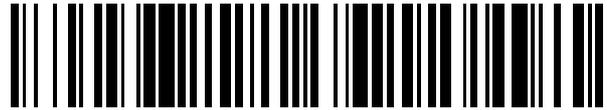


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 732 706**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6806 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.04.2012 PCT/US2012/035253**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.11.2012 WO12149188**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.04.2012 E 12776509 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2019 EP 2702192**

54 Título: **Composiciones y métodos para detectar e identificar secuencias de ácidos nucleicos en muestras biológicas**

30 Prioridad:

26.04.2011 US 201113094809

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

25.11.2019

73 Titular/es:

**LONGHORN VACCINES AND DIAGNOSTICS, LLC
(100.0%)**

**2 Bethesda Metro Center, Suite 910
Bethesda, MD 20814, US**

72 Inventor/es:

**FISCHER, GERALD, W. y
DAUM, LUKE, T.**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 732 706 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones y métodos para detectar e identificar secuencias de ácidos nucleicos en muestras biológicas.

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere generalmente a composiciones y métodos para detectar, identificar y opcionalmente cuantificar segmentos de ácidos nucleicos dentro de una población de polinucleótidos aislados tal como la obtenida a partir de una muestra biológica. En particular, las composiciones y los métodos de la invención pueden mantenerse durante períodos de tiempo prolongados a temperaturas ambientales sin comprometer la integridad de los componentes o la fidelidad del análisis.

Antecedentes de la invención

15 Las micobacterias son bacterias unicelulares, aerobias, grampositivas. Típicamente, las micobacterias tienen una pared celular hidrofóbica gruesa y carecen de una membrana celular externa. Las infecciones causadas por micobacterias pueden estar activas dentro de un huésped, o latentes y asintomáticas. La emergencia de cepas resistentes a múltiples fármacos, la necesidad de una terapia antibacteriana prolongada, y el poco cumplimiento del paciente, han dificultado el tratamiento de las infecciones por micobacterias, particularmente en los países en desarrollo. La emergencia de cepas de *M. tuberculosis*, resistentes a múltiples fármacos (MDR), en particular, ha hecho del diagnóstico y tratamiento de la TB una alta prioridad en las poblaciones africanas en desarrollo.

25 Las micobacterias se clasifican típicamente como bacterias grampositivas ácido resistentes debido a su carencia de una membrana celular externa. Los métodos de tinción de resistencia a ácido que se usan frecuentemente son la tinción de Ziehl-Neelsen o el método de Kinyoun. Generalmente, no retienen bien la tinción con cristal violeta y por lo tanto no se consideran un representante típico de las bacterias grampositivas. Sin embargo, contienen una estructura de la pared celular única, que es más gruesa que la presente en la mayoría de las otras especies bacterianas. Típicamente, con forma de bastoncillo, la pared celular consiste en una capa de micolato hidrofóbica (que contiene ácidos micólicos) y una capa de peptidoglicano que se mantiene unida con arabinogalactano, un polisacárido. Esta estructura de la pared celular ayuda a las micobacterias en su capacidad de sobrevivir a cambios ambientales drásticos y contribuye a la resistencia de las especies de *Mycobacterium*, así como en la dificultad de tratar a los pacientes con tuberculosis y lepra, ambas causadas por especies de *Mycobacterium* diferentes. Los ácidos micólicos son moléculas hidrofóbicas fuertes que forman una cubierta lipídica alrededor del organismo y afectan las propiedades de permeabilidad en la superficie celular. Se cree que los ácidos micólicos son un determinante importante de la virulencia en algunas especies de *Mycobacterium*. Lo más probable es que impidan el ataque de las micobacterias por proteínas catiónicas, lisozima, y radicales del oxígeno en el gránulo fagocítico. Además, protegen a las micobacterias extracelulares de la deposición del complemento en el suero.

35 Además, las micobacterias típicamente son organismos de crecimiento lento, lo que contribuye a la dificultad de cultivar la especie. Debido a su pared celular única, pueden sobrevivir la exposición prolongada a ácidos, álcalis, detergentes, explosiones oxidativas, lisis por complemento, y muchos antibióticos. La mayoría de las micobacterias son susceptibles a los antibióticos claritromicina y rifamicina, pero han emergido cepas resistentes a los antibióticos.

45 Los miembros del complejo *Mycobacterium tuberculosis*, es decir, *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. cannetti*, *M. caprae* y *M. pinnipedi*, los agentes causales de la tuberculosis, tienen todas las características indicadas anteriormente de las micobacterias. La consecuencia principal de la infección por micobacterias (y particularmente, la infección por una o más especies del género *Mycobacterium*) en los seres humanos es la tuberculosis (TB), una infección contagiosa causada por miembros del "complejo *M. tuberculosis*", que incluye, por ejemplo, cepas patógenas de las especies *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. cannetti*, *M. caprae* y *M. pinnipedi*. Típicamente la TB ataca los pulmones en huéspedes mamíferos, pero también puede propagarse a otros órganos y regiones del cuerpo, que incluyen, por ejemplo, huesos, articulaciones, riñones, y el abdomen, etc. Los miembros del complejo *M. tuberculosis* están estrechamente relacionados genéticamente, y poseen secuencias de ARNr 16S altamente conservadas en todo el género.

55 La TB puede adquirirse al respirar gotitas de aire de una tos o estornudo de una persona infectada. En consecuencia, la recolección de muestras biológicas con sospecha de contener miembros del complejo *M. tuberculosis* involucra la recolección de esputo de pacientes con sospecha de estar infectados con los mismos. El esputo es la expectoración de la tos desde las vías respiratorias e idealmente contiene poca o ninguna saliva o secreción nasal, para evitar la contaminación de la muestra de esputo con bacterias orales. El esputo contiene principalmente moco, un coloide viscoso que es rico en glicoproteínas. Los pacientes con sospecha de tener tuberculosis típicamente tienen un aumento de la viscosidad del moco, así como un aumento de la producción de moco. Además de moco, el esputo puede contener sangre, es decir, puede ocurrir hemoptisis, y/o pus, es decir, puede ser de naturaleza purulenta. Los síntomas de una infección tuberculosa activa pueden incluir tos crónica (típicamente con esputo sanguinolento), fiebre, hiperhidrosis nocturna, fatiga crónica, palidez, pérdida de peso, y debilidad caquética ("tisis"). Otros síntomas pueden incluir dificultades para respirar, dolor torácico y sibilancias ("Tuberculosis pulmonar", PubMed Health). Si un bacilo tuberculoso inhalado se establece en un alvéolo pulmonar, ocurre una infección, seguida de dilatación alveolocapilar, e hinchazón de las células endoteliales. La alveolitis es el resultado de la replicación intracelular de los bacilos tuberculosos, y una afluencia de leucocitos

polimorfonucleares a los alvéolos. Después los organismos se propagan a través del sistema linfático hacia el sistema circulatorio, y después a todo el cuerpo.

5 Aunque *M. tuberculosis* infecta a menos de 200.000 personas al año en los Estados Unidos, de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) casi dos *mil millones* de personas en todo el mundo pueden estar infectadas, 90 % de las cuales pueden permanecer asintomáticas durante años después de la infección. Si no se trata, la TB es mortal en > 50 % de la población infectada, y en las formas diseminadas de la enfermedad, la tasa de mortalidad se acerca al 90 %.

10 Debido a la persistencia crónica y debilitante de la infección de TB, la infección simultánea con uno o más patógenos secundarios, que incluyen en particular, el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), también está generalizada. En 2007, hubo al menos 1,37 millones de casos de TB en VIH positivos, concentrados principalmente en poblaciones emergentes donde el diagnóstico y el tratamiento frecuentemente son limitados, ineficaces, y/o tienen un costo prohibitivo.

15 El diagnóstico convencional de una infección de TB típicamente se basa en una combinación de examen físico (*por ejemplo*, tos persistente crónica, ganglios linfáticos agrandados o doloridos, efusión pleural, sonidos respiratorios inusuales, y, en estadios más avanzados de la enfermedad, "aspecto de palillo de tambor" característico de los dedos de las manos o los pies) y pruebas de diagnóstico (*por ejemplo*, examen de esputo, cultivo microbiano y pruebas de ácidos nucleicos de los especímenes, broncoscopia, tomografía computarizada o radiografía de tórax, biopsia pulmonar, toracocentesis, prueba de sangre para interferón- γ (gamma), y prueba cutánea de tuberculina).

25 El "estándar" de diagnóstico de la TB, el cultivo de células de organismos micobacterianos, es difícil, debido en parte a sus tiempos de generación prolongados, *es decir*, veinticuatro horas para *M. tuberculosis*. Además, las micobacterias típicamente están presentes a niveles bajos en los individuos infectados. Por lo tanto el cultivo a partir de un espécimen clínico puede durar entre cuatro a ocho semanas, tiempo durante el cual un paciente puede enfermarse gravemente y contagiar a otros. Además, el cultivo de células requiere la recolección, transporte y mantenimiento de organismos micobacterianos viables en una muestra hasta el momento en que la muestra pueda analizarse en un entorno de laboratorio. En países donde la TB es prevalente, y la atención de la salud es mínima, puede que esto no sea una opción, lo que aumenta por lo tanto el riesgo de propagación de la infección.

30 Desafortunadamente para las regiones con acceso limitado a la atención médica, la sangre total debe analizarse dentro de las 12 horas posteriores a la obtención de la muestra, y la eficacia de la prueba no se ha analizado en pacientes con otras afecciones médicas tales como VIH, SIDA, diabetes, silicosis, insuficiencia renal crónica, trastornos hematológicos, individuos que se han tratado para la infección de TB, ni se ha analizado en individuos gestantes o menores de edad ("Guía de los médicos sobre QuantiFERON® -TB Gold", Cellestis). Otros métodos que no son de cultivo tales como los radioinmunoensayos, la aglutinación en látex, y los ensayos de inmunoadsorción ligada a enzima (ELISA) se han usado con un grado limitado de éxito para confirmar la presencia de bacilos tuberculosos en muestras biológicas.

40 La mayoría de los laboratorios de diagnóstico clínico emplearon el cultivo tradicional para la identificación de patógenos que típicamente requiere 3-7 días para la mayoría de los virus y más para algunas cepas bacterianas, que incluyen hasta alrededor de 21 días para el cultivo de *M. tuberculosis*. El cultivo tradicional requiere la recolección de especímenes de microbios viables, el transporte en congelación, y la propagación y manipulación de microbios biológicos potencialmente infecciosos y frecuentemente desconocidos. Además, muchos agentes infecciosos, *por ejemplo*, la influenza aviar altamente patogénica, SARS, complejo *M. tuberculosis*, *etc.*, son patógenos de nivel BSL-3 que requieren instalaciones especializadas y precauciones para el análisis. Existen retos para obtener, enviar y mantener especímenes biológicos viables de alta calidad, para el cultivo. Los especímenes deben enviarse con el uso de una cadena de frío, más frecuentemente hielo seco. El transporte de muestras potencialmente infecciosas desde sitios remotos o a través de las fronteras internacionales con el uso del tránsito comercial puede ser costoso y tedioso, particularmente cuando los especímenes deben recibirse congelados.

50 La recolección es la primera etapa en plataformas de diagnóstico o protocolos moleculares que requieren la detección de cantidades potencialmente diminutas de ácidos nucleicos de microbios. Independientemente de la prueba de ácido nucleico usada o el protocolo de extracción de ARN/ADN, la recolección de especímenes, específicamente la inactivación de agentes potencialmente infecciosos y la conservación y estabilidad del ARN/ADN de los patógenos sigue siendo una brecha crítica en el diagnóstico clínico, especialmente para el uso en todo el mundo.

60 Típicamente, a los pacientes con sospecha de tener tuberculosis se les pide que tosan con fuerza y después expectoren en un vaso de espécimen para obtener una muestra de esputo. Usualmente, este procedimiento se realiza en un área bien ventilada para minimizar el potencial de propagación de micobacterias infecciosas. Se les puede pedir a los pacientes que repitan este procedimiento para recolectar suficiente esputo para el análisis, típicamente en cantidades de alrededor de 5 ml a alrededor de 20 ml. Típicamente, las muestras de esputo recolectadas se refrigeran hasta que puedan realizarse los procedimientos analíticos posteriores, tales como el cultivo de células o procedimientos de descontaminación para inactivar o exterminar cualquier microorganismo contenido dentro de la muestra. Para detectar *Mycobacterium tuberculosis* en una muestra de esputo, se necesita un exceso de 10.000 organismos por ml de esputo para visualizar los bacilos con un objetivo de microscopio 100X (aumento 1.000X). La microscopía directa de frotis de muestras de esputo

de pacientes con tuberculosis típicamente se considera una herramienta eficaz para monitorear la respuesta del paciente al tratamiento. Típicamente, se encontrarán más bacilos ácido resistentes en las porciones purulentas del esputo.

5 El campo del diagnóstico molecular clínico cambió drásticamente con el advenimiento de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y, posteriormente, la PCR en tiempo real. La PCR en tiempo real (RT-PCR) y la PCR con transcripción inversa en tiempo real (rRT-PCR) pueden suministrar en horas resultados de sensibilidad y especificidad superiores. Por lo tanto, la mayoría de los laboratorios de diagnóstico actuales han pasado del cultivo tradicional a las pruebas de ácidos nucleicos (NAT) tales como la PCR en tiempo real.

10 La prueba de amplificación de ácidos nucleicos para la TB incluye el uso de técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) estándar para detectar ADN de micobacterias en especímenes de pacientes, sondas de ácidos nucleicos para identificar micobacterias en cultivo, análisis de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) para comparar cepas diferentes de TB para estudios epidemiológicos, y pruebas genéticas de susceptibilidad para identificar cepas de micobacterias resistentes a fármacos. El genoma completo de *M. tuberculosis* se ha secuenciado y publicado; actualmente la Administración de Alimentos y Fármacos (FDA) ha aprobado dos pruebas basadas en la
15 amplificación de ácidos nucleicos para la TB para el uso en los Estados Unidos. La primera, conocida como la "Prueba directa de *Mycobacterium tuberculosis* amplificada mejorada" (E-MTD, Gen-Probe, San Diego, CA, Estados Unidos), está aprobada para la detección de bacterias del complejo *M. tuberculosis* en bacilos ácido resistentes en especímenes respiratorios tanto con baciloscopia positiva como con baciloscopia negativa de pacientes con sospecha de tener TB. La
20 prueba E-MTD combina la amplificación isotérmica mediada por transcripción de una porción del ARNr 16S con un método de detección que usa una sonda de hibridación específica para bacterias del complejo *M. tuberculosis*. La segunda, conocida como la prueba de *Mycobacterium tuberculosis* AMPLICOR® (AMPLICOR®, Roche Diagnostics, Basilea, Suiza), se ha aprobado para la detección de bacterias del complejo *M. tuberculosis* solo en especímenes respiratorios con baciloscopia positiva de pacientes con sospecha de tener TB. Esta prueba usa la PCR para amplificar una porción
25 del gen del ARNr 16S que contiene una secuencia que se hibrida con una sonda oligonucleotídica específica para bacterias del complejo *M. tuberculosis*. ("Informe de una consulta de expertos sobre los usos de las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos para el diagnóstico de la tuberculosis," Centros para el Control y Prevención de Enfermedades).

30 Los resultados han indicado que la sensibilidad y la especificidad de estas pruebas tienden a variar en dependencia de la ubicación geográfica y los factores de riesgo. Además, estas técnicas requieren condiciones de laboratorio complejas y equipos para realizarlas, lo que reduce por lo tanto la velocidad y la sensibilidad de la prueba. Por estas y otras razones, sigue existiendo la necesidad en la técnica de métodos confiables y exactos para la detección de patógenos micobacterianos en muestras clínicas, y en particular, métodos para identificar rápidamente tales patógenos en
35 aplicaciones de campo, ubicaciones remotas, y en países en desarrollo donde carecen de laboratorios convencionales, y los recursos financieros son limitados. En particular, las composiciones para la recolección, manipulación y transporte seguro de especímenes patogénicos, así como los métodos basados en biología molecular para la detección rápida y la identificación exacta de ácidos nucleicos específicos de TB en tales especímenes son muy deseados.

40 Resumen de la invención

La presente invención supera los problemas y desventajas asociados con las estrategias y diseños actuales, y proporciona nuevas composiciones, herramientas y métodos para detectar e identificar secuencias de ácidos nucleicos. Por lo tanto la invención proporciona composiciones, métodos y kits de acuerdo con las reivindicaciones.

