 35 ciclos. Las molaridades de amplicón se determinaron usando un bioanalizador de Agilent (Figura 11).

Los resultados de PCR se compararon con los datos obtenidos de las pruebas de cultivo microbiológico para estas muestras (Figura 12). Para la mayoría de las muestras, las pruebas de cultivo microbiológico no identificaron patógenos en un nivel de género, sino que más bien detectaron cocos, bastoncillos o flora respiratoria (huésped) en
15 general. De hecho, las pruebas de cultivo microbiológico fueron capaces de identificar un género patógeno en sólo 5 muestras, y todos ellos fueron confirmados por un resultado positivo de PCR. Tener en cuenta que los cebadores de *Haemophilus* utilizados en esta prueba no discriminan entre las especies *influenzae* y *parainfluenzae*. Los resultados de estos experimentos demuestran claramente que la PCR permite un análisis y un diagnóstico mucho más sofisticados de las enfermedades respiratorias al proporcionar información más diferenciada sobre los patógenos
20 individuales que las pruebas de cultivo microbiológico.

Ejemplo 7: Realización del protocolo de lisis automatizado con muestras clínicas

Se ha desarrollado un dispositivo para la automatización completa del procedimiento de lisis y se probó el rendimiento aplicando el "ejemplo B de procedimiento" (Figura 2) en muestras clínicas que han sido probadas
25 positivas con cultivo microbiológico. Los resultados se compararon con el protocolo de lisis manual (Figura 1). Se seleccionaron secreciones traqueales con viscosidades elevadas para esta prueba. El aislamiento de ADN de los lisados se realizó usando membranas de sílica como se describe anteriormente y se realizó PCR triple en eluatos con cebadores específicos de *Pseudomonas*-, *Staphylococcus*- y *Candida* (Figura 13).

Para excluir cualquier efecto de la congelación y descongelación de la muestra para la lisis de patógenos, se realizó un segundo conjunto de muestras reforzadas con *Pseudomonas aeruginosa* (gramnegativo) y *Staphylococcus aureus* (grampositivo) a 20000 patógenos/ml y se procesaron usando el protocolo manual o el automatizado (Figura
30 14).

Ambos protocolos, esto es, el protocolo manual y el automatizado, lograron reproducir los resultados obtenidos mediante pruebas de cultivo microbiológico. Además, se han detectado patógenos reforzados en niveles comparables en todas las pruebas. De este modo, el procedimiento automatizado es tan eficiente como el
35 procedimiento manual.

Los datos experimentales sostienen fuertemente que la presente invención facilitará el diagnóstico molecular para muestras respiratorias para una amplia gama de todos los tipos de muestras relevantes mediante el uso de un protocolo estandarizado fácil de usar. La lisis se puede combinar con procedimientos de aislamiento de ácidos nucleicos, por ejemplo, usando membranas de sílica, para obtener ADN de alta calidad para PCR posterior. Dicho
40 ADN se puede usar para la detección rápida y simultánea de patógenos y factores de riesgo de una manera mucho más rápida y eficiente en comparación con el cultivo microbiológico estándar. Los tubos de lisis repartidos en alícuotas previamente reducen la variación de muestra a muestra, las etapas de manipulación y el riesgo de infección. El procedimiento automatizado permite el procedimiento de muestras fácil y uniforme sin la necesidad de personal entrenado y la interacción del usuario.

45

REIVINDICACIONES

1. Uso de una solución reguladora que comprende:
 - (i) al menos un agente caotrópico,
 - (ii) al menos un agente reductor, y
 - 5 (iii) al menos una enzima proteolítica

para el procedimiento de una muestra respiratoria, en la que el procedimiento comprende la lisis y licuefacción de dicha muestra respiratoria, y en la que dicha muestra respiratoria se selecciona del grupo que consiste en esputo, pus de la cavidad paranasal, secreción bronquial, secreción traqueal, secreción endotraqueal, aspirado bronquial, aspirado traqueal, aspirado endotraqueal, lavado bronquial, lavado broncoalveolar, hisopado bronquial, hisopado nasofaríngeo, hisopado laríngeo y biopsia pulmonar.
- 10 2. El uso según la reivindicación 1, en el que la solución reguladora comprende además perlas, preferiblemente hechas de un material inerte sólido tal como vidrio, cerámica, plástico o metal tal como acero.
3. El uso según la reivindicación 1 o 2, en el que la solución reguladora es de aplicación universal para el procedimiento de muestras respiratorias que son relevantes para el diagnóstico de una enfermedad respiratoria.
- 15 4. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el al menos un agente caotrópico se selecciona del grupo que consiste en tiocianato de guanidinio, isotiocianato de guanidinio, clorhidrato de guanidinio, cloruro de guanidinio, tiocianato de álcali, isotiocianato de álcali, yoduro de álcali, y perclorato de álcali, y/o el al menos un agente reductor se selecciona del grupo que consiste en ditioneitol (DTT), N-acetilcisteína (NALC), beta-mercaptoetanol, Tris(2-carboxietil) fosfina (TCEP), y tiorredoxina, y/o la al menos una enzima proteolítica se selecciona del grupo que consiste en una serina proteasa y una cisteína proteasa, preferiblemente la al menos una enzima proteolítica se selecciona del grupo que consiste en proteinasa K, elastasa, subtilisina, y caspasa.
- 20 5. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la solución reguladora no contiene ninguna otra enzima que la al menos una enzima proteolítica.
- 25 6. Un método de procedimiento de una muestra respiratoria, en el que el procedimiento comprende la lisis y licuefacción de dicha muestra respiratoria, dicho método que comprende la etapa de (i) poner en contacto la muestra respiratoria que se va a tratar con al menos un agente caotrópico, al menos un agente reductor y al menos una enzima proteolítica, y la mezcla de la muestra respiratoria, el al menos un agente caotrópico, el al menos un agente reductor y la al menos una enzima proteolítica, preferiblemente que comprende además la etapa de (ii) calentar la mezcla a una primera temperatura, y/o preferiblemente que comprende además la etapa de (iii) calentar la mezcla a una segunda temperatura, y/o preferiblemente que comprende además la etapa de (iv) molienda con perlas de la mezcla,
- 30 en la que la muestra respiratoria se selecciona del grupo que consiste en esputo, pus de la cavidad paranasal, secreción bronquial, secreción traqueal, secreción endotraqueal, aspirado bronquial, aspirado traqueal, aspirado endotraqueal, lavado bronquial, lavado broncoalveolar, hisopado bronquial, hisopado nasofaríngeo, hisopado laríngeo y biopsia pulmonar.
- 35 7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la etapa (iv) se realiza simultáneamente a o durante la etapa (iii).
8. El método de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, en el que las etapas (ii) a (iv) se realizan en un procedimiento automatizado.
- 40 9. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, que comprende además la etapa de (v) aislar un ácido nucleico de la mezcla, preferiblemente usando una tecnología de aislamiento de ácido nucleico basada en perlas magnéticas o basada en sílica.
10. Un método de análisis de una muestra respiratoria que comprende el procedimiento de la muestra respiratoria de acuerdo con el método de cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9 y (vi) aplicar la mezcla a un método de amplificación/análisis de ácido nucleico.
- 45 11. Un método de detección de la presencia de un patógeno en una muestra respiratoria que comprende el procedimiento de la muestra respiratoria de acuerdo con el método de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9 y (vi) aplicar la mezcla a un método de amplificación/análisis de ácido nucleico que es apropiado para la detección de dicho patógeno, en el que preferiblemente el patógeno está asociado con una enfermedad respiratoria.
- 50 12. Un método de diagnóstico de una enfermedad respiratoria en un sujeto que comprende el procedimiento de una muestra respiratoria de acuerdo con el método de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9 y (vi) aplicar la