45 Una modalidad de la invención está dirigida a composiciones listas para PCR para la detección de un microorganismo en una muestra biológica que comprenden como componentes: una polimerasa termoestable presente en una cantidad de alrededor de 0,05 U a alrededor de 1 U; una mezcla de desoxinucleótidos trifosfatados que comprende cantidades aproximadamente equivalentes de dATP, dCTP, dGTP y dTTP, presentes colectivamente en la composición a una
50 concentración de alrededor de 0,1 mM a alrededor de 1 mM; un agente quelante seleccionado del grupo que consiste en ácido etilenglicol tetraacético, ácido hidroxietilendiamino triacético, ácido dietilentriamino pentaacético, *N,N*-bis(carboximetil)glicina, etilendiaminotetraacético, citrato anhidro, citrato de sodio, citrato de calcio, citrato de amonio, bicitrato de amonio, ácido cítrico, citrato de diamonio, citrato de potasio, citrato de magnesio, citrato de amonio férrico, citrato de litio, y cualquier combinación de estos, presente en la composición a una concentración de alrededor de 0,01
55 mM a alrededor de 1 mM; el agente de osmolaridad de PCR *N,N,N*-trimetilglicina (betaína) presente en la composición a una concentración de alrededor de 1 mM a alrededor de 1 M; una albúmina seleccionada del grupo que consiste en albúmina sérica bovina, albúmina sérica humana, albúmina sérica de cabra, albúmina de mamífero, y cualquier combinación de estas, presente en la composición a una concentración de alrededor de 5 ng/ml a alrededor de 100 ng/ml; al menos dos sales, la primera es una sal de potasio seleccionada del grupo que consiste en cloruro de potasio y glutamato
60 de potasio y la segunda es una sal de magnesio seleccionada del grupo que consiste en cloruro de magnesio y sulfato de magnesio, presentes colectivamente en la composición a una concentración de alrededor de 50 mM a alrededor de 1 M; y un tampón seleccionado del grupo que consiste en tris(hidroximetil) aminometano (Tris), citrato, ácido 2-(*N*-morfolino)etanosulfónico (MES), ácido *N,N*-Bis (2-hidroxietil)-2-aminoetanosulfónico (BES), 1,3-bis(tris(hidroximetil) metilamino)propano (Bis-Tris), ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanosulfónico (HEPES), ácido 3-(*N*-morfolino)propanosulfónico (MOPS), *N,N*-bis(2-hidroxietil)glicina (Bicina), *N*-(tris (hidroximetil)metil)glicina (Tricina), ácido *N*-2-acetamido-2-iminodiacético (ADA), ácido *N*-(2-acetamido)-2-aminoetanosulfónico (ACES), piperazina-1,4-bis(ácido

2-etanosulfónico) (PIPES), bicarbonato, fosfato, y cualquier combinación de estos, presente en la composición a una concentración de alrededor de 1 mM a alrededor de 1 M y con un pH de alrededor de 6,5 a alrededor de 9,0, en donde el pKa del tampón está dentro de alrededor de una unidad del pH a una temperatura seleccionada, en donde los componentes se combinan con agua libre de nucleasas. Preferentemente la polimerasa termoestable es una polimerasa Taq, una polimerasa de alta fidelidad, una polimerasa Pfu, una polimerasa de comienzo en caliente, o una polimerasa de nueva generación. La composición comprende además uno o más colorantes, preferentemente seleccionados del grupo que consiste en fluoresceína, 5-carboxi-X-rodamina y ROX. Preferentemente el pH del tampón o la composición en general es de alrededor de 6,5 a alrededor de 7,5, y el pKa del tampón está dentro de 0,5 del pH del tampón a temperatura ambiental, con mayor preferencia el pKa del tampón está dentro de 0,2 del pH del tampón a temperatura ambiental. La composición comprende además un par de cebadores de PCR configurados para amplificar por PCR una secuencia de ácido nucleico que es específica para el microorganismo, presentes colectivamente en la composición a una concentración de alrededor de 0,5 μ M a alrededor de 50 μ M, en donde cada cebador de PCR es de alrededor de 18 a 35 nucleótidos de longitud. El microorganismo a detectar es una micobacteria. Preferentemente la composición comprende además un ácido nucleico de control presente en la concentración a una concentración de alrededor de 1 fg a alrededor de 1 ng que proporciona una medida cualitativa o cuantitativa de la amplificación por PCR. El ácido nucleico de control preferido comprende, por ejemplo, la secuencia de la SEQ ID NO 8, la secuencia de la SEQ ID NO 12, o la secuencia de la SEQ ID NO 21. La composición contiene además una sonda de detección que se une específicamente a una secuencia de ácido nucleico amplificada por PCR que es específica del microorganismo. Una composición preferida de la invención contiene alrededor de 50 mM de TRIS; alrededor de 70 mM de cloruro de potasio; alrededor de 3 mM de sulfato de magnesio; alrededor de 45 mM de betaína; alrededor de 0,03 μ g/ml de albúmina sérica bovina; alrededor de 0,1 mM de EDTA; alrededor de 0,05 μ M de colorante; alrededor de 8 μ M del par de cebadores de PCR. Preferentemente un cebador del par de cebadores de PCR comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO 2 o la SEQ ID NO 5, y el otro cebador del par de cebadores de PCR comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO 3 o la SEQ ID NO 6. En la composición de la invención la sonda de detección es una secuencia específica de *Mycobacterium* de alrededor de 20 a alrededor de 35 nucleótidos de longitud y comprende la secuencia de la SEQ ID NO 4 o la SEQ ID NO 7.

En la presente descripción se describen composiciones listas para PCR para la detección de un microorganismo en una muestra biológica que comprenden como componentes: una polimerasa termoestable; una mezcla de desoxinucleótidos trifosfatados que comprende cantidades aproximadamente equivalentes de dATP, dCTP, dGTP y dTTP; un agente quelante; un agente de osmolaridad de PCR; una albúmina; al menos dos sales; y un tampón que está presente en la composición a una concentración de al menos 50 mM y tiene un pH de alrededor de 6,5 a alrededor de 9,0, en donde el pKa del tampón está dentro de alrededor de una unidad del pH a una temperatura seleccionada, en donde los componentes se combinan con agua libre de nucleasas. Preferentemente la polimerasa termoestable está presente en una cantidad de alrededor de 0,05 U a alrededor de 10 U; la mezcla de desoxinucleótidos trifosfatados está presente en la composición a una concentración de alrededor de 0,1 mM a alrededor de 10 mM; el agente quelante está presente en la composición a una concentración de alrededor de 0,01 mM a alrededor de 10 mM; el agente de osmolaridad de PCR está presente en la composición a una concentración de alrededor de 1 mM a alrededor de 10 M; la albúmina está presente en la composición a una concentración de alrededor de 5 ng/ml a alrededor de 1 mg/ml; las al menos dos sales están presentes colectivamente en la composición a una concentración de alrededor de 50 mM a alrededor de 10 M; y el tampón está presente en la composición a una concentración de alrededor de 1 mM a alrededor de 10 M.

Otra modalidad de la invención está dirigida a métodos para la detección de un microorganismo en una muestra biológica que comprenden: poner en contacto la muestra biológica con la composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para formar una mezcla; realizar múltiples etapas de termociclado en la mezcla para formar un producto de amplificación que se deriva del ácido nucleico que es específico para el microorganismo; detectar la presencia o ausencia del producto de amplificación para determinar la presencia o ausencia del microorganismo en la muestra biológica. Preferentemente el método comprende además detectar una secuencia amplificada de un ácido nucleico de control y determinar la calidad o cantidad de amplificación que se produjo a partir de las múltiples etapas de termociclado. También preferentemente, la muestra biológica comprende material biológico obtenido de un individuo, uno o más agentes caotrópicos, uno o más detergentes, uno o más agentes reductores, uno o más quelantes, y uno o más tampones.

En la presente descripción se describen métodos para proporcionar la detección de un microorganismo en una muestra biológica que comprenden proporcionar una composición lista para PCR que contiene como componentes: una polimerasa termoestable presente en una cantidad de alrededor de 0,05 U a alrededor de 1 U; una mezcla de desoxinucleótidos trifosfatados que comprende cantidades aproximadamente equivalentes de dATP, dCTP, dGTP y dTTP, presentes colectivamente en la composición a una concentración de alrededor de 0,1 mM a alrededor de 1 mM; uno o más agentes quelantes presentes en la composición a una concentración de alrededor de 0,01 mM a alrededor de 1 mM; uno o más agentes de osmolaridad de PCR presentes en la composición a una concentración de alrededor de 1 mM a alrededor de 1 M; una o más proteínas albúminas presentes en la composición a una concentración de alrededor de 5 ng/ml a alrededor de 100 ng/ml; una o más sales presentes en la composición a una concentración de alrededor de 50 mM a alrededor de 1 M; y uno o más tampones presentes en la composición a una concentración de alrededor de 1 mM a alrededor de 1 M y con un pH de alrededor de 6,5 a alrededor de 9,0, en donde el pKa del tampón está dentro de alrededor de una unidad del pH a una temperatura seleccionada, en donde los componentes se combinan con agua libre de nucleasas. Preferentemente el pH del tampón es de alrededor de 6,5 a 7,5 y el pKa está dentro de alrededor de 0,5 unidades del pH a una temperatura ambiental. Preferentemente el método comprende además poner en contacto la muestra biológica con la composición y realizar una reacción de termociclado en la mezcla. Preferentemente el uno o más

agentes quelantes comprenden ácido etilenglicol tetraacético, ácido hidroxietilendiaminotetraacético, ácido dietilentriamino pentaacético, *N,N*-bis(carboximetil)glicina, etilendiaminotetraacético, citrato anhidro, citrato de sodio, citrato de calcio, citrato de amonio, bicitrato de amonio, ácido cítrico, citrato de diamonio, citrato de potasio, citrato de magnesio, citrato de amonio férrico, citrato de litio, o cualquier combinación de estos, el uno o más agentes de osmolaridad de PCR comprenden *N,N,N*-trimetilglicina (betaína), dimetilsulfóxido (DMSO), foramida, glicerol, detergentes no iónicos, desoxinosina, glicerina, trifosfato de 7-deaza desoxiguanosina, hidróxido de sodio, polietilenglicol, cloruro de tetrametilamonio, o cualquier combinación de estos, la una o más albúminas comprenden albúmina sérica bovina, albúmina sérica humana, albúmina sérica de cabra, albúmina de mamífero o cualquier combinación de estas, la una o más sales comprenden cloruro de potasio, glutamato de potasio, cloruro de magnesio, sulfato de magnesio, y cualquier combinación de estas, el uno o más tampones comprenden tris(hidroximetil) aminometano (Tris), citrato, ácido 2-(*N*-morfolino)etanosulfónico (MES), ácido *N,N*-Bis(2-hidroxietil)-2-aminoetanosulfónico (BES), 1,3-bis(tris(hidroximetil) metilamino)propano (Bis-Tris), ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanosulfónico (HEPES), ácido 3-(*N*-morfolino)propanosulfónico (MOPS), *N,N*-bis(2-hidroxietil)glicina (Bicina), *N*-(tris(hidroximetil)metil)glicina (Tricina), ácido *N*-2-acetamido-2-iminodiacético (ADA), ácido *N*-(2-acetamido)-2-aminoetanosulfónico (ACES), piperazina-1,4-bis(ácido 2-etanosulfónico) (PIPES), bicarbonato, fosfato, o cualquier combinación de estos.

Otra modalidad de la invención está dirigida a kits que comprenden la composición de la invención contenida dentro de un recipiente estéril configurado para la adición de una muestra biológica y el termociclado, e instrucciones para determinar la presencia o ausencia del complejo *M. tuberculosis* a partir de los resultados del termociclado.

Otras modalidades y ventajas de la invención se exponen en parte en la descripción, que sigue, y en parte, pueden ser obvias a partir de esta descripción, o puede aprenderse de la práctica de la invención.

Descripción de las figuras

La Figura 1 ilustra el análisis de PCR en tiempo real (RT) del ADN de tuberculina de muestras de esputo con baciloscopia positiva conservadas en PrimeStore® en una relación 1:1. Además, las mismas muestras de esputo con baciloscopia positiva se recolectaron con hisopo, dando como resultado alrededor de 50 a alrededor de 400 microlitros de muestra en el hisopo, y los hisopos se colocaron en 1,5 ml de PrimeStore®. El ADN de cada muestra de esputo en PrimeStore® se extrajo con el uso del kit de preparación de especímenes respiratorios AMPLICOR® (AMPLICOR®, Roche Diagnostics, Basilea, Suiza) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se usaron cuatro microlitros de ADN extraído para la PCR en tiempo real con el uso del kit de detección de *Mycobacterium* LightCycler®, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los valores de C_T resultantes de cada una de las muestras se muestran en la Tabla 2;

La Figura 2 ilustra el análisis de PCR en tiempo real (RT) del ADN de tuberculina de siete especímenes de esputo con baciloscopia negativa y cultivo positivo, y tres débiles, *es decir*, con resultados de baciloscopia positiva en la que la tinción era apenas visible en el portaobjetos, los hisopos con espécimen se conservaron en PrimeStore®. El ADN se extrajo con el uso del kit de preparación de especímenes respiratorios AMPLICOR® y el kit de virus Invitrogen™ iPrep™ Purelink™ (Carlsbad, CA, Estados Unidos), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se usó el kit de detección de *Mycobacterium* LightCycler®, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los valores de C_T resultantes de cada una de las muestras se muestran en la Tabla 8;

La Figura 3 muestra un gráfico del análisis de RT-PCR de los componentes del ensayo PrimeMix® Universal MTB que se retiraron del almacenamiento a una temperatura de -20 °C y se colocaron a temperatura ambiental un número variable de veces, *es decir*, una, tres, cinco y diez veces y después se usaron en el ensayo PrimeMix® Universal MTB;

La Figura 4 muestra un gráfico del análisis de RT-PCR cuando se detectó un control positivo interno (IPC) de ADN monocatenario en un ensayo PrimeMix® con el uso de sondas de detección que se etiquetaron con colorante 6-FAM (FAM) o VIC™;

La Figura 5 muestra un gráfico del análisis de RT-PCR cuando se usaron cantidades variables de ADN extraído de paciente con tuberculosis, *es decir*, 2 µl, 3 µl, 4 µl, y 5 µl de ADN plantilla, en el ensayo PrimeMix® Universal MTB;

La Figura 6 muestra un gráfico del análisis de RT-PCR cuando se realiza un ensayo PrimeMix® Universal MTB múltiple en donde un control positivo interno (IPC) de ADN monocatenario se añade a la solución que contiene la muestra de tuberculina, en comparación con un ensayo simple en donde la solución inicial contiene únicamente la muestra biológica obtenida del paciente y la solución de almacenamiento, *es decir*, PrimeStore®;

La Figura 7 muestra un gráfico del análisis de RT-PCR cuando se varió la concentración del control positivo interno ("IPC") colocado en PrimeStore®, *es decir*, 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , y 10^{-8} ng/µl de IPC se colocaron en la misma cantidad de PrimeStore®.

Las sondas para el IPC se etiquetaron con colorante 6-FAM ("IPC Fam") o VIC™ ("IPC Vic"). También se llevó a cabo una reacción múltiple, en la que cebadores y sondas específicos del complejo *M. tuberculosis* también se añadieron a PrimeMix® (los resultados se muestran en la columna etiquetada como "MTB en ensayo múltiple"), junto con los cebadores y sondas para IPC (los resultados se muestran en la columna etiquetada como "IPC Vic en ensayo múltiple");

La Figura 8 muestra un gráfico del análisis de RT-PCR cuando la cantidad inicial de una muestra de *M. tuberculosis* es 15 µl y 150 µl (una diferencia de 10 veces) cuando cada una se almacena inicialmente en 1,5 ml de PrimeStore®. Esto se realizó para sondas de IPC etiquetadas con colorante 6-FAM ("IPC Fam") y VIC™ ("IPC Vic"), así como para la detección simple de *M. tuberculosis* ("MTB") y la detección múltiple de *M. tuberculosis* ("MTB en ensayo múltiple") y el IPC en donde la sonda está etiquetada con colorante VIC™ ("IPC Vic en ensayo múltiple");

La Figura 9 muestra un gráfico del análisis de RT-PCR cuando varias cepas de micobacterias, *es decir*, cinco cepas diferentes de *M. tuberculosis*, dos cepas diferentes de *M. avium*, una cepa de *M. intracellulerae*, una cepa de *M. gondii*, y una cepa de *M. kansasii*, se colocaron en y después se extrajeron de PrimeStore® y después se analizaron con el uso de

los formatos simple ("MTB simple") y múltiple ("MTB en ensayo múltiple") del procedimiento de PrimeMix®. El ensayo simple usó solamente cebadores y sondas específicos para el complejo *M. tuberculosis*, mientras que el ensayo múltiple usó cebadores y sondas específicos para el complejo *M. tuberculosis* y cebadores y sondas específicos para IPC;

La Figura 10 muestra un gráfico del análisis de RT-PCR cuando se varía la cantidad de *M. tuberculosis* de una cepa purificada particular, es decir, 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} son representativos de diluciones de diez veces en donde 10^{-1} representa una concentración de ADN de 330 ng/μl, 10^{-2} representa una concentración de ADN de 33 ng/μl, 10^{-3} representa una concentración de ADN de 3,3 ng/μl y 10^{-4} representa una concentración de ADN de 0,33 ng/μl. Se realizó una reacción simple con el uso del ensayo PrimeMix® Universal MTB con cebadores y sondas específicos para el complejo *M. tuberculosis* (los resultados se muestran en la columna "MTB simple"), así como se realizó un ensayo PrimeMix® múltiple en el que estaban presentes cebadores y sondas específicos para el complejo *M. tuberculosis* y cebadores y sondas específicos para IPC (los resultados se muestran en las columnas "MTB en ensayo múltiple" e "IPC en ensayo múltiple"); y

La Figura 11 muestra un gráfico del análisis de RT-PCR cuando se varía la cantidad de *M. tuberculosis* de una cepa purificada particular, es decir, 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} son representativos de diluciones de diez veces en donde 10^{-1} representa una concentración de ADN de 33 ng/μl, 10^{-2} representa una concentración de ADN de 3,3 ng/μl, 10^{-3} representa una concentración de ADN de 0,33 ng/μl y 10^{-4} representa una concentración de ADN de 0,033 ng/μl y se usaron diferentes etiquetas, ya sea colorante 6-FAM ("IPC Fam") o VIC™ ("IPC Vic") en la sonda específica para IPC.

La Figura 12 muestra una tabla que compara la BSA no acetilada (concentración final en mg/ml) contra el ciclo umbral (C_T).

Descripción de la invención

La presente invención supera estas y otras limitaciones inherentes en el estado de la técnica al proporcionar composiciones útiles, no obvias, y novedosas para recolectar, manipular y transportar de manera segura muestras biológicas con sospecha de contener organismos patógenos, así como métodos para detectar, identificar y cuantificar rápidamente esos patógenos a través de pruebas de ácidos nucleicos basadas en biología molecular. En particular, se proporcionan métodos para detectar específicamente una o más cepas de microorganismos patógenos tales como bacterias, virus, hongos y parásitos. En aplicaciones particulares, la invención abarca un producto de diagnóstico que permite la recolección de un espécimen diana, la preparación del espécimen diana para el ensayo, el aislamiento del material genómico del espécimen, y el procesamiento posterior del material genómico para identificar uno o más organismos, si están presentes, en la muestra biológica. Cuando se combinan con uno o más dispositivos de recolección de especímenes, las composiciones descritas en la presente descripción permiten la recolección, transporte y almacenamiento seguro de especímenes biológicos, incluso para aquellos recolectados en aplicaciones remotas o de "campo", en donde el tiempo desde la recolección de muestras hasta el ensayo de las muestras puede ser de horas a días, o incluso semanas.

La invención abarca además composiciones y métodos que simplifican y aceleran la recolección de especímenes, la preparación y la detección molecular de microorganismos, específicamente aquellos microorganismos que son los agentes causales de la influenza y la tuberculosis. En aplicaciones particulares, la invención abarca un producto de diagnóstico por medio del cual el espécimen se recolecta, se transporta y se prepara rápidamente para la PCR posterior sin la necesidad de una cadena de frío o la descontaminación de la muestra y la emulsificación del espécimen con alto costo y consumo de tiempo. El producto de diagnóstico molecular incluye una mezcla de PCR termoestable, con todo incluido, de cebadores, sondas y enzimas en una solución o suspensión lista para el uso. Este producto de diagnóstico puede usarse en laboratorios centrales y con sistemas de alta productividad o en clínicas rurales o móviles con capacidades mínimas y en ausencia de energía eléctrica comunitaria confiable, o incluso con un dispositivo de mano. La invención abarca además un método para la vigilancia epidemiológica y de brotes, el seguimiento de pandemias y epidemias y la secuenciación microbiana directamente de las muestras de campo en el sitio de recolección o mediante el uso del envío económico, simplificado, y seguro a través del correo estándar a temperatura ambiental. Esta invención abarca además un kit de detección de diagnóstico molecular para la recolección segura en el sitio de atención, la extracción rápida y la detección rápida por PCR de microbios, específicamente patógenos.

Con el uso de las sondas de detección y los cebadores de amplificación de ácidos nucleicos específicos de patógenos descritos en la presente descripción, la presente invención proporciona además una identificación fácil de patógenos en muestras recolectadas, y permite una evaluación segura, económica, y a corto plazo de la infección, que incluye, por ejemplo, como herramienta en la vigilancia contra epidemias potenciales, monitoreo de brotes, evaluación de la progresión de la enfermedad en poblaciones afectadas o en riesgo, y/o identificación de especies y/o cepas particulares del microorganismo para pruebas de diagnóstico o determinación de modalidades terapéuticas particulares.

En un ejemplo descrito en la presente descripción hay un método para obtener una población de polinucleótidos específicos a partir de una muestra con sospecha de contener uno o más microorganismos patógenos, o células patógenas o infectadas con patógenos (colectivamente "patógenos"). En un sentido general, este método generalmente involucra poner en contacto una muestra con sospecha de contener uno o más patógenos durante una cantidad de tiempo eficaz y con una cantidad suficiente de una composición que incluye: a) uno o más agentes caotrópicos; b) uno o más detergentes; c) uno o más agentes reductores; d) uno o más quelantes; y e) uno o más tensioactivos, para exterminar sustancialmente todos, y preferentemente para exterminar todos los organismos patógenos en esta, que incluyen, por ejemplo, bacterias, hongos, y virus patógenos (si están presentes en la muestra). En la práctica del método, se lisan

sustancialmente todas (y preferentemente, todas) las células y microorganismos contenidos en estas, y sus contenidos celulares se liberan en la solución. Preferentemente, sustancialmente todas (y con mayor preferencia, todas) las enzimas celulares, proteínas, péptidos, lipoproteínas, y otros contenidos celulares se desnaturalizan y/o inactivan, que incluyen cualquiera de las nucleasas exógenas o endógenas que puedan estar presentes en la muestra, de manera que la mezcla resultante se vuelve sustancialmente segura (y preferentemente, segura) para la manipulación, almacenamiento, y/o transporte por parte de los trabajadores sin efectos indebidos, y sin la necesidad de preocuparse por la patogenicidad, la toxicidad, o el peligro de manipular la muestra ahora que se ha descontaminado y cualquiera de los organismos patógenos presentes originalmente en esta, se destruye, inactiva, extermina, y/o lisa para volverlos inofensivos. Las composiciones para la recolección de muestras biológicas pueden mantenerse en concentraciones listas para el uso, o en formas concentradas tales como, por ejemplo, 2x, 5x, 10x, 20x 25x, 30x o más, según sea conveniente o necesario para la aplicación particular.

Preferentemente la población de polinucleótidos así obtenida a partir del método será preferentemente sustancialmente estable, de manera que los ácidos nucleicos no se degraden sustancialmente, y la integridad de la población de polinucleótidos obtenida se mantendrá preferentemente al menos sustancialmente, de manera que los polinucleótidos obtenidos se mantengan sustancialmente intactos, y presentes en la muestra en la forma en que estaban cuando las células que los contenían se liberaron/lisaron inicialmente por la acción de los componentes presentes en la composición. Como se indica en la presente descripción, en aplicaciones preferidas del método, la población de polinucleótidos específicos de patógenos obtenida con el uso de los métodos descritos es sustancialmente estable y no está degradada de manera que los ácidos nucleicos liberados pueden mantenerse sin degradarse significativamente durante períodos de tiempo significativos incluso a temperaturas ambientales inferiores a las ideales (*por ejemplo*, a una temperatura de alrededor de 0 °C a incluso alrededor de 40 °C o más) durante períodos de tiempo prolongados (*por ejemplo*, durante períodos de varias horas a varios días a varias semanas o incluso meses), lo que los hace de este modo adecuados para el análisis molecular posterior (*por ejemplo*, reacciones de amplificación dependientes de plantilla y otros) días a semanas después de tener lugar la extracción de los ácidos nucleicos, incluso cuando no es posible almacenar congeladas, en hielo, o refrigeradas las poblaciones de polinucleótidos extraídas de las muestras entre la recolección de muestras inicial y el análisis molecular posterior.

Como se indica en la presente descripción, en ejemplos preferidos, (i) el uno o más agentes caotrópicos incluyen preferentemente tiocianato de guanidina, isocianato de guanidina, clorhidrato de guanidina, o cualquier combinación de estos; (ii) el uno o más detergentes incluyen preferentemente dodecil sulfato de sodio, dodecil sulfato de litio, taurodesoxicolato de sodio, taurocolato de sodio, glicocolato de sodio, desoxicolato de sodio, colato de sodio, alquilbenzeno sulfonato de sodio, *N*-lauroil sarcosina, o cualquier combinación de estos; (iii) el uno o más agentes reductores incluyen preferentemente 2-mercaptoetanol, tris(2-carboxietil) fosfina, ditiotreitól, dimetilsulfóxido, o cualquier combinación de estos; (iv) el uno o más quelantes incluyen preferentemente ácido etilenglicol tetraacético, ácido hidroxietilendiaminotriacético, ácido dietilentriamino pentaacético, *N,N*-bis(carboximetil)glicina, etilendiaminotetraacético, citrato anhidro, citrato de sodio, citrato de calcio, citrato de amonio, bicitrato de amonio, ácido cítrico, citrato de diamonio, citrato de amonio férrico, citrato de litio, o cualquier combinación de estos; o (v) el uno o más tampones incluyen preferentemente tris(hidroximetil) aminometano, citrato, ácido 2-(*N*-morfolino)etanosulfónico, ácido *N,N*-Bis(2-hidroxietil)-2-aminoetanosulfónico, 1,3-bis(tris(hidroximetil)metil amino)propano, ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etanosulfónico, ácido 3-(*N*-morfolino) propanosulfónico, bicarbonato, fosfato, o cualquier combinación de estos.

Las formulaciones preferidas que están a concentraciones listas para el uso incluyen: (a)(i) alrededor de 3 M de tiocianato de guanidina; (ii) alrededor de 1 mM de TCEP; (iii) alrededor de 10 mM de citrato de sodio; (iv) alrededor de 0,5 % de *N*-lauroil sarcosina; (v) alrededor de 0,0002 % de polímero de silicona; (vi) alrededor de 100 mM de 2-amino-2-hidroximetilpropano-1,3-diol (TRIS); y (vii) alrededor de 0,1 mM de EDTA; o (b) (i) alrededor de 3 M de tiocianato de guanidina; (ii) 1 mM de TCEP; alrededor de 10 mM de citrato de sodio; (iii) alrededor de 0,5 % de *N*-lauroil sarcosina, sal de sodio; (iv) alrededor de 0,0002 % de un polímero de silicona; (v) alrededor de 100 mM de TRIS; (vi) alrededor de 0,1 mM de EDTA; y (vii) alrededor de 10 % a alrededor de 25 % de etanol (vol./vol.).

Debido a la notable eficacia de las formulaciones descritas para exterminar y lisar fácilmente las células, desnaturalizar los componentes celulares proteicos e inactivar enzimas tales como las nucleasas endógenas y exógenas que son perjudiciales para la conservación de los ácidos nucleicos intactos, los inventores han demostrado que en ciertos casos, sustancialmente todos los microorganismos presentes en una muestra mueren y/o se lisan dentro de los primeros minutos de ponerse en contacto con la composición. En algunos casos, la muerte y lisis de las células se completa sustancialmente dentro de alrededor de 3 o alrededor de 4 o alrededor de 5 minutos de poner en contacto la muestra con la composición. Del mismo modo, en otros casos, poner en contacto la muestra con la composición durante un período de alrededor de 6, o alrededor de 7, o alrededor de 8, o alrededor de 9, o alrededor de 10 minutos es suficiente para exterminar y/o lisar sustancialmente todos los patógenos que puedan estar presentes en la muestra recolectada. Del mismo modo, sustancialmente todas las proteínas, enzimas, nucleasas, y similares liberadas de las células lisadas presentes en una muestra se inactivan y/o desnaturalizan sustancialmente todas dentro de tan solo unos minutos de poner en contacto la muestra con la composición.

Preferentemente las muestras serán de origen biológico, clínico, veterinario, o ambiental, y en ciertas modalidades, las muestras son preferentemente de origen humano y, en particular, de seres humanos que tienen, se sospecha que tienen, o están en riesgo de desarrollar una infección microbiana, tal como una infección tuberculosa causada por una o más

cepas o especies del género *Mycobacterium*. Los individuos de los que se toman las muestras pueden ser pacientes que también tienen, se sospecha que tienen, o están en riesgo de desarrollar una o más afecciones médicas secundarias o terciarias y, en particular, una infección secundaria y/o terciaria por una o más especies de bacterias no patógenas, o una o más especies patógenas de origen fúngico o viral, o cualquier combinación de estas.

5

Preferentemente la población de segmentos de ácidos nucleicos contenida con la pluralidad de polinucleótidos aislados y purificados obtenidos a partir de una muestra será adecuada para la amplificación dependiente de cebadores y, particularmente, cuando los polinucleótidos se almacenan en la composición durante un período de alrededor de 1 a alrededor de 90 días entre el momento de la recolección de muestras y el análisis molecular, incluso cuando se almacenan en condiciones de almacenamiento inferiores a las ideales, que incluyen, por ejemplo, el almacenamiento a temperatura ambiental de alrededor de 0 °C a alrededor de 40 °C, preferentemente a temperaturas ambientales.

10

En algunos ejemplos, el método incluye además la etapa de detectar dentro de la población de polinucleótidos específicos de patógenos obtenida la presencia de al menos un primer segmento de ácido nucleico específico de patógeno al poner en contacto la población con una sonda de detección de oligonucleótido etiquetada, en donde la presencia de un producto de hibridación etiquetado es indicativa de la presencia de uno o más segmentos de ácidos nucleicos específicos de patógenos en la población de polinucleótidos obtenida.

15

En ejemplos ilustrativos, la sonda de detección de oligonucleótido etiquetada incluye al menos una primera región de secuencia que consiste en la secuencia de la SEQ ID NO:4 o la SEQ ID NO:7. La composición puede incluir además inicialmente una cantidad conocida de al menos un primer segmento de ácido nucleico de control positivo interno de alrededor de 50 a alrededor de 500, alternativamente, de alrededor de 70 a alrededor de 250, o aún alternativamente, de alrededor de 90 a alrededor de 150 nucleótidos de longitud, en donde el segmento de ácido nucleico de control positivo interno no se hibrida sustancialmente con los ácidos nucleicos genómicos del huésped del que se obtuvo la muestra, ni con los ácidos nucleicos genómicos de un patógeno. Dichos IPC se describen en detalle en la presente descripción, y pueden incluir un ADN monocatenario, un ADN bicatenario, un ARN monocatenario, un ARN bicatenario, o un híbrido ADN:ARN bicatenario. En ciertas modalidades, el segmento de ácido nucleico de IPC incluye una secuencia de al menos 40 nucleótidos contiguos, una secuencia de al menos 50 nucleótidos contiguos, una secuencia de al menos 60 nucleótidos contiguos, una secuencia de al menos 70 nucleótidos contiguos, o una secuencia de al menos 80 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO:8, o el complemento de esta.