mezcla a un método que es apropiado para diagnosticar la enfermedad respiratoria, en el que preferiblemente la enfermedad respiratoria es una enfermedad respiratoria infecciosa o un tumor del sistema respiratorio.

- 5 13. Un método de procedimiento de al menos dos muestras respiratorias que comprende el procedimiento de cada una de las al menos dos muestras respiratorias de acuerdo con el método de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, en el que al menos dos muestras respiratorias son diferentes tipos de muestras respiratorias.

FIGURA 1

Ejemplo A del procedimiento

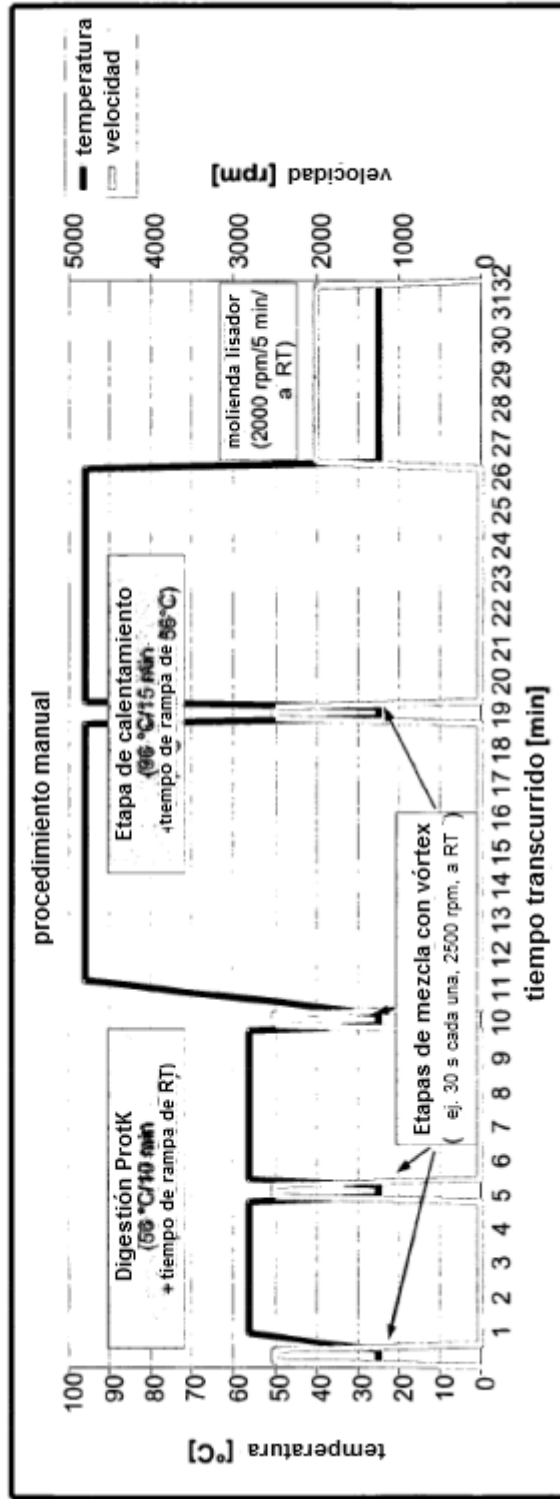


FIGURA 2

Ejemplo B del procedimiento

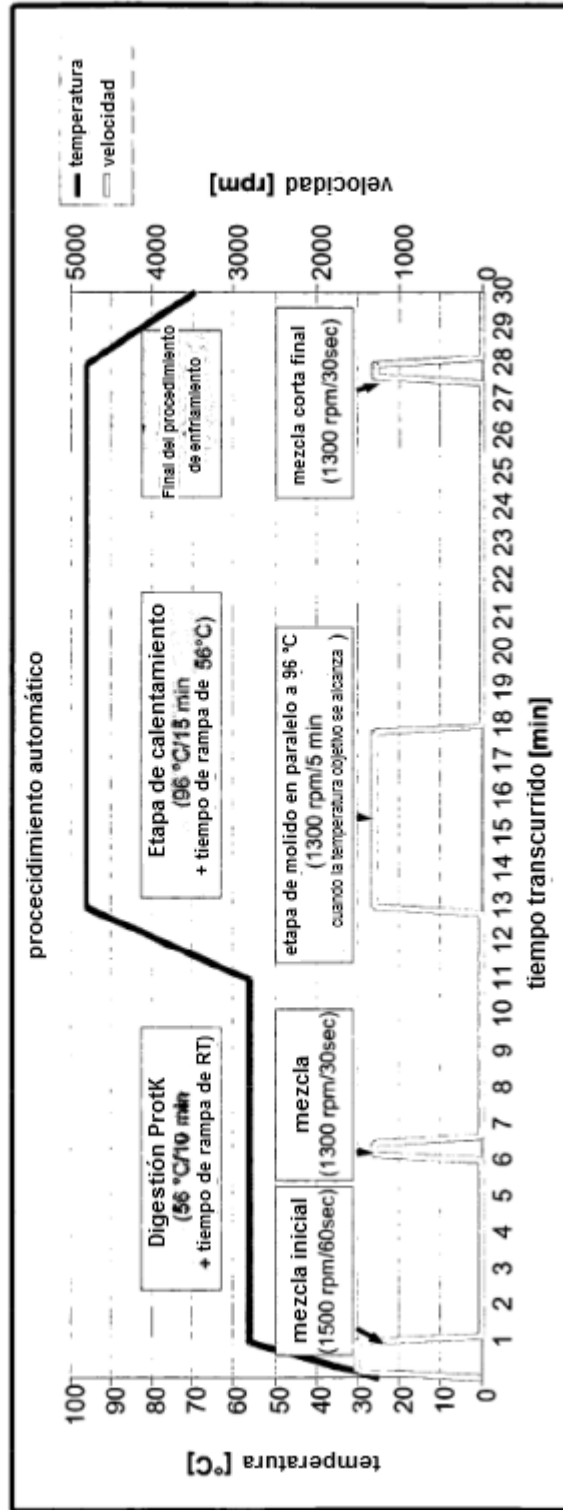


FIGURA 3

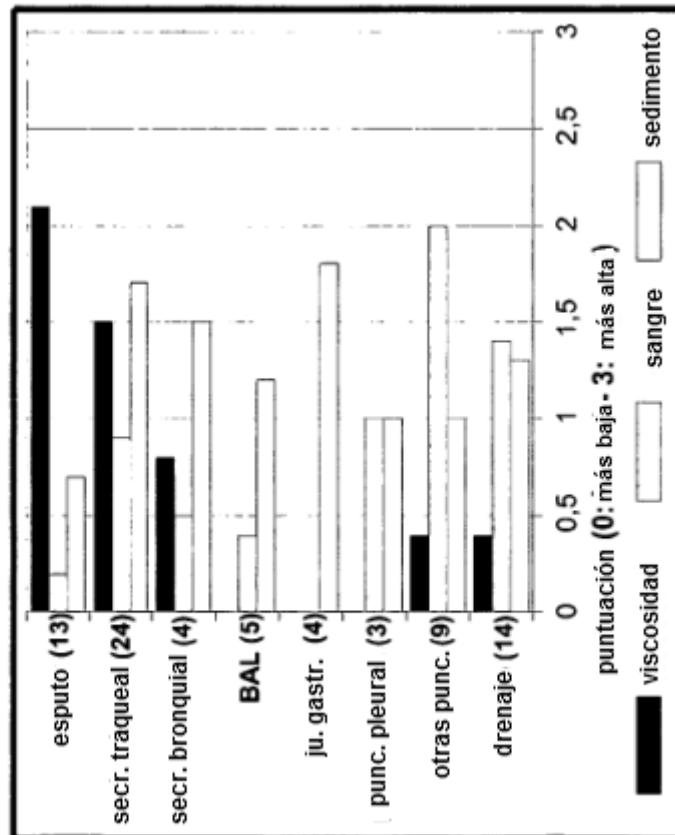


FIGURA 4

	viscosidad				sangre			sedimento			impacto en lisis				rendimiento (protocolo completo)	
												ProtK	96°C	molienda	lisis	membrana de sílica
esputo	+++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)	+	++	OK	OK	
secreción traqueal	++	0	0	+++	0	0	+++	+	+	+	++	++	+	ligera turbidez	ligera coloración	
secreción traqueal	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	0	0	0	OK	OK	
secreción bronquial	++	0	0	++	0	0	++	+	+	+	+	+	0	OK	OK	
BAL	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	OK	OK	
jugo gástrico	0	0	0	++	0	0	++	++	++	++	0	0	0	OK	OK	
punción pleural	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	OK	OK	
punción/sangre	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	0	++	+	OK	ligera coloración	
punción	+	+	0	0	+	0	0	0	0	0	++	0	0	OK	OK	
drenaje	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	0	0	0	OK	ligera coloración	
drenaje	+	+	+	++	+	+	++	++	++	++	0	0	0	OK	OK	
sangre	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	++	0	0	OK	OK	