20

25

30

En ejemplos ilustrativos, el IPC incluye: (a) un primer dominio de secuencia que se une específicamente a una sonda de detección de oligonucleótido etiquetada de alrededor de 15 a alrededor de 40 nucleótidos de longitud, de alrededor de 18 a alrededor de 35 nucleótidos de longitud, o de alrededor de 20 a alrededor de 30 nucleótidos de longitud, que es específica para el primer segmento de ácido nucleico de control positivo interno; (b) un segundo dominio de secuencia que se une específicamente a un cebador directo de amplificación por PCR de alrededor de 15 a alrededor de 45 nucleótidos de longitud, alrededor de 25 a alrededor de 35 nucleótidos de longitud, o alrededor de 20 a alrededor de 30 nucleótidos de longitud; y (c) un tercer dominio de secuencia que se une específicamente a un cebador inverso de amplificación por PCR de alrededor de 15 a alrededor de 45 nucleótidos de longitud, alrededor de 18 a alrededor de 40 nucleótidos de longitud, alrededor de 21 a alrededor de 35 nucleótidos de longitud, o alrededor de 24 a alrededor de 30 nucleótidos de longitud, en donde el segundo y tercer dominios de secuencia se posicionan operativamente corriente arriba, y corriente abajo, respectivamente, del primer dominio de secuencia para facilitar una amplificación dirigida por PCR de al menos una primera porción del segmento de ácido nucleico de control positivo interno a partir de los cebadores directo e inverso en condiciones eficaces para amplificar la al menos una primera porción.

35

40

45

El método también puede incluir preferentemente además al menos las etapas de (a) realizar al menos una etapa de termociclado, en donde el ciclo comprende al menos una primera etapa de amplificación y al menos una primera etapa de hibridación, en donde la al menos una primera etapa de amplificación comprende poner en contacto la población de polinucleótidos obtenida con una composición que comprende al menos un par de cebadores de amplificación específicos distintos, seleccionados independientemente, una polimerasa termoestable, un primer agente de osmolaridad que comprende betaína u otro compuesto zwitteriónico funcionalizado catiónico, al menos un primer colorante de referencia, y una pluralidad de desoxinucleósidos trifosfatados para producir al menos un primer producto de amplificación específico de patógeno; y (b) detectar la presencia del producto de amplificación así producido al ponerlo en contacto con una primera sonda de detección de oligonucleótido específico de patógeno etiquetada, en donde la presencia de un producto de hibridación etiquetado es indicativa de la presencia de uno o más segmentos de ácidos nucleicos específicos de patógenos en la población de polinucleótidos obtenida. En tales ejemplos, el par de cebadores de amplificación específicos de patógeno distintos, seleccionados independientemente, puede incluir preferentemente un primer cebador oligonucleotídico de 18 a alrededor de 30 nucleótidos de longitud, y un segundo cebador oligonucleotídico de 18 a alrededor de 30 nucleótidos de longitud, en donde cada uno del primer y segundo cebadores se hibridan específicamente con una primera, y una segunda región de secuencia distinta, respectivamente. Para la detección e identificación de micobacterias, preferentemente el par de cebadores comprende la secuencia de la 5'-SEQ ID NO:1 o el complemento de esta.

50

55

60

En ejemplos relacionados, el método de la presente invención puede incluir además opcionalmente la etapa de realizar una amplificación dependiente de cebador de al menos una primera región de secuencia del segmento de ácido nucleico

65

de control positivo interno en la población de polinucleótidos obtenida, y cuantificar la cantidad del segmento de ácido nucleico de control positivo interno presente en la población de polinucleótidos obtenida.

5 Del mismo modo, el método puede incluir además opcionalmente la etapa de comparar la cantidad del segmento de ácido nucleico de control positivo interno presente en la composición en una o más etapas a lo largo del proceso analítico, con la cantidad de IPC que estaba presente en la composición original antes de añadir inicialmente la muestra al medio de lisis/almacenamiento/transporte, o con la cantidad de ácidos nucleicos diana que estaban presentes en la composición original. Tal comparación puede servir para demostrar que la cantidad de IPC aún contenida en la muestra en un punto posterior del ensayo es comparable con, o sustancialmente igual a, la cantidad conocida de IPC que estaba presente en la composición de MTM antes de añadirle la muestra, y puede servir para cuantificar la cantidad de ácidos nucleicos diana de interés en las muestras recolectadas, o de componentes analizados posteriormente. Tal información también puede ser indicativa de la cantidad de los ácidos nucleicos que quedan en la muestra en comparación con la que estaba presente originalmente, y puede proporcionar una estimación del grado de degradación en la muestra de los polinucleótidos presentes originalmente con el tiempo.

15 En algunas aplicaciones de la presente tecnología, la amplificación dependiente de cebadores de la menos una primera región de secuencia del segmento de ácido nucleico de control positivo interno se realiza posteriormente a la amplificación del segmento de ácido nucleico específico de patógeno, mientras que en otros aspectos, la amplificación dependiente de cebadores de la al menos una primera región de secuencia del segmento de ácido nucleico de control positivo interno se realiza sustancialmente de manera simultánea con la amplificación del segmento de ácido nucleico específico de patógeno.

20 El producto de amplificación del segmento de ácido nucleico de control positivo interno puede detectarse con una sonda de detección de oligonucleótido adecuada que comprende una primera etiqueta detectable, y el producto de amplificación del segmento de ácido nucleico específico de patógeno se detecta con una sonda de detección de oligonucleótido que comprende una segunda etiqueta detectable distinta.

25 Tal método también puede incluir además opcionalmente detectar la presencia de uno o más genes de resistencia a fármacos dentro de la población de polinucleótidos obtenidos.

30 En la presente descripción se describe una composición compatible con la reacción de amplificación dependiente de cebadores que incluye preferentemente (a) uno o más tampones; (b) uno o más agentes de osmolaridad; (c) una o más proteínas albúminas; (d) uno o más quelantes; (e) una o más sales; (f) al menos un par de cebadores de amplificación específicos de patógeno distintos, seleccionados independientemente, en donde cada uno del primer y segundo cebadores se hibridan específicamente con una primera, y una segunda región de secuencia distinta; (g) una sonda de detección de oligonucleótido específico de patógeno que comprende una primera etiqueta detectable, que se hibrida específicamente con una tercera región de secuencia; (h) al menos una polimerasa termoestable capaz de realizar la reacción de amplificación dependiente de cebadores; e (i) una pluralidad de desoxinucleósidos trifosfatados, cada uno presente en una cantidad suficiente para permitir la amplificación de al menos un primer producto de amplificación específico de patógeno. Las composiciones que están listas para el termociclado (por ejemplo, listas para PCR) pueden mantenerse en concentraciones listas para el uso, o en formas concentradas tales como, por ejemplo, 2x, 5x, 10x, 20x 25x, 30x o más, según sea conveniente o necesario para la aplicación particular.

45 En ejemplos ilustrativos, (a) el uno o más tampones incluyen preferentemente tris(hidroximetil)aminometano (TRIS); (b) el uno o más agentes de osmolaridad de reacción en cadena de la polimerasa incluyen preferentemente N,N,N-trimetilglicina (betaína), dimetilsulfóxido (DMSO), foramida, glicerol, detergentes no iónicos, albúmina sérica bovina (BSA), polietilenglicol, cloruro de tetrametilamonio, o cualquier combinación de estos; (c) una o más proteínas albúminas, preferentemente BSA, HAS o cualquier albúmina de mamífero; (d) el uno o más quelantes incluyen preferentemente ácido etilenglicol tetraacético, ácido hidroxietilendiaminotriacético, ácido dietilentriamino pentaacético, N,N-bis(carboximetil)glicina, etilendiaminotetraacético, citrato anhidro, citrato de sodio, citrato de calcio, citrato de amonio, bicitrato de amonio, ácido cítrico, citrato de diamonio, citrato de amonio férrico, citrato de litio, o cualquier combinación de estos; y (e) la una o más sales incluyen preferentemente cloruro de potasio, sulfato de magnesio, glutamato de potasio, o cualquier combinación de estos, y el par de cebadores incluye preferentemente: (i) un primer cebador oligonucleotídico de 18 a alrededor de 30 nucleótidos de longitud que incluye preferentemente al menos una primera región de secuencia que consiste en una secuencia que es al menos 95 % idéntica a la secuencia de ácido nucleico específica de patógeno; y (ii) un segundo cebador oligonucleotídico de 18 a alrededor de 30 nucleótidos de longitud que incluye preferentemente al menos una primera región de secuencia que consiste en una secuencia que es al menos alrededor de 90 % idéntica, preferentemente al menos alrededor de 95 % idéntica, y con mayor preferencia, al menos alrededor de 98 % idéntica a la secuencia de ácido nucleico específica de patógeno, o un complemento de esta.

60 La sonda de detección de oligonucleótido específico de patógeno es preferentemente de 24 a alrededor de 35 nucleótidos de longitud, y con mayor preferencia incluye al menos una primera región de secuencia que consiste en una secuencia que es al menos 85 % idéntica, al menos 90 % idéntica, al menos 95 % idéntica, o al menos 98 % o más idéntica a al menos una primera secuencia de ácido nucleico contigua de una secuencia específica de patógeno, o un complemento de esta. La composición puede incluir además opcionalmente uno o más colorantes de referencia interna compatibles con

una reacción en cadena de la polimerasa, tales como los que incluyen uno o más fluoróforos, uno o más atenuadores, una o más moléculas reporteras, uno o más agentes intercalantes de ácidos nucleicos, o cualquier combinación de estos.

5 En modalidades ilustrativas, la composición a concentraciones listas para el uso incluye preferentemente (a) alrededor de 50 mM de TRIS; (b) alrededor de 70 mM de cloruro de potasio; (c) alrededor de 3 mM de sulfato de magnesio; (d) alrededor de 45 mM de betaína; (e) alrededor de 0,03 µg/ml de albúmina sérica bovina; (f) alrededor de 0,1 mM de EDTA; (g) alrededor de 0,01 µM a alrededor de 1 µM de colorante; (h) alrededor de 4 µM de un primer cebador oligonucleotídico de 18 a alrededor de 30 nucleótidos de longitud; (i) alrededor de 4 µM de un segundo cebador oligonucleotídico de 18 a
10 alrededor de 30 nucleótidos de longitud; (j) alrededor de 6 µM de una sonda de detección de oligonucleótido específico de patógeno de 24 a alrededor de 35 nucleótidos de longitud; (k) alrededor de 1 unidad de polimerasa *Taq*; y (l) alrededor de 0,2 mM de desoxinucleósidos trifosfatados.

15 La etiqueta detectable puede incluir preferentemente una o más etiquetas radioactivas, una o más etiquetas luminiscentes, una o más etiquetas quimioluminiscentes, una o más etiquetas fluorescentes, una o más etiquetas fosforescentes, una o más etiquetas magnéticas, una o más etiquetas de resonancia de espín, una o más etiquetas enzimáticas, o cualquier combinación de estas. Las etiquetas detectables ilustrativas incluyen, sin limitación, fluoresceína, 6-carboxifluoresceína (6-FAM), 6-carboxifluoresceína-*N*-succinimidil éster (6-FAMSE), un colorante VIC, o cualquier combinación de estos.

20 Como se indica en la presente descripción, la invención proporciona además kits de diagnóstico que incluyen preferentemente una o más de las composiciones descritas en la presente descripción, e instrucciones para el uso del kit en la detección de un segmento de ácido nucleico específico de patógeno en una muestra acuosa; opcionalmente el kit puede incluir además (típicamente en un contenedor distinto y separado), una primera composición de MTM que comprende: a) uno o más agentes caotrópicos; b) uno o más detergentes; c) uno o más agentes reductores; d) uno o más
25 quelantes; y e) uno o más tensioactivos, cada uno presente en una cantidad para exterminar o lisar sustancialmente una o más células patógenas o infectadas, o para desnaturalizar o inactivar una o más proteínas, enzimas, o nucleasas liberadas de estas cuando se colocan en la composición durante una cantidad de tiempo eficaz. En ciertas modalidades, el kit también puede incluir además (preferentemente dentro de la composición de MTM) una cantidad conocida de al menos un primer segmento de ácido nucleico de control positivo interno (y preferentemente uno de alrededor de 50 a
30 alrededor de 500 nucleótidos de longitud), en donde el segmento de ácido nucleico de control positivo interno no se hibrida sustancialmente (y preferentemente, no se hibrida específicamente) con los ácidos nucleicos genómicos del huésped del que se obtuvo la muestra, ni con los ácidos nucleicos genómicos del uno o más patógenos microbiológicos que se sospechan dentro de la muestra. Como se indica en la presente descripción, tales kits también pueden incluir además opcionalmente uno o más aparatos de extracción para aislar y purificar la población de polinucleótidos de la muestra lisada/liberada/desnaturalizada en contacto con la formulación de MTM. Un aparato de extracción de este tipo puede ser
35 un dispositivo portátil, de mesa, o incluso un dispositivo de mano que incluye preferentemente: (i) un recipiente de filtración que tiene al menos un extremo receptor y que comprende un filtro de membrana adaptado para unirse a la población de polinucleótidos, en donde el filtro de membrana se dispone al menos sustancialmente a través de un ancho del recipiente de filtración y al menos parcialmente en este; y (ii) un mecanismo dispensador de volumen adaptado para dispensar de manera controlable e inyectar a la fuerza una cantidad de líquido asociado operativamente con el recipiente de filtración
40 para filtrar el líquido a través de este; y b) instrucciones para el uso del aparato de extracción para obtener la población de polinucleótidos purificados a partir de una muestra acuosa con sospecha de comprender al menos un primer patógeno.

45 Las composiciones, los kits y los métodos descritos en la presente descripción mejoran de manera ventajosa la recolección de especímenes convencional, garantizan la lisis de cualquiera de los patógenos microbianos contenidos en estos y facilitan el transporte y almacenamiento seguro y eficaz de tales muestras desde el punto de recolección hasta el punto de identificación y ensayo. Por otra parte, las composiciones de medio de transporte molecular descritas en la presente descripción facilitan la estabilización de los ácidos nucleicos liberados de los microorganismos recolectados, así como mantienen la fidelidad y conservan la integridad de los ácidos nucleicos liberados durante períodos de tiempo prolongados, incluso en condiciones de almacenamiento ambientales, o inferiores a las ideales.

50 En consecuencia, la composición descrita en la presente descripción proporciona de manera ventajosa una formulación de recolección y conservación que lisa patógenos biológicos, estabiliza los ácidos nucleicos liberados (tanto los ARN como los ADN), y preferentemente mantiene al menos sustancialmente, y preferentemente mantiene completamente, la integridad de los polinucleótidos recolectados de manera que al menos una primera porción de estos está fácilmente disponible, e idealmente es adecuada para el análisis de diagnóstico molecular posterior de los ácidos nucleicos
55 contenidos dentro del espécimen recolectado.

60 Las formulaciones de aislamiento/almacenamiento/transporte en "una sola etapa" descritas en la presente descripción realizan de manera ventajosa al menos una o más, y preferentemente, todas, las funciones principales siguientes: inactivación o muerte de los patógenos dentro de la muestra; lisis de células y liberación de ácidos nucleicos desde dentro de las células; inactivación de enzimas celulares, que incluyen nucleasas endógenas y exógenas, para impedir la degradación de los ácidos nucleicos liberados; facilitación de la recolección fácil y la manipulación/transporte seguro de la muestra de polinucleótidos aislados a temperaturas ambientales durante períodos de tiempo prolongados sin la necesidad de refrigeración o temperaturas de almacenamiento bajo cero convencionales; estabilización eficaz de los
65 ácidos nucleicos durante la manipulación, transporte y/o almacenamiento posterior de la muestra; y conservación y/o mantenimiento de la integridad de al menos una primera porción de la población de polinucleótidos contenida en esta

durante un tiempo suficiente para permitir la caracterización molecular y la identificación de al menos un primer segmento de ácido nucleico contenido en esta.

5 En aspectos particulares como se describe en la presente descripción, y particularmente cuando se realiza el método para el análisis de especímenes que se adquieren en sitios remotos o "de campo", las composiciones de medio de transporte molecular (MTM) de la presente invención preferentemente estabilizan la muestra biológica recolectada durante al menos un período de tiempo suficiente para facilitar el análisis molecular posterior, sin una degradación o pérdida sustancial de al menos una primera población de ácidos nucleicos obtenida a partir de la muestra recolectada. Preferentemente, las composiciones de MTM en la presente descripción facilitan la recolección/transporte/almacenamiento de los especímenes biológicos recolectados en estas durante períodos de tiempo prolongados (desde unas pocas horas hasta unos pocos días, o incluso unas pocas semanas o meses o más) a temperaturas ambientales del entorno, de manera que las muestras recolectadas no requieren refrigeración y/o congelación para conservarlas para pruebas moleculares posteriores. Aún con mayor preferencia, las formulaciones de MTM descritas en la presente descripción estabilizan y conservan los ácidos nucleicos recolectados de manera suficiente para permitir la amplificación e identificación posterior de al menos una primera secuencia de ácido nucleico de al menos un primer patógeno microbiano presente en la muestra recolectada.