FIGURA 5

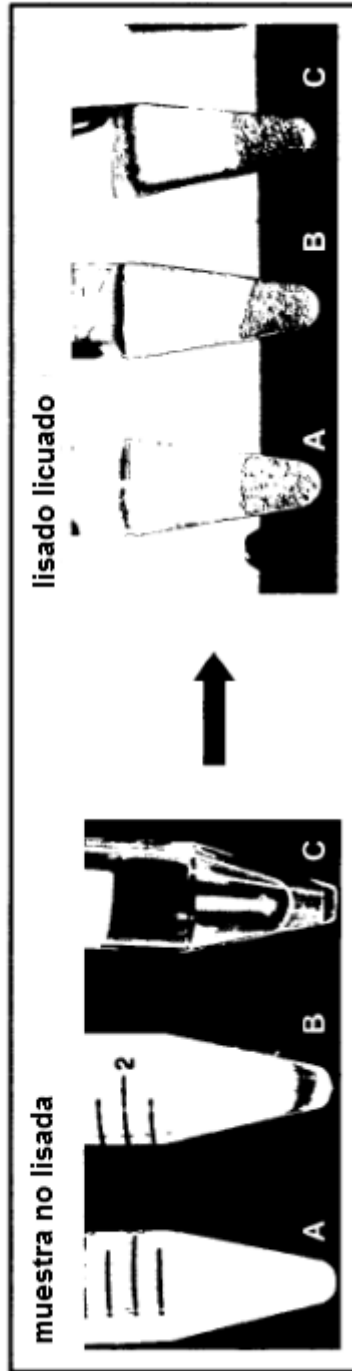


FIGURA 6A

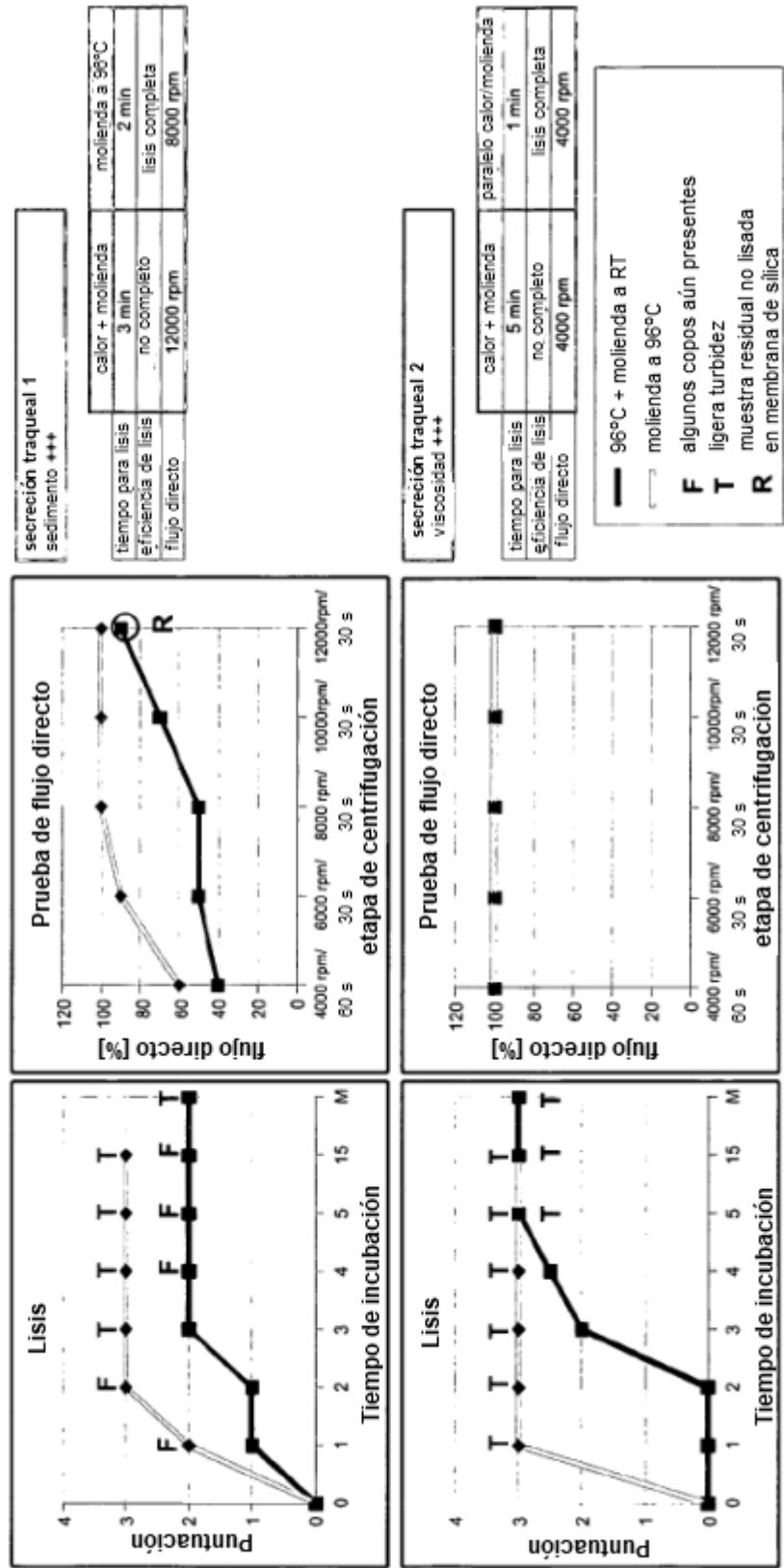


FIGURA 6B

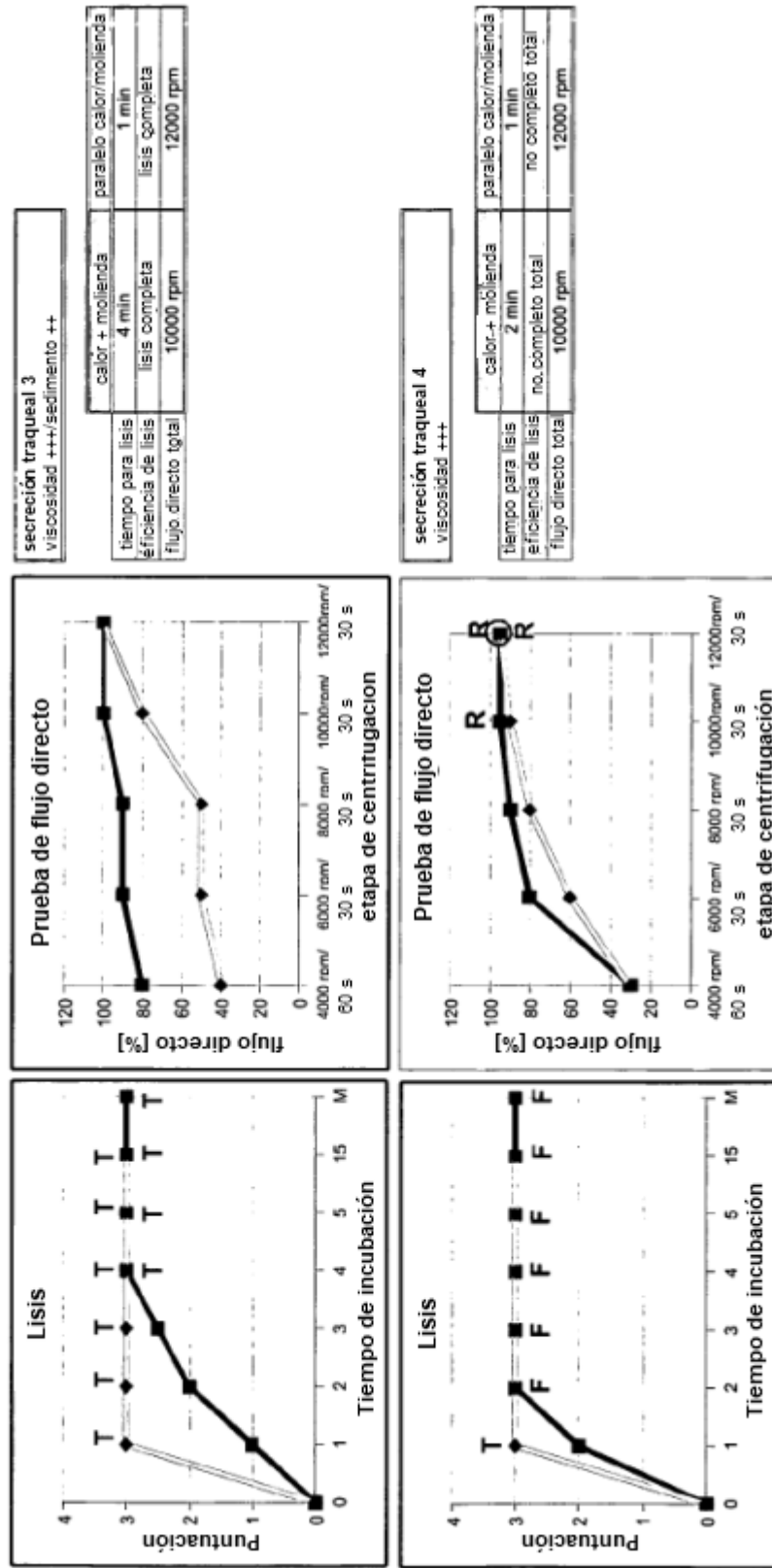


FIGURA 7A

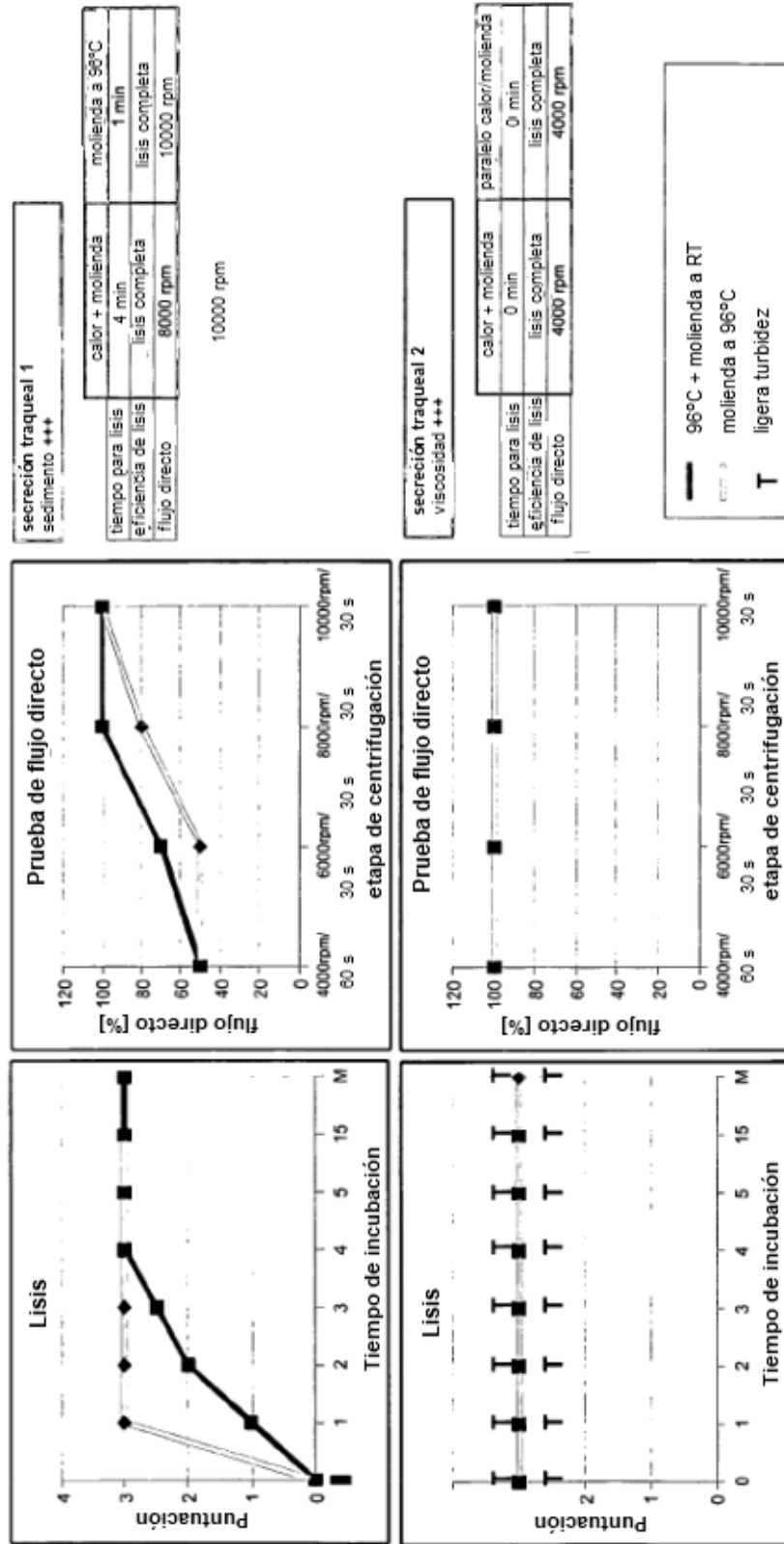


FIGURA 7B

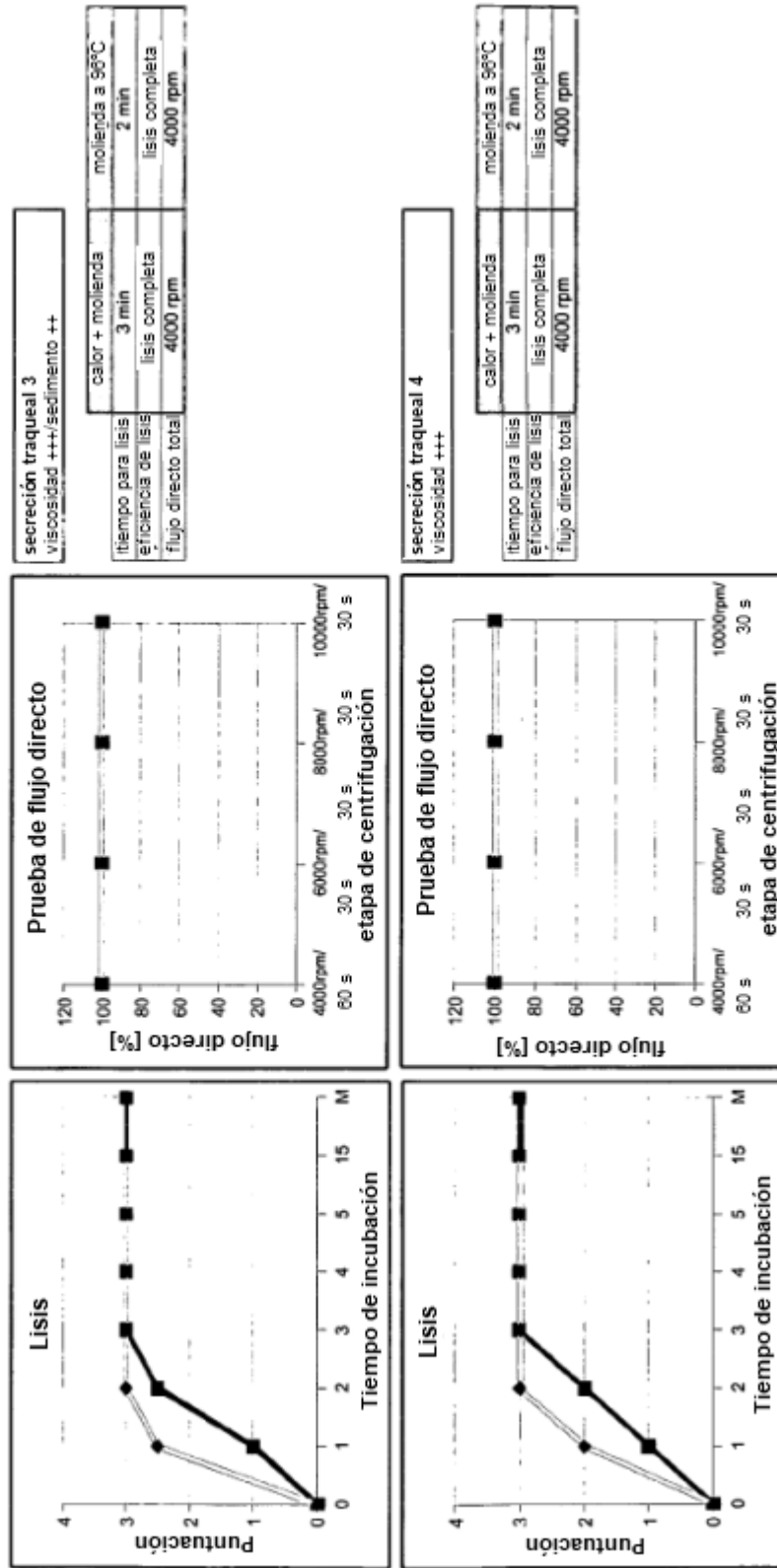


FIGURA 8