20 En ejemplos ilustrativos, las formulaciones de MTM descritas en la presente descripción incluyen además opcionalmente al menos un primer control positivo interno (IPC) para facilitar la recuperación mejorada de los polinucleótidos específicos de microbios, y para permitir la determinación de la fidelidad de la secuencia y la conservación del espécimen recolectado. Las secuencias de polinucleótidos conocidas ilustrativas pueden estar presentes en el reactivo de recolección en el momento de la recolección de especímenes, y el análisis posterior de esta cantidad conocida de IPC puede usarse para monitorear con exactitud la fidelidad de la población de polinucleótidos a lo largo de las fases de recolección/transporte/análisis de los métodos de identificación descritos.

25 Los patógenos ilustrativos a identificar con el uso de los medios de transporte descritos en la presente descripción incluyen, pero no se limitan a, una o más micobacterias, que incluyen, sin limitación, una o más especies o cepas del género *Mycobacterium*, que incluyen uno o más agentes causales de la tuberculosis.

30 La integridad de la población de polinucleótidos se mantiene al menos sustancialmente, y la población de polinucleótidos permanece sustancialmente no degradada, cuando la población de polinucleótidos se almacena a una temperatura de alrededor de 10 °C a alrededor de 40 °C durante un período de alrededor de 1 a alrededor de 30 días antes de la etapa de termociclado en la composición que incluye (a)(i) alrededor de 3 M de tiocianato de guanidina; (ii) alrededor de 1 mM de TCEP; (iii) alrededor de 10 mM de citrato de sodio; (iv) alrededor de 0,5 % de *N*-lauroil sarcosina; (v) alrededor de 0,0002 % de polímero de silicona; (vi) alrededor de 100 mM de 2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol (TRIS); y (vii) alrededor de 0,1 mM de EDTA; o (b) (i) alrededor de 3 M de tiocianato de guanidina; (ii) 1 mM de TCEP; alrededor de 10 mM de citrato de sodio; (iii) alrededor de 0,5 % de *N*-lauroil sarcosina, sal de sodio; (iv) alrededor de 0,0002 % de un polímero de silicona; (v) alrededor de 100 mM de TRIS; (vi) alrededor de 0,1 mM de EDTA; y (vii) alrededor de 10 % a alrededor de 25 % de etanol (vol./vol.). En algunos ejemplos, la integridad de la población de polinucleótidos se mantiene al menos sustancialmente, y la población de polinucleótidos permanece sustancialmente no degradada, cuando la composición que contiene la población de polinucleótidos se almacena a una temperatura de alrededor de 10 °C a alrededor de 40 °C durante un período de alrededor de 1 a alrededor de 7 días o de un período de alrededor de 7 días a alrededor de 14 días, o de 14 días a alrededor de 28 días.

45 En ejemplos particulares, la integridad de los polinucleótidos dentro de la población se mantiene sustancialmente de manera que al menos alrededor de 75 %, o al menos alrededor de 80 %, al menos alrededor de 85 % o al menos alrededor de 90 %, al menos alrededor de 95 %, al menos alrededor de 98 % y en algunos casos al menos alrededor de 99 %, de los polinucleótidos iniciales permanecen al menos sustancialmente de longitud completa tras el almacenamiento de la composición a una temperatura de alrededor de 10 °C a alrededor de 40 °C durante un período de alrededor de 1 a alrededor de 30 días y, en algunas modalidades, durante un período de alrededor de 1 a 14 días.

50 La población de polinucleótidos así analizada se obtendrá preferentemente a partir de una muestra biológica, con muestras biológicas obtenidas de un mamífero (que incluye *por ejemplo*, seres humanos, primates no humanos, ganado doméstico, y similares). Las muestras pueden obtenerse en cualquier momento adecuado antes del protocolo de amplificación, y detección posterior de los productos de amplificación, pero en aspectos particulares, el tiempo entre la recolección de muestras, el aislamiento de una población de polinucleótidos de la muestra, y el análisis de amplificación/detección de los ácidos nucleicos diana de interés es bastante corto, tal como, en el orden de minutos a horas desde la recolección de especímenes hasta la detección de los productos de amplificación, mientras que en otras modalidades, el análisis de amplificación/detección de los ácidos nucleicos diana de interés puede ser más largo.

60 En un ejemplo descrito en la presente descripción, un método para recolectar una muestra biológica con sospecha de contener al menos una primera población de polinucleótidos aislados de un patógeno incluye: colocar la muestra biológica en un primer dispositivo de recolección que contiene al menos una primera solución que comprende a) uno o más agentes caotrópicos; b) uno o más detergentes; c) uno o más agentes reductores; d) uno o más quelantes; y e) uno o más tensioactivos, cada uno presente en una cantidad suficiente para desnaturalizar una o más proteínas, o inactivar una o más nucleasas; en donde la solución de recolección extermina, inactiva o descontamina cualquiera de los patógenos que estén presentes en el espécimen para una manipulación y transporte seguros; y en donde la integridad de la población

de polinucleótidos se mantiene al menos sustancialmente y la población de polinucleótidos permanece sustancialmente no degradada cuando la solución de recolección que contiene la población de polinucleótidos se almacena a una temperatura de alrededor de 10 °C a alrededor de 40 °C durante un período de alrededor de 1 a 42 días antes de la extracción de la población de polinucleótidos de la solución de recolección.

En un ejemplo adicional, la muerte, inactivación o descontaminación ocurre dentro de alrededor de cinco minutos o menos de entrar en contacto con la solución de recolección. En algunos ejemplos, la muerte, inactivación o descontaminación ocurre dentro de alrededor de dos minutos de entrar en contacto con la solución de recolección. En otros ejemplos, la muerte, inactivación o descontaminación ocurre dentro de alrededor de un minuto de entrar en contacto con la solución de recolección.

En algunos ejemplos, la población de polinucleótidos obtenida a partir de la muestra biológica se analiza posteriormente. La invención proporciona una mezcla de reactivos para la detección de una secuencia microbiana, la mezcla de reactivos incluye cebadores específicos del microbio, una o más sondas, y una o más enzimas, presentes en una mezcla que es al menos sustancialmente estable a temperatura ambiental y está adaptada y configurada para el uso con un dispositivo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En una modalidad, la mezcla de reactivos es sustancialmente estable a temperatura ambiental durante al menos alrededor de 5 días y hasta dos semanas. En otra modalidad, la detección de la secuencia microbiana ocurre dentro de alrededor de 90 minutos después de extraer la secuencia microbiana de una muestra. La mezcla de reactivos puede usarse para identificar una secuencia microbiana. La mezcla de reactivos de la presente invención, también denominada en la presente descripción "PrimeMix®" y, en algunos casos, "PrimeMix® Universal MTB", puede usarse además para identificar cepas de una secuencia viral o bacteriana, o incluso cepas de tuberculina específica de especie.

En la presente descripción se describe una composición que incluye al menos una secuencia de ácido nucleico específica de microbio o una muestra biológica con sospecha de contener al menos una secuencia de ácido nucleico específica de microbio; una solución que comprende: (i) uno o más tampones (cada uno presente en la composición preferentemente en una cantidad de alrededor de 1 mM a alrededor de 1 M); (ii) uno o más agentes de osmolaridad o proteínas albúminas al menos uno de los cuales comprende betaina (cada uno presente en la composición preferentemente en una cantidad de alrededor de 1 mM a alrededor de 1 M); (iii) uno o más quelantes (cada uno presente en la composición preferentemente en una cantidad de alrededor de 0,01 mM a alrededor de 1 mM); (iv) uno o más colorantes de referencia (cada uno presente en la composición preferentemente en una cantidad de alrededor de 0,01 µM a alrededor de 50 mM, con mayor preferencia alrededor de 0,02 µM a alrededor de 1 µM); y (v) una o más sales (cada una presente en la composición preferentemente en una cantidad de alrededor de 50 mM a alrededor de 1 M); y un primer par de cebadores de amplificación específicos de patógeno. En algunos ejemplos, la composición incluye además una sonda específica de patógeno. En un ejemplo, el colorante de referencia está presente en una cantidad de alrededor de 0,01 µM a alrededor de 1 µM. Preferentemente la composición incluye una o más sales. Las sales son preferentemente cloruro de potasio, cloruro de magnesio, sulfato de magnesio, glutamato de potasio, o cualquier combinación de estas. Preferentemente, la concentración de sal en la composición está entre alrededor de 0,5 mM y alrededor de 50 mM.

La inclusión de uno o más tampones es conveniente para controlar el pH de las formulaciones lo que estabiliza los ácidos nucleicos y las enzimas. Un intervalo de pH preferido es de alrededor de 6,0 a alrededor de 9,5, preferentemente entre alrededor de 6,5 y alrededor de 8,0, y con mayor preferencia entre alrededor de 6,5 y alrededor de 7,5. Preferentemente, el pH del tampón y/o la composición en general está dentro de una unidad del pKa del tampón, con mayor preferencia dentro de alrededor de 0,5 unidades, con mayor preferencia dentro de alrededor de 0,2 unidades y con mayor preferencia dentro de alrededor de 0,1 unidades, todo como se mide a una temperatura seleccionada, preferentemente una temperatura ambiental. Los tampones ilustrativos incluyen, sin limitación, tris(hidroximetil) aminometano (Tris), citrato, ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES), ácido *N,N*-Bis(2-hidroxiethyl)-2-aminoetanosulfónico (BES), 1,3-bis(tris(hidroximetil) metilamino)propano (Bis-Tris), ácido 4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazinoetanosulfónico (HEPES), ácido 3-(*N*-morfolino)propanosulfónico (MOPS), *N,N*-bis(2-hidroxiethyl) glicina (Bicina), *N*-[tris(hidroximetil)metil]glicina (Tricina), ácido *N*-2-acetamido-2-iminodiacético (ADA), ácido *N*-(2-acetamido)-2-aminoetanosulfónico (ACES), piperazina-1,4-bis(ácido 2-etanosulfónico) (PIPES), bicarbonato, fosfato, o cualquier combinación de estos. En una modalidad preferida, el tampón incluye TRIS.

Al menos un primer agente de osmolaridad puede usarse dentro del método para optimizar las condiciones de reacción, especialmente cuando un alto contenido de guanina y citosina está presente en las secuencias, y pueden incluir, sin limitación, betaina, trimetilglicina, glicina betaina, dimetilsulfóxido (DMSO), foramida, desoxinosina, glicerina, trifosfato de 7-deaza desoxiguanosina, o hidróxido de sodio, o cualquier combinación de estos.

Los quelantes ilustrativos incluyen, sin limitación, ácido etilenglicol tetraacético (EGTA), ácido hidroxietilendiaminotriacético (HEDTA), ácido dietilentriamino pentaacético (DTPA), *N,N*-bis(carboximetil)glicina (NTA), etilendiaminotetraacético (EDTA), citrato anhidro, citrato de sodio, citrato de calcio, citrato de amonio, bicitrato de amonio, ácido cítrico, citrato de diamonio, citrato de potasio, citrato de magnesio, citrato de amonio férrico, citrato de litio, o cualquier combinación de estos. En ejemplos preferidos, el quelante incluye EDTA, un citrato, o una combinación de estos. En ejemplos más preferidos, el quelante incluye EDTA.

Al menos un primer colorante de referencia, preferentemente una sustancia química inerte, puede usarse opcionalmente dentro del método para normalizar los resultados obtenidos cuando se usan compuestos fluorescentes, tales como los que se usan en las tecnologías FRET. El colorante de referencia, cuando se incluye, puede proporcionar una referencia interna respecto a la cual puede normalizarse la señal del colorante reportero. Un colorante de referencia de este tipo puede incluir, sin limitación, colorantes de referencia pasivos tales como fluoresceína, 5-carboxi-X-rodamina y formulaciones comerciales tales como ROX™, o una combinación de estos. En un ejemplo más preferido, el colorante de referencia incluye ROX™.

Preferentemente, las composiciones incluyen además la adición de desoxinucleótidos trifosfatados (dNTP), tales como trifosfato de desoxiadenosina, trifosfato de desoxiguanosina, trifosfato de desoxicitidina, trifosfato de desoxitimidina, o trifosfato de desoxiuracina, o una combinación de estos, en una cantidad de alrededor de 0,1 mM a alrededor de 50 mM.

Las composiciones de la invención incluyen además uno o más compuestos o reactivos adicionales que incluyen, pero no se limitan a, albúmina. Albúmina se refiere generalmente a cualquier proteína que es soluble en agua, es moderadamente soluble en soluciones salinas concentradas, y experimenta desnaturalización por calor. Las albúminas se encuentran comúnmente en el plasma sanguíneo y son únicas respecto a otras proteínas de la sangre en el hecho de que no están glicosiladas. Preferentemente la albúmina es albúmina sérica bovina (BSA), sulfato de magnesio, agua y ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico e hidróxido de sodio. Los ácidos o bases pueden añadirse a la solución final para ajustar el pH. Preferentemente, la BSA se añade en una concentración de alrededor de 0,01 µg/µl a alrededor de 0,5 µg/µl.

Las composiciones de la invención incluyen además una o más polimerasas. La una o más polimerasas pueden incluir, pero no se limitan a, polimerasa Taq, y polimerasas de alta fidelidad. Preferentemente como se describe en la presente descripción, la una o más polimerasas están presentes en una cantidad de alrededor de 1 U de enzima a alrededor de 10 hasta alrededor de 50 µl de solución final.

En modalidades particulares, la composición incluirá además preferentemente al menos una primera sonda de detección de oligonucleótido que incluye una etiqueta radioactiva, luminiscente, quimioluminiscente, fluorescente, enzimática, magnética, o de resonancia de espín, o una combinación de estas. Las etiquetas fluorescentes pueden incluir fluoresceína, 6-carboxifluoresceína (6-FAM), o 6-carboxifluoresceína-*N*-succinimidil éster (6-FAMSE), o similares, o una combinación de estos. La concentración de cebadores y/o sonda preferida para cada ácido nucleico está entre alrededor de 1 pmol y alrededor de 10 µM.

La invención proporciona además un método para detectar la presencia o ausencia de un segmento de ácido nucleico específico de patógeno en una población de polinucleótidos obtenida a partir de una muestra biológica, el método incluye: (a) realizar al menos una etapa de termociclado, en donde el ciclo comprende al menos una primera etapa de amplificación y al menos una primera etapa de hibridación, en donde la al menos una primera etapa de amplificación comprende poner en contacto una población de polinucleótidos obtenida a partir de una muestra biológica con sospecha de contener un segmento de ácido nucleico específico de patógeno con una composición que comprende al menos un par de cebadores de amplificación específicos de patógeno distintos, seleccionados independientemente, una polimerasa, un primer agente de osmolaridad que comprende betaína, opcionalmente (pero preferentemente) al menos un primer colorante de referencia, y una pluralidad de desoxinucleósidos trifosfatados para producir un producto de amplificación específico de patógeno cuando un segmento de ácido nucleico específico de patógeno está presente en la muestra; y (b) detectar la presencia del producto de amplificación al poner en contacto el producto de amplificación con una sonda de detección de oligonucleótido específico de patógeno que comprende una primera etiqueta detectable, en donde la presencia de un producto de hibridación etiquetado es indicativa de la presencia de uno o más segmentos de ácidos nucleicos específicos de patógeno en la población de polinucleótidos, en donde el par de cebadores de amplificación específicos de patógeno distintos, seleccionados independientemente, comprende un primer cebador oligonucleotídico de 18 a alrededor de 30 nucleótidos de longitud, y un segundo cebador oligonucleotídico de 18 a alrededor de 30 nucleótidos en longitud, en donde cada uno del primer y segundo cebadores se hibridan específicamente con una primera, y una segunda región de secuencia distintas, respectivamente, dentro de la secuencia específica de patógeno, o el complemento o el complemento inverso de esta.

Las formulaciones ilustrativas de la PrimeMix® para micobacterias de la invención se describen en los ejemplos en la presente descripción, e incluyen, sin limitación, una composición que incluye: (a) alrededor de 1 U de polimerasa Taq; (b) alrededor de 6 µM de la sonda de detección que incluye una secuencia de ácido nucleico que comprende, consiste esencialmente en, o consiste alternativamente en, la secuencia de ácido nucleico de 5'-ACCAGCACCTAACCGGCTGTGGGTA -3' (SEQ ID NO:4), o 5'-AGGGTTTCGCCTACGTGGCCTTTGT -3' (SEQ ID NO:7); (c) alrededor de 4 µM de un cebador oligonucleotídico inverso de menos de alrededor de 50, preferentemente menos de alrededor de 40, y aún con mayor preferencia, menos de alrededor de 30 nucleótidos de longitud que comprende, consiste esencialmente en, o consiste alternativamente en, una secuencia de ácido nucleico que es al menos 98 % idéntica a una o más de las secuencias de ACAAGGCCACGTAGGCGA -3' (SEQ ID NO:3), o 5'-ACCGACGCCTACGTGCGA -3' (SEQ ID NO:6), o el complemento de estas; (d) alrededor de 4 µM de un cebador oligonucleotídico directo de menos de alrededor de 50, preferentemente menos de alrededor de 40, y aún con mayor preferencia, menos de alrededor de 30 nucleótidos de longitud que comprende, consiste esencialmente en, o consiste alternativamente en, una secuencia de ácido nucleico que es al menos 98 % idéntica a una o más de las secuencias de 5'-CTCGTCCAGCGCCGCTTC -3' (SEQ ID NO:2), o

5'-ACCAGCACCTAACCGGCT -3' (SEQ ID NO:5), o el complemento de estas; (e) alrededor de 50 mM de Tris; (f) alrededor de 70 mM de KCl; (g) alrededor de 3 mM de MgSO₄; (h) alrededor de 45 mM de Betaína; (i) alrededor de 0,05 µM de ROX o colorante de referencia comparable; (j) alrededor de 0,025 µg/µl de BSA ultrapura; (k) alrededor de 0,2 mM de dNTP; y (l) alrededor de 0,1 mM de EDTA.

Una modalidad adicional de la invención incluye un método para la detección de una secuencia microbiana que incluye obtener ácido nucleico genómico a partir de una muestra biológica y analizar el material genómico mediante la adición del ácido nucleico a la mezcla de reactivos de uno o más cebadores específicos del microbio, sondas, o enzimas, o una combinación de estos, en donde la mezcla es sustancialmente estable a temperatura ambiental y está adaptada para el uso con un dispositivo de PCR. En otra modalidad, el dispositivo de PCR incluye un equipo de detección de fluorescencia para la detección por PCR en tiempo real.

La invención proporciona un método para detectar la presencia o ausencia de un segmento de ácido nucleico específico de *Mycobacterium*, y en aspectos particulares, proporciona un método para detectar la presencia o ausencia de un tipo, subtipo, o cepa particular de *M. tuberculosis*. En modalidades ilustrativas, la invención proporciona un método para identificar especies y cepas de *Mycobacterium* que contienen uno o más segmentos de ácido nucleico específico de IS6110 en una población de polinucleótidos que se obtiene preferentemente a partir de una muestra biológica.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para detectar rápidamente en una muestra biológica, una secuencia de polinucleótido particular, tal como la de la secuencia específica de IS6110 de *Mycobacterium*. En un sentido global y general, este método comprende la amplificación de una población de nucleótidos con sospecha de contener la secuencia particular con el uso de métodos convencionales tales como PCR y cebadores directos e inversos que son específicos para la secuencia diana, la hibridación de un conjunto de sondas específicas con el producto de PCR monocatenario resultante, la realización del análisis de la curva de fusión y el análisis del cambio en la T_m del híbrido del producto de PCR monocatenario con las sondas de hibridación.

La etiqueta en la sonda puede incluir, sin limitación, etiquetas radioactivas, luminiscentes, quimioluminiscentes, fluorescentes, enzimáticas, magnéticas, o de resonancia de espín conocidas para los expertos en las técnicas moleculares. En modalidades ilustrativas, la sonda etiquetada contiene al menos un primer ligando al surco menor. Un método de este tipo para la detección de polinucleótidos con el uso de una secuencia "sonda" etiquetada utiliza el proceso de transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET). Las metodologías de detección por FRET ilustrativas frecuentemente involucran pares de fluoróforos que comprenden un fluoróforo donante y un fluoróforo aceptor, en donde el fluoróforo donante es capaz de transferir energía de resonancia al fluoróforo aceptor. En ensayos de FRET ilustrativos, el espectro de absorción del fluoróforo donante no se superpone sustancialmente con el espectro de absorción del fluoróforo aceptor. Como se usa en la presente descripción, "una sonda oligonucleotídica donante" se refiere a un oligonucleótido que se etiqueta con un fluoróforo donante de un par de transferencia de energía de resonancia fluorescente. Como se usa en la presente descripción, "una sonda oligonucleotídica aceptora" se refiere a un oligonucleótido que se etiqueta con un fluoróforo aceptor de un par de transferencia de energía de resonancia fluorescente. Como se usa en la presente descripción, un "par de oligonucleótidos FRET" comprenderá típicamente un sonda oligonucleotídica "ancla" o "donante" y una sonda oligonucleotídica "aceptora" o "sensora", y dicho par forma una relación de FRET cuando la sonda oligonucleotídica donante y la sonda oligonucleotídica aceptora se hibridan con sus secuencias de ácidos nucleicos diana complementarias. Los pares de fluoróforos aceptables para el uso como pares de transferencia de energía de resonancia fluorescente son bien conocidos para los expertos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, fluoresceína/rodamina, ficoeritrina/Cy7, fluoresceína/Cy5, fluoresceína/Cy5.5, fluoresceína/LC Red 640, y fluoresceína/LC Red 705, y similares.

En la práctica habitual del método, la etapa de termociclado puede realizarse además en una o más muestras de control "negativas" y/o "positivas" como se hace rutinariamente en las técnicas de ensayo de genética molecular para garantizar la integridad, fidelidad, y exactitud del método. El uso de tales controles es rutinario para los expertos en la técnica y no es necesario describirlo en más detalle en la presente descripción. Del mismo modo, en la práctica de la invención, también puede ser conveniente incorporar uno o más "controles positivos internos" (IPC) conocidos en la población de polinucleótidos a aislar, para garantizar aún más la integridad, fidelidad, y/o exactitud del método descrito.

En ciertas modalidades, se contempla que la adición de ácidos nucleicos (*por ejemplo*, ARN y/o ADN) es beneficiosa para una variedad de propósitos y aplicaciones de los métodos descritos: a) como un "portador" (se ha demostrado previamente que la adición de pequeñas cantidades de ARN/ADN adicionales incrementa/aumenta el rendimiento general de las muestras/especímenes, particularmente los especímenes originales que pueden contener cantidades bajas de la diana, *es decir*, células, virus, bacterias); b) como un IPC para procesos moleculares posteriores y para dar seguimiento o monitorear la fidelidad de la preparación de ácidos nucleicos desde la recolección de muestras hasta la detección; y c) para la comparación con un 'calibrador' para análisis cuantitativos posteriores, *por ejemplo*, qRT-PCR y similares. En tales modalidades, podrían añadirse uno o más ácidos nucleicos conocidos o "de control" a las composiciones en una concentración final de alrededor de 1 ag a alrededor de 1 mg, con mayor preferencia de alrededor de 1 fg a alrededor de 1 µg, y aún con mayor preferencia, de alrededor de 1 pg a alrededor de 1 ng.

En una modalidad ilustrativa, la invención proporciona un ARN, ADN, PNA aislado monocatenario (mc) o bicatenario (bc), o un híbrido de estos que es útil: (a) como una molécula portadora para ayudar en la recuperación de polinucleótidos a

partir de una muestra biológica con sospecha de contener ácidos nucleicos, y/o (b) como un IPC (*es decir*, una secuencia "conocida", "reportera", "de control", "estándar", o "marcadora") para monitorear la integridad y fidelidad de la recolección de especímenes y el aislamiento/estabilización de los polinucleótidos. En ciertas modalidades, la invención proporciona un ARNbc, ADNbc, PNAbc aislado, o un híbrido de estos que es útil como una molécula portadora y/o como un IPC. En otras modalidades, la invención proporciona un ARNmc, ADNmc, PNAmc aislado, o un híbrido de estos que es útil como una molécula portadora y/o como una secuencia de IPC. En modalidades ilustrativas, la invención proporciona una molécula de ARNmc aislada que es útil como una molécula portadora y como una secuencia de IPC.

Tales moléculas pueden aislarse a partir de fuentes naturales, prepararse en el laboratorio, o alternativamente, un híbrido que contiene secuencias nativas y no nativas. Como se indica en la presente descripción, debido a que las composiciones de la invención son particularmente útiles para el aislamiento y la caracterización de especímenes biológicos obtenidos a partir de fuentes de mamíferos (y en particular, humanas) con sospecha de contener polinucleótidos de origen patógeno, es preferible que la(s) secuencia(s) empleada(s) como compuesto(s) portador(es) y/o de control positivo contenga(n) sustancialmente una secuencia de nucleótidos primaria que normalmente no se encuentra dentro del genoma de un mamífero, o dentro del genoma de un organismo que es patógeno para dicho mamífero. Los mamíferos ilustrativos incluyen, sin limitación, bovinos, ovinos, porcinos, lupinos, caninos, equinos, felinos, úrsidos, murinos, leoninos, lepóridos, hircinos, y primates no humanos.

Preferentemente, esta secuencia portadora/reportera no específica de patógeno y que no es de mamífero, no tiene reactividad cruzada, *es decir*, no se hibrida sustancialmente, o preferentemente, con secuencias específicas de mamíferos o patógenos, y como tal, se prefieren particularmente las secuencias no codificantes, no redundantes (*es decir*, sin sentido) en la formulación de secuencias portadoras/de control para minimizar la hibridación de la secuencia portadora/de control con un miembro de la población de polinucleótidos aislada obtenida a partir del espécimen recolectado. Las secuencias portadoras/de control ilustrativas por lo tanto, no se unen sustancialmente, o preferentemente, (*por ejemplo*, no se hibridan en condiciones de hibridación rigurosas) a una población de polinucleótidos aislada a partir de un genoma de mamífero, o a una población de polinucleótidos aislada a partir del genoma de una bacteria, un hongo, un virus que es patógeno para un mamífero. Las condiciones de hibridación rigurosas ilustrativas conocidas para los expertos en la técnica incluyen, sin limitación, (a) lavar previamente en una solución que contiene alrededor de SSC 5X, 0,5 % de SDS y 1,0 mM de EDTA (pH 8,0); (b) hibridar a una temperatura de alrededor de 60 °C a alrededor de 70 °C en SSC 5X durante toda la noche; y (c) posteriormente lavar a alrededor de 65 a alrededor de 70 °C durante 20 min con cada uno de SSC 2X, 0,5X y 0,2X que contienen 0,1 % de SDS), o condiciones de hibridación equivalentes a estas.

Otro aspecto de la invención proporciona una mezcla de reactivos que incorpora los cebadores y sondas mencionados anteriormente, y kits que comprenden tales composiciones para la realización de un método de amplificación por termociclado. En una modalidad, la invención proporciona un kit de diagnóstico de amplificación/detección de ácidos nucleicos que incluye generalmente, en un contenedor adecuado, un conjunto de cebadores de amplificación de oligonucleótidos específicos de patógenos como se describe en la presente descripción, e instrucciones para el uso del conjunto de cebadores en una amplificación por PCR de una población de polinucleótidos obtenida a partir de una muestra o espécimen biológico. Tales kits pueden incluir además opcionalmente, en el mismo contenedor, o en contenedores distintos, una sonda de detección de oligonucleótido que se une específicamente al producto de amplificación producido a partir de la amplificación por PCR de una población de polinucleótidos obtenida a partir de una muestra o espécimen biológico que contiene, o se sospecha que contiene, un segmento de ácido nucleico específico de patógeno. Tales kits también pueden incluir además opcionalmente, en el mismo contenedor, o en un contenedor distinto, uno o más de los reactivos, diluyentes, enzimas, etiquetas detectables (que incluyen, sin limitación, una o más etiquetas radioactivas, luminiscentes, quimioluminiscentes, fluorescentes, enzimáticas, magnéticas, o de resonancia de espín), dNTP, y similares que puedan requerirse para realizar una o más amplificaciones por termociclado de una población de polinucleótidos como se describe en la presente descripción.

Otro aspecto de la descripción proporciona en la presente descripción un kit para la recolección y/o almacenamiento, y/o transporte de la muestra biológica antes del análisis genético de la población de polinucleótidos abarcada en esta. La presente descripción permite una recolección mínima de material biológico tal como esputo, *es decir*, pueden usarse alrededor de 0,01 ml a alrededor de 25 ml, preferentemente alrededor de 0,05 ml a alrededor de 10 ml, con mayor preferencia 0,1 ml a alrededor de 5 ml. En tales ejemplos, un kit incluye preferentemente uno o más tampones, tensioactivos, agentes caotrópicos, DNasas, RNasas, u otros reactivos de aislamiento y/o purificación de ácidos nucleicos según puedan requerirse para preparar una muestra para el análisis, tal como los descritos anteriormente.

En ejemplos adicionales, los kits de la invención también pueden incluir además opcionalmente uno o más dispositivos o aparatos de extracción, como se describió anteriormente, para facilitar el aislamiento o separación de los ácidos nucleicos de la muestra biológica recolectada. Los kits de la invención también pueden incluir además opcionalmente uno o más sistemas de amplificación por PCR con termociclado, portátiles, resistentes, o utilizables en el campo y/o uno o más sistemas, dispositivos, o instrumentos para facilitar la detección, cuantificación, y/o distribución de la(s) etiqueta(s) detectable(s) empleada(s) para la visualización de los productos de amplificación producidos durante la práctica del método.

Los reactivos y kits de diagnóstico de la presente invención pueden envasarse para su distribución comercial, y pueden incluir además opcionalmente uno o más dispositivos de recolección, suministro, transporte, o almacenamiento para la

recolección, manipulación, o procesamiento de muestras o especímenes. El(Los) contenedor(es) de tales kits puede(n) incluir típicamente al menos un frasco, tubo de ensayo, matraz, botella, vaso de espécimen, u otro contenedor, en el que puede(n) colocarse la(s) composición(ones), y, preferentemente, en el que pueden distribuirse alícuotas de manera adecuada para la recolección, transporte, y almacenamiento de especímenes individuales. El kit puede incluir además un
 5 contenedor más grande, tal como una caja, que incluye los contenedores indicados anteriormente, junto con otros equipos, instrucciones, y similares. El kit también puede incluir opcionalmente uno o más reactivos, tampones o compuestos adicionales, y también puede incluir además opcionalmente instrucciones para el uso del kit en la recolección de una muestra clínica, de diagnóstico, ambiental, o forense, así como instrucciones para el almacenamiento y transporte de una muestra de este tipo una vez colocada en una o más de las composiciones descritas.

Se contempla que en ciertas modalidades, las composiciones descritas en la presente descripción pueden formularse de manera que toda la recolección de especímenes y el proceso de amplificación/detección de ácidos nucleicos puedan realizarse en condiciones remotas, de campo, de batalla, rurales, o que de cualquier otra manera no sean de laboratorio sin limitar significativamente la fidelidad, la exactitud, o la eficiencia de la metodología de amplificación/detección. Tales
 15 aspectos de la invención proporcionan ventajas particulares sobre los protocolos de aislamiento/recolección/transporte/almacenamiento/análisis laboriosos convencionales que requieren de varios días a varias semanas, y frecuentemente deben realizarse en condiciones que requieren refrigeración o congelación de la muestra y/o los reactivos de ensayo para completar correctamente el análisis. Al proporcionar mezclas de reactivos que incluyen una mezcla con todos los componentes necesarios para el aislamiento, almacenamiento, y estabilización de polinucleótidos, así como mezclas con todos los reactivos necesarios para la amplificación de nucleótidos diana seleccionados (que incluyen, sin limitación, los cebadores de amplificación y las sondas de detección descritos en la presente descripción, solos o en combinación con uno o más tampones de PCR, diluyentes, reactivos, polimerasas, etiquetas detectables, y similares), en una mezcla de reactivos fácil a temperatura ambiental, estable en almacenamiento,
 20 pueden lograrse ahorros significativos de costos, reducción de tiempo, y otras economías de escala con el uso de la presente invención en comparación con muchos de los ensayos de termociclado basados en sondas oligonucleotídicas convencionales disponibles en el mercado. Cuando se emplea una metodología de PCR en tiempo real para la amplificación, la detección puede realizarse opcionalmente al final de un número de ciclos dado, o alternativamente, después de una o más de cada etapa de termociclado en el protocolo de amplificación.