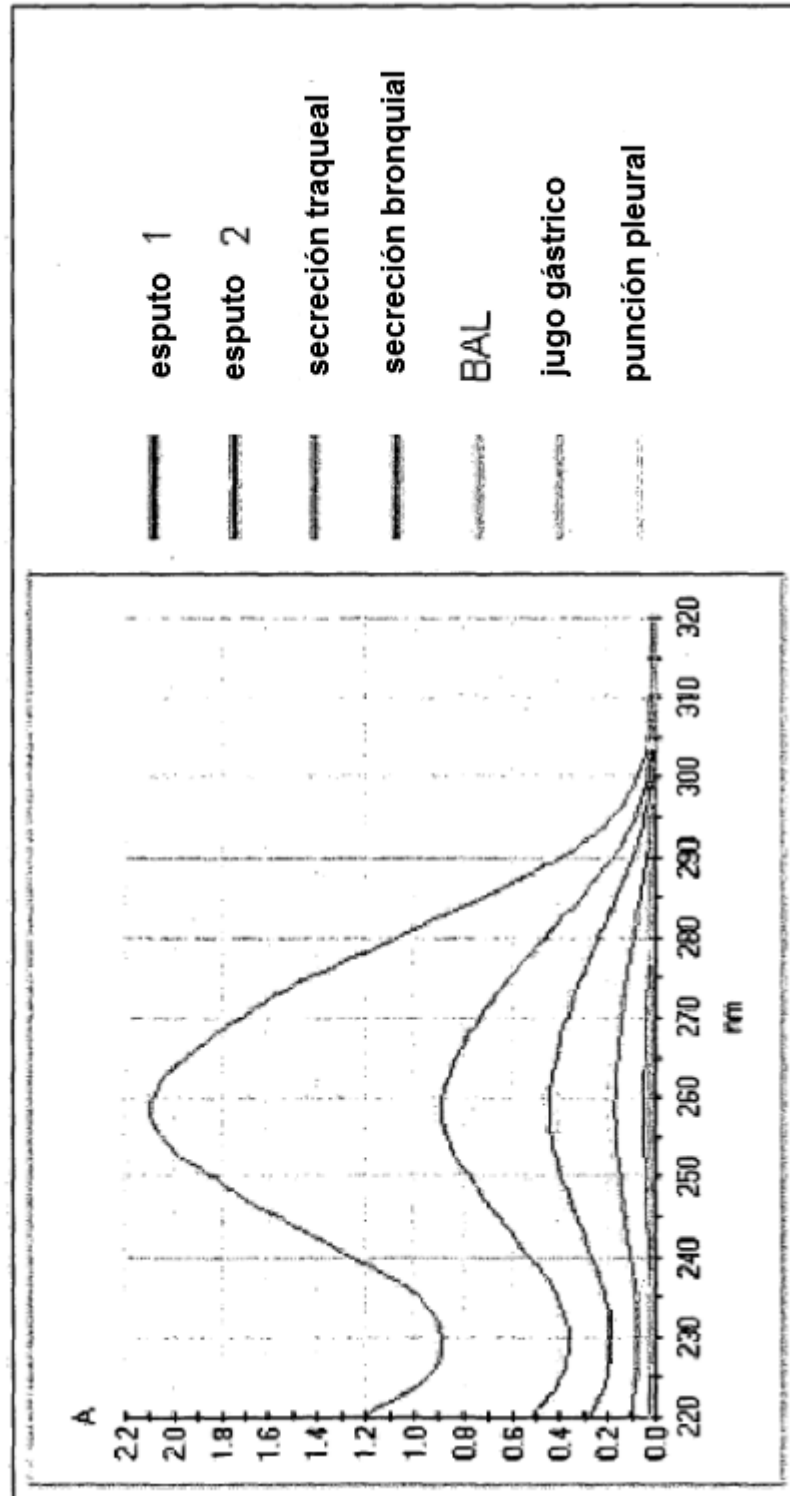


FIGURA 9

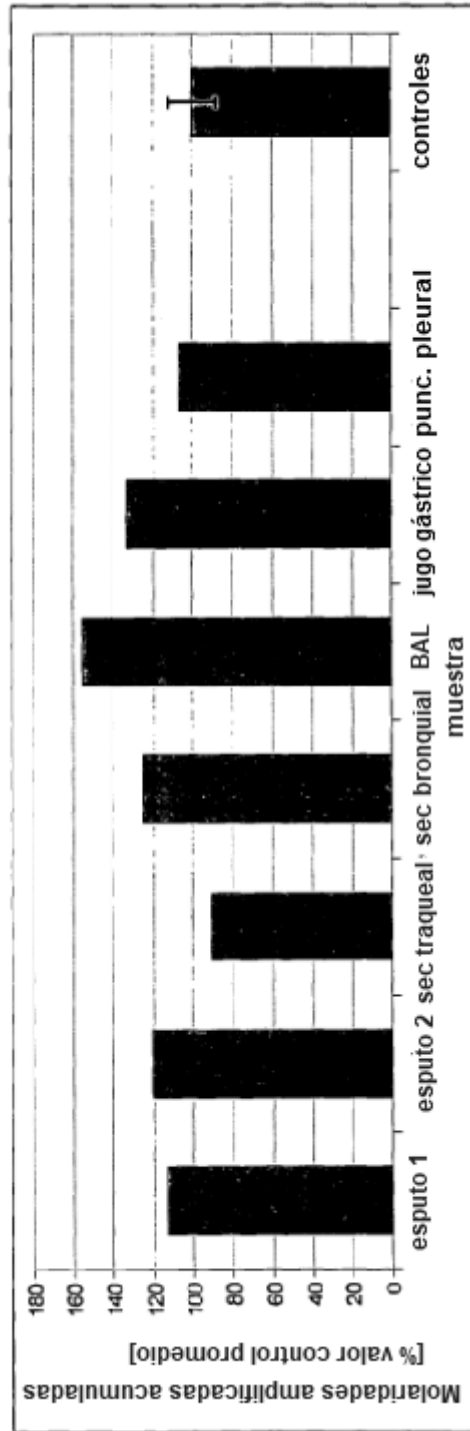


FIGURA 10

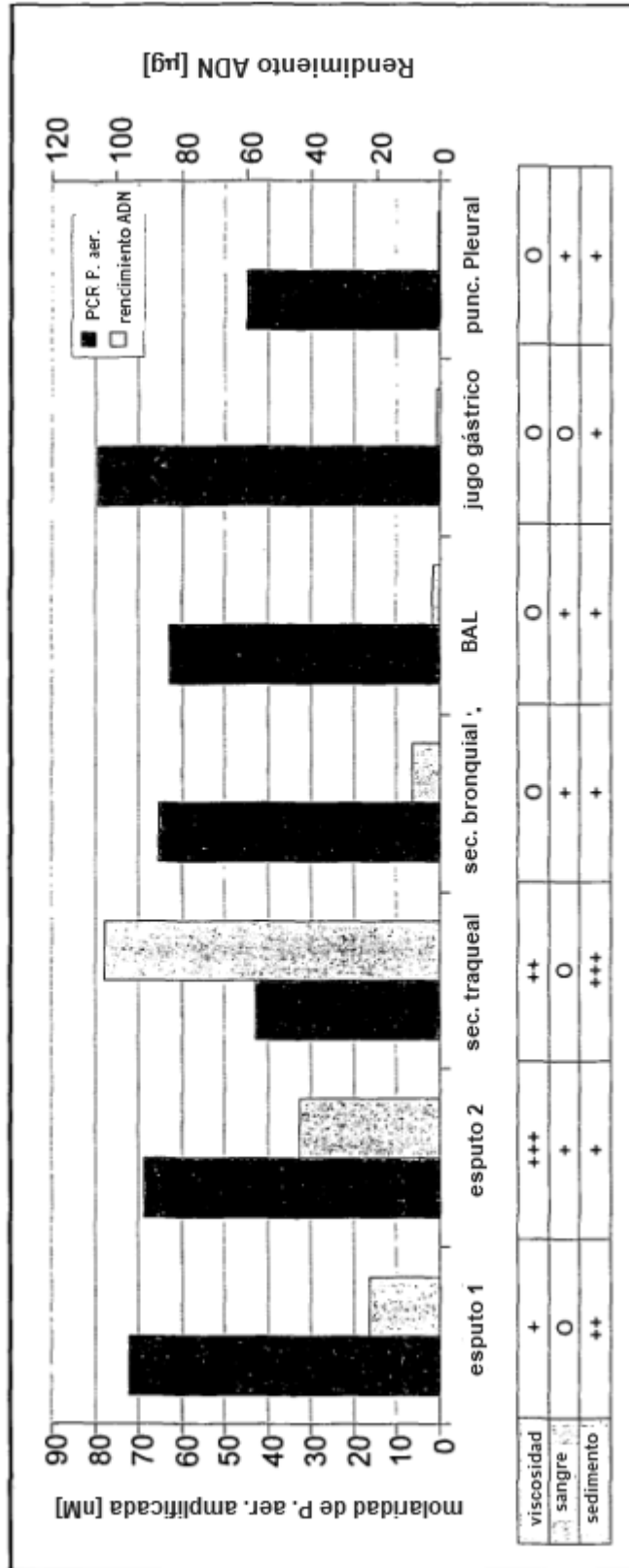


FIGURA 11

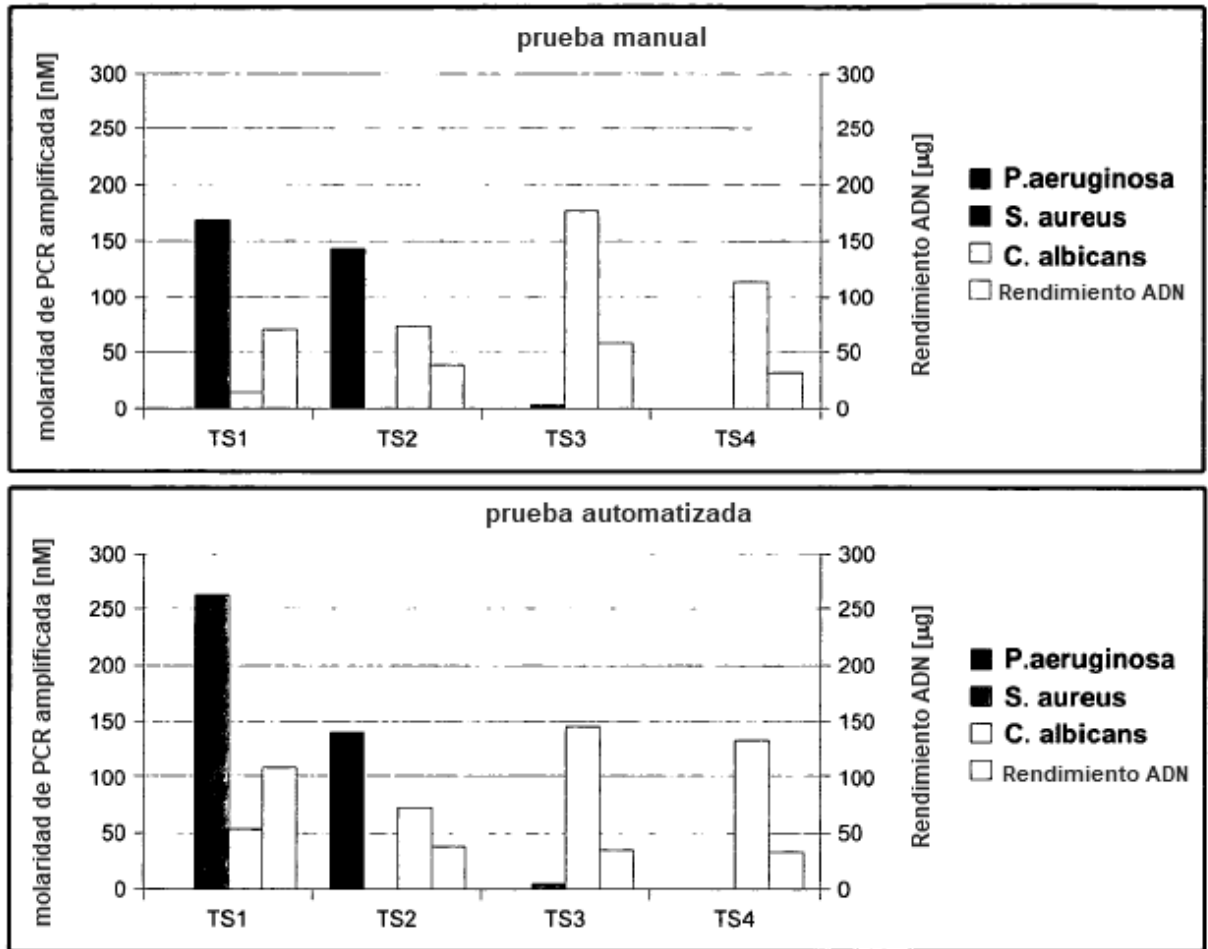
	PCR 1			PCR 2			Str. species
	K. pneum.	Str. pn.	P. aer.	S. aur.	Haem.	E. coli	