Las composiciones y los métodos descritos en la presente descripción están dirigidos a la recolección de un espécimen clínico o veterinario o un sistema de recolección de muestras forenses o ambientales y pueden incluir una o más herramientas de recolección y uno o más reactivos para de manera eficiente: 1) obtener un alto rendimiento de espécimen adecuado más allá de lo que está disponible actualmente en la técnica; 2) inactivar patógenos biológicos potencialmente
 35 infecciosos, tales como los miembros del complejo *M. tuberculosis*, de modo que ya no sean viables y puedan manipularse; enviarse o transportarse con el mínimo temor de liberación de patógenos o contaminación; o 3) estabilizar y conservar eficazmente los polímeros de ARN/ADN "desnudos" lisados de la hidrólisis o la degradación por nucleasas durante períodos prolongados a temperaturas ambientales hasta que las muestras puedan procesarse en un laboratorio de diagnóstico, y preferentemente para lograr dos o más, o las tres, de estas metas. Las soluciones de recolección descritas en la presente descripción proporcionan los siguientes beneficios: inactivación, muerte, y/o lisis de microbios, virus, o patógenos; destrucción y/o inactivación de nucleasas exógenas o endógenas, que incluyen, sin limitación, RNasa y/o DNasa; compatibilidad con una variedad de sistemas convencionales de extracción, purificación, y amplificación de ácidos nucleicos; conservación de la integridad del ARN y/o ADN dentro de la muestra; facilitación del transporte y el envío a temperaturas ambientales o tropicales, incluso durante períodos de tiempo prolongados, o variaciones extremas de temperatura; e idoneidad para el almacenamiento a corto (de varias horas a varios días), intermedio (de varios días a varias semanas) o largo plazo (de varias semanas a varios meses) de los ácidos nucleicos aislados. Las composiciones adecuadas (también denominadas "PrimeStore®") y los métodos pueden encontrarse en la Publicación de Patente de los Estados Unidos núm. 2009-0312285 de propiedad común, presentada el 1 de octubre de 2008.

En ejemplos ilustrativos, la integridad de una población de polinucleótidos en la muestra biológica, y/o la fidelidad de al menos una primera secuencia de al menos uno de los polinucleótidos obtenidos a partir de la muestra se mantiene al menos sustancialmente (*es decir*, al menos 75 %, en algunos casos alrededor de 80 %, en otras modalidades al menos alrededor de 85 %, o incluso al menos alrededor de 90 %, al menos alrededor de 95 % o al menos alrededor de 98 % de los nucleótidos dentro de la población son sustancialmente de longitud completa) cuando la composición que incluye la muestra se almacena a una temperatura de alrededor de -20 °C a alrededor de 40 °C, o de alrededor de -10 °C a alrededor de 40 °C, o de alrededor de 0 °C a alrededor de 40 °C, o de alrededor de 10 °C a alrededor de 40 °C, durante un período de alrededor de 1 a alrededor de 7 días o más; alternativamente, a una temperatura de alrededor de -20 °C a alrededor de 40 °C, o de alrededor de -10 °C a alrededor de 40 °C, o de alrededor de 0 °C a alrededor de 40 °C, o de alrededor de 10 °C a alrededor de 40 °C, durante un período de alrededor de 7 a alrededor de 14 días o más; o alternativamente a una temperatura de alrededor de o de alrededor de -10 °C a alrededor de 40 °C, o de alrededor de 0 °C a alrededor de 40 °C, o de alrededor de 10 °C a alrededor de 40 °C o de alrededor de 20 °C a alrededor de 40 °C durante un período de alrededor de 14 a alrededor de 42 días o más. Además, la integridad de los polinucleótidos dentro de una población puede mantenerse sustancialmente de manera que al menos alrededor de 80 % de los polinucleótidos iniciales permanezcan al menos sustancialmente de longitud completa tras el almacenamiento de la composición a una temperatura de alrededor de -20 °C a alrededor de 40 °C, preferentemente alrededor de 10 °C a alrededor de 40 °C, durante un período de alrededor de 1 a alrededor de 14 días o más; o alternativamente a una temperatura de alrededor de -20 °C a alrededor de 40 °C,

preferentemente alrededor de 10 °C a alrededor de 40 °C, durante un período de alrededor de 14 a alrededor de 42 días o más.

5 Alternativamente, la integridad de una población de polinucleótidos en la muestra biológica se mantiene al menos sustancialmente de manera que al menos alrededor de 80 %, al menos alrededor de 85 %, al menos alrededor de 90 %, o al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % o más de los nucleótidos dentro de la población están presentes en la solución en comparación con la cantidad presente en la solución cuando la muestra se recolectó inicialmente. En ejemplos preferidos, la integridad de la muestra se mantendrá sustancialmente de manera que se mantendrán todos o casi todos los polinucleótidos específicos de bacterias presentes en la muestra inicial (*es decir*, no degradados de manera detectable) con el tiempo.

15 En la práctica de los métodos descritos, preferentemente desde el momento de la recolección hasta el momento del aislamiento, purificación, o caracterización de una población de polinucleótidos en esta, menos de alrededor de 20 % de la población de polinucleótidos presente originalmente en la muestra recolectada se degradará con el tiempo durante el almacenamiento posterior. Preferentemente, sustancialmente menos de alrededor de 15 % de la población de polinucleótidos presente originalmente en la muestra recolectada se degradará con el tiempo durante el almacenamiento posterior, con mayor preferencia, menos de alrededor de 10 % de la población de polinucleótidos presente originalmente en la muestra recolectada se degradará con el tiempo durante el almacenamiento posterior, y aún con mayor preferencia, menos de alrededor de 5 % de la población de polinucleótidos presente originalmente en la muestra recolectada se degradará con el tiempo durante el almacenamiento posterior. En ejemplos particularmente preferidos, no más de alrededor de 5 %, alrededor de 4 %, alrededor de 3 %, alrededor de 2 % o alrededor de 1 % de la población de polinucleótidos presente originalmente en la muestra recolectada se degradará con el tiempo durante el almacenamiento posterior. Tal conservación de alta integridad de la calidad de la muestra es preferible, independientemente de las condiciones en las cuales se almacena la muestra, y se mantendrá sustancialmente durante un período de tiempo de al menos alrededor de 1 día, al menos alrededor de 5 días, al menos alrededor de 7 días, al menos alrededor de 14 días, al menos alrededor de 21 días, al menos alrededor de 30 días, al menos alrededor de 45 días, al menos alrededor de 60 días, al menos alrededor de 90 días, o incluso al menos alrededor de 120 días o más.

30 Si bien la presencia, la integridad, o la fidelidad de secuencia, de una secuencia de polinucleótido particular obtenida de, o utilizada en la práctica de la presente invención, puede determinarse con el uso de cualquier metodología convencional conocida para los expertos en las técnicas moleculares, en una modalidad, se utiliza la amplificación por PCR. Del mismo modo, la determinación de la integridad de un polinucleótido de interés puede incluir la determinación del ciclo umbral de la PCR (C_T) en condiciones dadas, y la determinación de la fidelidad de la secuencia, la integridad cualitativa de los ácidos nucleicos recolectados puede determinarse por métodos convencionales de secuenciación de ADN o ARN, que incluyen, sin limitación, los métodos químicos de Maxam-Gilbert, el método de terminación de cadena con dideoxi de Sanger y otros, el método basado en colorantes fluoróforos de Mathies y otros, o técnicas de pirosecuenciación como las descritas por Nyren y Ronaghi. Por ejemplo, la secuenciación de nucleótidos puede realizarse mediante la clonación de los amplicones purificados con el uso de un kit de clonación TOPO® 2.0 (Invitrogen™) y después se secuencian con el uso del kit de reactivos BigDye® Terminator v3.1. Los nucleótidos fluorescentes no incorporados pueden eliminarse con el uso de un kit de placa de 96 pocillos DyeEx® según las recomendaciones del fabricante (Qiagen®). La secuenciación de nucleótidos podría realizarse además con el uso de un analizador genético ABI 3100 (ABI Inc., Foster City, CA, Estados Unidos).

45 Control positivo interno ("IPC")

En algunos ejemplos, la solución de recolección y los métodos pueden incluir además al menos un control positivo interno (IPC) para monitorear la fidelidad de las muestras procesadas, para monitorear la integridad y fidelidad de la recolección de especímenes y el aislamiento/estabilización de los polinucleótidos y/o para monitorear los procesos o análisis moleculares posteriores. Los métodos incluyen colocar al menos un segmento de ácido nucleico de IPC en las soluciones de recolección de la presente invención o combinar el segmento de ácido nucleico de IPC con la población de polinucleótidos extraída para monitorear el procesamiento molecular posterior de la muestra y/o el ácido nucleico extraído. En algunos ejemplos, el IPC está presente como un componente de la solución PrimeStore® y, como tal, es sustancialmente estable y está sustancialmente no degradado cuando se almacena en la solución durante períodos de tiempo prolongados a temperaturas ambientales. En estos casos, el IPC puede considerarse parte de la población de polinucleótidos cuando se extrae de la solución de recolección.

60 Preferentemente, la secuencia de IPC no tiene reactividad cruzada, *es decir*, no se hibrida sustancialmente, o preferentemente, con secuencias específicas de mamíferos o patógenos, y como tal, se prefieren particularmente las secuencias no codificantes, no redundantes (*es decir*, sin sentido) en la formulación de secuencias portadoras/de control para minimizar la hibridación de la secuencia portadora/de control con un miembro de la población de polinucleótidos aislada obtenida a partir del espécimen recolectado. Las secuencias portadoras/de control ilustrativas, por lo tanto, no se unen sustancialmente, o preferentemente, *por ejemplo*, no se hibridan en condiciones de hibridación rigurosas) a una población de polinucleótidos aislada de un genoma de mamífero, o a una población de polinucleótidos aislada del genoma de una bacteria, hongo, protozoo, virus que es patógeno para un mamífero.

65

En ciertos ejemplos, la invención proporciona un ARN monocatenario (mc), ADNmc, PNAmc, ARN bicatenario (bc), ADNbc, PNAbc, o un híbrido de estos, aislado que es útil como un IPC. En ejemplos preferidos, donde se desea el aislamiento y la detección del ácido nucleico específico del complejo *M. tuberculosis*, se usa un segmento de ácido desoxirribonucleico monocatenario. En ejemplos ilustrativos, la invención proporciona secuencias de IPC que comprenden, consisten esencialmente en, o consisten en, secuencias de ácidos nucleicos que son preferentemente al menos alrededor de 80 %, al menos alrededor de 85 %, al menos alrededor de 90 %, al menos alrededor de 95 %, al menos alrededor de 96 %, al menos alrededor de 97 %, al menos alrededor de 98 %, o al menos alrededor de 99 % o más idénticas a cualquiera de la SEQ ID NO:8, y la SEQ ID NO:12 a la SEQ ID NO:21.

Cuando el procesamiento molecular adicional de la muestra o el ácido nucleico extraído consiste en la identificación de ácidos nucleicos específicos del complejo *M. tuberculosis*, las secuencias de IPC de la presente invención deberán contener al menos un primer dominio de secuencia que se hibrida específicamente (*es decir*, se une) a una sonda detectable de manera adecuada, que incluye, sin limitación, sondas con etiquetas moleculares y derivados de estas. Las sondas etiquetadas ilustrativas son aquellas que incluyen etiquetas radioactivas, luminiscentes, quimioluminiscentes, fluorescentes, enzimáticas, magnéticas, o de resonancia de espín conocidas para los expertos en las técnicas moleculares. En modalidades preferidas, la sonda se etiqueta con colorante 6-FAM o VIC™. En modalidades ilustrativas, la sonda etiquetada contiene al menos un primer ligando al surco menor. En modalidades adicionales, en donde se emplearán estrategias de amplificación tales como la PCR, las secuencias de IPC de la presente invención contienen al menos un segundo dominio de secuencia que se une específicamente a un cebador directo de amplificación por PCR y un tercer dominio de secuencia que se une específicamente a un cebador inverso de amplificación por PCR.

Extracción de ácidos nucleicos a partir de soluciones que contienen muestras biológicas y la(s) solución(ones) de recolección de la invención.

Después de la recolección de la población de polinucleótidos de una muestra biológica, puede realizarse cualquier método de extracción o separación de ácidos nucleicos a partir de la solución de recolección y residuos de microorganismos, tales como proteínas, lípidos y carbohidratos, como conocerá un experto en la técnica, que incluye, pero no se limita a, el uso de la purificación estándar con fenol/cloroformo, los métodos basados en sílice, y los métodos de extracción basados en partículas magnéticas de vidrio. Las composiciones y los métodos usados en la presente invención son compatibles con la mayoría, si no todas, las composiciones y los métodos de extracción de ácidos nucleicos disponibles en el mercado, tales como, pero sin limitarse a, kit minipreparativo de ADN QiaAmp® (Qiagen®, Hilden, Alemania), MagNA Pure 96 System (Roche Diagnostics, Estados Unidos), y el sistema de extracción NucliSENS® easyMAG® (bioMérieux, Francia). En general, el ácido nucleico genómico extraído está presente en una cantidad de alrededor de 0,1 microlitros a alrededor de 10.000 microlitros, con mayor preferencia de alrededor de 1 microlitro a alrededor de 1.000 microlitros, y con mayor preferencia de alrededor de 10 microlitros a 100 microlitros. Una cantidad ilustrativa de ácido nucleico es 25 microlitros.

En composiciones y métodos ilustrativos de PrimeMix®, los cebadores y sondas de la invención se añaden a una formulación particular de manera que pueda realizarse la PCR. Preferentemente, alrededor de 8 µM de cebadores directos e inversos, alrededor de 6 µM de sonda y alrededor de 1 unidad de Taq están presentes en PrimeMix®. Los intervalos de concentración ilustrativos de los componentes adicionales de PrimeMix® pueden observarse en la Tabla 1A y de PrimeStore® en la Tabla 1B.

Tabla 1A

INTERVALOS DE FORMULACIÓN DE COMPONENTES ILUSTRATIVOS PARA LA PREPARACIÓN DE COMPOSICIONES PRIMEMIX®	
Reactivo	Intervalos de Concentración Final de los Componentes
1. Uno o más tampones, <i>por ejemplo</i> : Tris, citrato, MES, BES, Bis-Tris, HEPES, MOPS, Bicina, Tricina, ADA, ACES, PIPES, bicarbonato, fosfato	alrededor de 1 mM a alrededor de 1 M
2. Una o más reacción en cadena de la polimerasa agentes de osmolaridad, compuestos zwitteriónicos funcionalizados catiónicos, <i>por ejemplo</i> : betaina, DMSO, foramida, glicerol, detergentes no iónicos, BSA, polietilenglicol, cloruro de tetrametilamonio	alrededor de 1 mM a alrededor de 1 M
3. Uno o más quelantes, <i>por ejemplo</i> : EGTA, HEDTA, DTPA, NTA, EDTA, citrato anhidro, citrato de sodio, citrato de calcio, citrato de amonio, bicitrato de amonio, ácido cítrico, citrato de diamonio, citrato de potasio, citrato de magnesio, citrato de amonio férrico, citrato de litio	alrededor de 0,01 mM a alrededor de 1 mM

INTERVALOS DE FORMULACIÓN DE COMPONENTES ILUSTRATIVOS PARA LA PREPARACIÓN DE COMPOSICIONES PRIMEMIX®	
4. Uno o más colorantes, <i>por ejemplo</i> :	alrededor de 0,01 mM a alrededor de 50 mM
fluoresceína, 5-carboxi-X-rodamina, ROX™	
5. Una o más sales, <i>por ejemplo</i> :	alrededor de 50 mM a alrededor de 1 M
cloruro de potasio, sulfato de magnesio, glutamato de potasio	
6. Una o más polimerasas, <i>por ejemplo</i> :	alrededor de 0,05 U a alrededor de 1 U
Taq, Pfu, KOD,	
Polimerasas de comienzo en caliente, polimerasas de nueva generación	
7. Desoxinucleósidos trifosfatados, <i>por ejemplo</i> :	alrededor de 0,1 mM a alrededor de 1 mM
dATP, dTTP, dGTP, dCTP, dUTP	

Preferentemente, a esta formulación se añade una cantidad suficiente de cebadores y sonda para amplificar y detectar la diana deseada.

El 2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol (TRIS) se obtuvo de Applied Biosystems/Ambion (Austin, TX, Estados Unidos). El ácido 2-[2-(Bis(carboximetil)amino)etil-(carboximetil)amino]acético (EDTA) GIBCO® UltraPure BSA se obtuvo de Invitrogen™ Corp. (Carlsbad, CA, Estados Unidos). El resto de los reactivos están disponibles en el mercado en Sigma-Aldrich o USB Corporation.