esputo	1	0	0	0	0	0	S. pneumoniae
	2	++	0	0	0	0	K. pneum., S. pneum., Haem.
	3	0	0	0	++	0	S. aureus, E. coli
	4	0	0	0	0	+	S. pneumoniae
	5	0	0	0	0	0	S. pneumoniae
	6	0	0	0	0	0	negativo
secreción traqueal	1	0	0	0	0	0	negativo
	2	0	+	0	0	++	S. pneum., Haem., E. coli
	3	0	+	0	0	++	S. pneumoniae, E. coli
	4	0	(+)	0	0	0	negativo
	5	0	0	0	0	(+)	negativo
	6	0	++	0	0	0	S. pneumoniae, Haem.
secreción bronquial	1	0	0	0	0	+	E. coli
	2	0	0	0	0	(+)	S. aureus
	3	0	++	0	0	0	S. pneumoniae, Haem.
	4	0	0	0	0	0	negativo
BAL	1	0	0	++	0	0	P. aeruginosa
	2	0	0	0	0	(+)	negativo
	3	0	++	0	0	0	S. pneumoniae, Haem.
	4	0	0	0	0	(+)	negativo
	5	0	++	0	0	(+)	S. pneumoniae, Haem.
jugo gástrico	1	0	++	0	++	0	S. pneum., S. aureus, Haem.
	2	0	0	++	0	0	P. aeruginosa
	3	0	(+)	0	0	0	negativo
	4	0	++	0	++	0	S. pneumoniae, Haem.
punción pleural	1	0	0	0	0	0	negativo
	2	0	0	0	0	0	negativo

> 100 nM	++	10-100 nM	+	1-10 nM	0	< 1 nM (contado como "negativo")
						(+) (0)

FIGURA 12

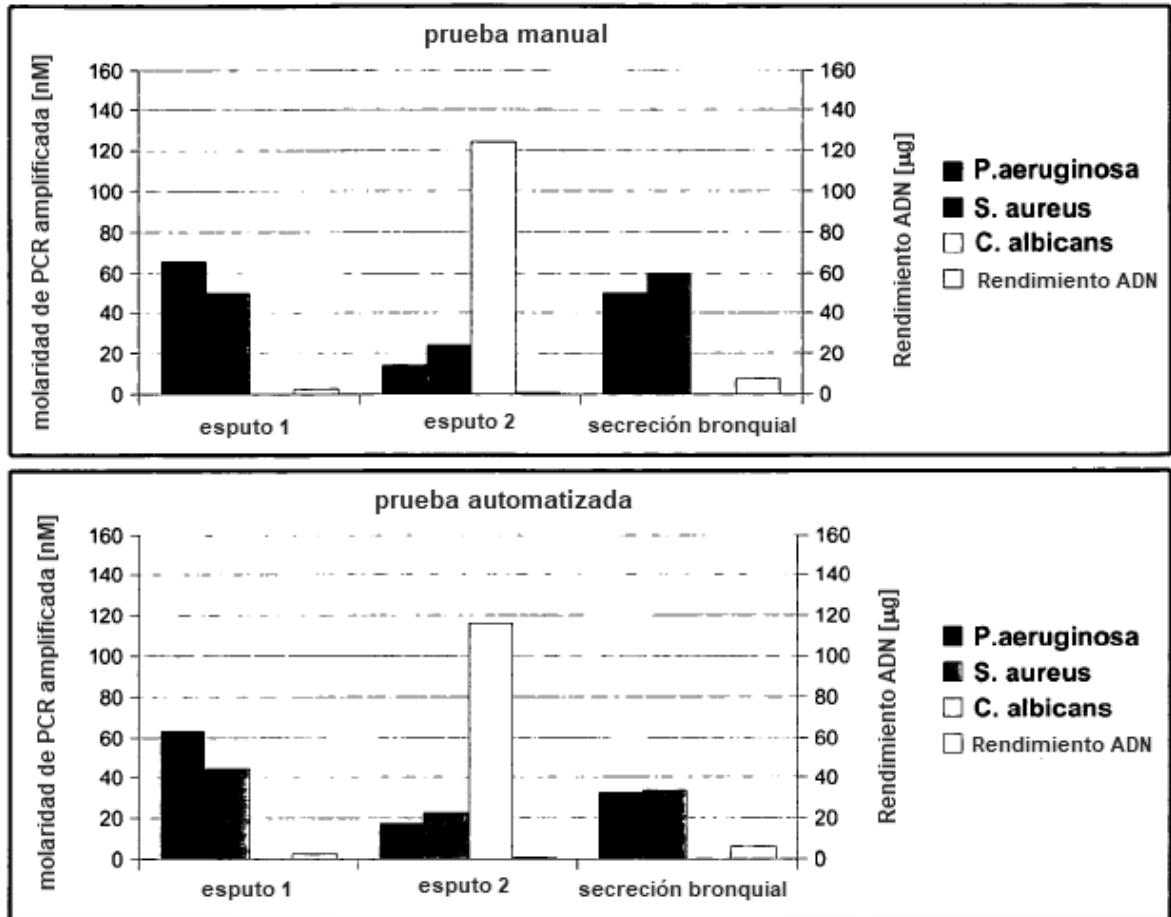
esputo 4	S. pneumoniae	<input checked="" type="checkbox"/>
esputo 5	S. aureus	<input checked="" type="checkbox"/>
secreción traqueal 6	Haemophilus parainfluenzae	<input checked="" type="checkbox"/>
secreción bronquial 3	Haemophilus influenzae	<input checked="" type="checkbox"/>
BAL 1	P. aeruginosa	<input checked="" type="checkbox"/>

FIGURA 13



muestras	diagnóstico microbiológico		
	<i>P.aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
secreción traqueal 1		+	+
secreción traqueal 2	+		+
secreción traqueal 3			++
secreción traqueal 4			++

FIGURA 14



muestras	diagnóstico microbiológico		
	P.aeruginosa	S. aureus	C. albicans
esputo 1	(refuerzo)	(refuerzo)	
esputo 2	(refuerzo)	(refuerzo)	+
secreción bronquial	(refuerzo)	(refuerzo)	