En una modalidad, una solución tampón 10X se prepara de la siguiente manera:

Añada 2.500 µl de Tris 2 M (pH 8,0) a un criofrasco estéril de 5,0 ml.

Añada 3.500 µl de KCl 2 M al frasco.

Añada 300 µl de MgSO₄ al frasco.

Añada 900 µl de Betaína 5 M al frasco.

Añada 200 µl de ROX™ al frasco.

Añada 50 µl de BSA al frasco.

Añada 800 µl de mezcla de dNTP al frasco.

Añada 20 µl de EDTA 0,5 M al frasco.

Añada 1.600 µl + 130 µl de agua libre de nucleasas al frasco.

Cierre el frasco y presione el agitador por vórtice para mezclar bien los contenidos.

Ajuste el pH de la solución a pH 8,1-8,3 con el uso de HCl al 38 %.

Distribuya en alícuotas o transfiera la solución a un contenedor estéril. Almacene a alrededor de -20 °C hasta que esté listo para el uso.

Cuando se usa dentro de PrimeMix®, esta solución tampón 10X se diluye a alrededor de 0,5X a alrededor de 2X, preferentemente, alrededor de 1X.

Tabla 1B

INTERVALOS DE FORMULACIÓN DE COMPONENTES ILUSTRATIVOS PARA LA PREPARACIÓN DE COMPOSICIONES PRIMESTORE™	
Reactivo	Intervalos de Concentración Final de los Componentes
1. Un agente caotrópico, <i>por ejemplo</i> :	
Tiocianato de guanidina	alrededor de 0,5 M a alrededor de 6 M
o Clorhidrato de guanidina	alrededor de 0,5 M a alrededor de 6 M
o Isocianato de guanidina	alrededor de 0,5 M a alrededor de 6 M
2. Un detergente aniónico, <i>por ejemplo</i> :	
N-lauroil sarcosina (<i>inter alia</i> sal de Na)	alrededor de 0,15 % a alrededor de 1 % (p./vol.)
o Dodecil sulfato de sodio,	Igual
Dodecil sulfato de litio,	Igual
Glicocolato de sodio,	Igual

INTERVALOS DE FORMULACIÓN DE COMPONENTES ILUSTRATIVOS PARA LA PREPARACIÓN DE COMPOSICIONES PRIMESTORE™		
5	Desoxicolato de sodio,	Igual
	Taurodesoxicolato de sodio, o	Igual
	Colato de sodio	alrededor de 0,1 % a alrededor de 1 % (p./vol.)
10	3. Un agente reductor, <i>por ejemplo</i> :	
	TCEP	alrededor de 0,5 mM a alrededor de 30 mM
	o β-ME, DTT, formamida, o DMSO	alrededor de 0,05 M a alrededor de 0,3 M
15	4. Un quelante, <i>por ejemplo</i> :	
	Citrato de sodio	alrededor de 0,5 mM a alrededor de 50 mM
	o EDTA, EGTA, HEDTA, DTPA, NTA, o APCA	alrededor de 0,01 mM a alrededor de 1 mM
20	5. Un tampón (<i>por ejemplo</i> , TRIS, HEPES, MOPS, MES, Bis-Tris, <i>etc.</i>)	alrededor de 1 mM a alrededor de 1 M
	6. Un ácido (<i>por ejemplo</i> , HCl o ácido cítrico)	q.s. para ajustar a un pH de alrededor de 6 a 7, preferentemente 6,4 a 6,8
25	7. Agua libre de nucleasas	q.s. hasta el volumen final deseado
	<i>Opcionalmente uno o más de:</i>	
	8. Un tensioactivo/agente antiespumante, <i>por ejemplo</i> :	
	Antiespumante A® o Tween®	alrededor de 0,0001 % a alrededor de 0,3 % (p./vol.)
30	9. Un alcohol (<i>por ejemplo</i> , metanol, etanol, propanol, <i>etc.</i>)	alrededor de 1 % a alrededor de 25 % (vol./vol.)
	10. ARN o ADN	alrededor de 1 pg a alrededor de 1 µg/ml

35 Composiciones y métodos para el análisis múltiple de muestras biológicas

En algunas modalidades, puede ser conveniente proporcionar mezclas de reactivos que incluyan más de un solo par de cebadores de amplificación y una sonda de detección que sea específica para una secuencia de ácido nucleico diana dada. Por ejemplo, cuando es conveniente determinar la presencia de dos o más tipos de patógenos diferentes, la composición de la invención puede formularse de modo que contenga un primer par de cebadores de amplificación que se unen específicamente a al menos una primera región diana de un polinucleótido específico de patógeno, y un segundo par de cebadores de amplificación que se unen específicamente a al menos una primera región diana de otro polinucleótido específico de patógeno.

45 Alternativamente, cuando es conveniente determinar la presencia de dos o más cepas diferentes, la composición de la invención puede formularse de modo que contenga un primer par de cebadores de amplificación que se unen específicamente a al menos una primera región diana de un polinucleótido específico de patógeno particular, y un segundo par de cebadores de amplificación que se unen específicamente a al menos una primera región diana de un segundo polinucleótido específico de patógeno distinto.

50 Además, cuando es conveniente determinar la presencia de uno o más microorganismos adicionales, *es decir*, identificar si un paciente está infectado de manera simultánea, con otras infecciones bacterianas, o fúngicas, o virales, por ejemplo, bacterias grampositivas y gramnegativas, virus de inmunodeficiencia humana, neumococo, influenza, *Yesinia pestis*, *Pseudomonas* sp. *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia*, *Streptococcus* sp., *Moraxella catarrhalis*, *Enterobacteriaceae*, *Haemophilus* sp., *Staphylococcus* sp., *Rinovirus*, *Virus sincitial respiratorio*, *Coronavirus*, *Adenovirus*, *Chlamydomphila pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Pneumocystis jiroveci*, y similares.

60 En algunos casos, es conveniente analizar en cuanto a genes de resistencia a fármaco o mutaciones dentro del polinucleótido específico de complejo *M. tuberculosis*. Las cepas (MDR)-TB de resistencia a múltiples fármacos podrían surgir como consecuencia de la acumulación secuencial de mutaciones que confieren resistencia a agentes individuales, o por un proceso de una sola etapa, tal como la adquisición de un elemento de MDR. Se ha identificado una serie de mutaciones distintas que confieren resistencia a rifampina, INH, estreptomycin, etambutol, ETH, PZA, kanamicina, y quinolonas. Algunos de estos aislados MDR surgen debido a que las mutaciones aleatorias en los genes que codifican las dianas de los agentes antimicrobianos individuales se seleccionan por niveles subterapéuticos de fármacos como resultado de errores de tratamiento, poca adherencia a los protocolos de tratamiento, u otros factores.

En estas modalidades, la composición de la invención puede formularse de modo que contenga un primer par de cebadores de amplificación que se unen específicamente a al menos una primera región diana de un polinucleótido específico de patógeno particular, y un segundo par de cebadores de amplificación que se unen específicamente a al menos una primera región diana de un polinucleótido de resistencia a fármaco que se encuentra dentro de, por ejemplo, cepas resistentes a múltiples fármacos o cepas resistentes a un amplio espectro de fármacos. Por ejemplo, esto puede incluir resistencia a rifampicina y/o isoniacida (la resistencia a estos fármacos anti-TB de primera línea define clásicamente una tuberculosis resistente a múltiples fármacos [MDR]), así como a uno o más miembros de la familia de las quinolonas, o kanamicina, capreomicina o amikacina, o cualquier combinación de estos.

Para la detección del(de los) producto(s) de amplificación particular(es) producido(s) a partir de tales composiciones, las composiciones también incluirán además una primera sonda de detección que se une específicamente al producto de amplificación producido a partir del primer par de cebadores de amplificación, y una segunda sonda de detección distinta que se une específicamente al producto de amplificación producido a partir del segundo par de cebadores de amplificación. En tales composiciones, es preferible que las dos, tres o cuatro sondas de detección presentes en la formulación sean distintas, de manera que cada una de las sondas (si se une específicamente a una diana en la mezcla de amplificación resultante) puede detectarse individualmente con el uso de metodologías convencionales. Tal carácter distintivo de las sondas puede lograrse fácilmente en las técnicas convencionales, con el uso, por ejemplo, de sondas de detección que incluyen porciones de detección que emiten fluorescencia a dos, tres o cuatro longitudes de onda distintas.

En algunos aspectos de la invención, la amplificación y/o detección de ácidos nucleicos diana puede realizarse secuencialmente, mientras que en otros aspectos, puede ser conveniente amplificar y/o detectar múltiples ácidos nucleicos diana de manera simultánea. Por ejemplo, una muestra biológica dada podría tamizarse primero en cuanto a la presencia de secuencia(s) diana específica(s) de *M. tuberculosis*, y si no se encuentra ninguna, después la muestra se tamiza de manera secundaria en cuanto a la presencia de secuencia(s) diana específica(s) de *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. cannetti*, *M. caprae* y *M. pinnipedi*.

Definiciones ilustrativas

De acuerdo con la antigua convención de ley de patentes, las palabras "uno" y "unos" cuando se usan en esta solicitud, que incluye las reivindicaciones, denotan "uno o más".

Como se usa en la presente descripción, los términos "alrededor de" y "aproximadamente" se usan indistintamente, y generalmente debe entenderse que se refieren a un intervalo de números alrededor de un número dado, así como a todos los números en un intervalo de números mencionado (*por ejemplo*, "alrededor de 5 a 15" significa "alrededor de 5 a alrededor de 15" a menos que se indique de cualquier otra manera). Por otra parte, debe entenderse que todos los intervalos numéricos en la presente descripción incluyen cada número entero dentro del intervalo.

Como se usa en la presente descripción, el término "ácido nucleico" incluye uno o más tipos de: polidesoxirribonucleótidos (que contienen 2-desoxi-D-ribosa), polirribonucleótidos (que contienen D-ribosa), y cualquier otro tipo de polinucleótido que sea un N-glucósido de una base de purina o pirimidina, o bases de purina o pirimidina modificadas (que incluyen sitios abásicos). El término "ácido nucleico", como se usa en la presente descripción, incluye además polímeros de ribonucleósidos o desoxirribonucleósidos que se unen covalentemente, típicamente por enlaces fosfodiéster entre subunidades, pero en algunos casos por fosforotioatos, metilfosfonatos, y similares. Los "ácidos nucleicos" incluyen ADN monocatenario y bicatenario, así como ARN monocatenario y bicatenario. Los ácidos nucleicos ilustrativos incluyen, sin limitación, ADNg; ARNhn; ARNm; ARNr, ARNt, micro ARN (miRNA), ARN de interferencia pequeño (ARNip), ARN pequeño nucleolar (snOARN), ARN nuclear pequeño (ARNnp), y ARN temporal pequeño (ARNtp), y similares, y cualquier combinación de estos.

La frase "sustancialmente idénticas", en el contexto de dos ácidos nucleicos, se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que tienen al menos alrededor de 90 %, preferentemente 91 %, con la máxima preferencia alrededor de 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 98,5 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % o más identidad de residuos de nucleótidos, cuando se comparan y alinean para la máxima correspondencia, medida con el uso de un algoritmo de comparación de secuencias o por inspección visual. Tales secuencias "sustancialmente idénticas" típicamente se consideran "homólogas", sin hacer referencia a la ascendencia real.

Los microorganismos (que incluyen, sin limitación, procariontes tales como las arqueobacterias y las eubacterias; cianobacterias; hongos, levaduras, mohos, actinomicetos; espiroquetas, y micoplasmas); virus (que incluyen, sin limitación, los Ortohepadnavirus [que incluyen, *por ejemplo*, los virus de la hepatitis A, B y C], virus del papiloma humano, Flavivirus [que incluyen, *por ejemplo*, el Virus del dengue], Lyssavirus [que incluyen, *por ejemplo*, el virus de la rabia], morbilivirus [que incluyen, *por ejemplo*, el virus del sarampión], Simplexvirus [que incluyen *por ejemplo*, el virus del herpes simple], Poliomasvirus, Rubulavirus [que incluyen, *por ejemplo*, el virus de las paperas], Rubivirus [que incluyen, *por ejemplo*, el virus de la rubéola], Varicellovirus [que incluyen, *por ejemplo*, el virus de la varicela], rotavirus, coronavirus, citomegalovirus, adenovirus, virus adenoasociados, baculovirus, parvovirus, retrovirus, vaccinia, poxvirus, y similares), algas, protozoos, protistas, plantas, briófitas, y similares, y cualquier combinación de cualquiera de los anteriores.

La invención puede usarse además para monitorear el brote, la progresión, la propagación de la enfermedad, o una o más de otras estadísticas epidemiológicas dentro de, o entre una o más poblaciones globales, que incluyen, sin limitación, la propagación de infecciones por micobacterias, el desarrollo de signos clínicos de enfermedad tuberculosa, y/o su comorbilidad con una o más infecciones adicionales tales como, sin limitación, síndrome de desgaste, fiebre del dengue, 5 ébola, VIH, SARS, y una o más infecciones bacterianas o virales, que incluyen, sin limitación, neumonías, influencias, y similares. En ciertas modalidades, las muestras serán preferentemente originarias de mamífero, y con mayor preferencia de origen humano.

El término "sustancialmente libre" o "esencialmente libre", como se usa en la presente descripción, significa típicamente que una composición contiene menos de alrededor de 10 por ciento en peso, preferentemente menos de alrededor de 5 por ciento en peso, y con mayor preferencia menos de alrededor de 1 por ciento en peso de un compuesto. En una 10 modalidad preferida, estos términos se refieren a menos de alrededor de 0,5 por ciento en peso, con mayor preferencia menos de alrededor de 0,1 por ciento en peso o incluso menos de alrededor de 0,01 por ciento en peso. Los términos abarcan una composición que está completamente libre de un compuesto o también de otra propiedad indicada. Con respecto a la degradación o deterioro, el término "sustancial" puede referirse además a los porcentajes en peso indicados 15 anteriormente, de manera que impedir la degradación sustancial se referiría a la pérdida de menos de alrededor de 15 por ciento en peso, menos de alrededor de 10 por ciento en peso, preferentemente menos de alrededor de 5 por ciento en peso, *etc.*, por degradación. En otras modalidades, estos términos se refieren a simples porcentajes en lugar de a porcentajes en peso, tal como con respecto al término "sustancialmente no patogénico", donde el término "sustancialmente" se refiere a dejar menos de alrededor de 10 por ciento, menos de alrededor de 5 por ciento, *etc.*, de la 20 actividad patogénica.

Como se usa en la presente descripción, el término "heteróloga" se define en relación con una secuencia de ácido nucleico referenciada predeterminada. Por ejemplo, con respecto a una secuencia de gen estructural, un promotor heterólogo se 25 define como un promotor que no aparece naturalmente adyacente al gen estructural referenciado, sino que se posiciona por la acción del hombre en una o más manipulaciones de laboratorio que se emplean de manera rutinaria por los expertos es las técnicas de biología molecular. Del mismo modo, un gen o segmento de ácido nucleico heterólogo se define como un gen o segmento de ácido nucleico que no aparece naturalmente adyacente a la secuencia, promotor y/o elemento(s) 30 potenciador(es) referenciados, *etc.*

Como se usa en la presente descripción, "homólogas" significa, cuando se refiere a polinucleótidos, secuencias que tienen la misma secuencia de nucleótidos esencial, a pesar de surgir a partir de orígenes diferentes. Típicamente, las secuencias de ácidos nucleicos homólogas se derivan de genes u organismos estrechamente relacionados que poseen una o más 35 secuencias genómicas sustancialmente similares. Por el contrario, un polinucleótido "análogo" es uno que comparte la misma función con un polinucleótido de una especie u organismo diferente, pero puede tener una secuencia de nucleótidos primaria significativamente diferente que codifica una o más proteínas o polipéptidos que realizan funciones similares o poseen una actividad biológica similar. Los polinucleótidos análogos pueden derivarse frecuentemente de dos o más organismos que no están estrechamente relacionados (*por ejemplo*, ya sea genéticamente o filogenéticamente).

Los términos "idénticas" o por ciento de "identidad", en el contexto de dos o más secuencias de ácidos nucleicos o polinucleótidos, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje especificado 40 de nucleótidos que son iguales, cuando se comparan y alinean para la máxima correspondencia en una ventana de comparación, medida con el uso de un algoritmo de comparación de secuencias o mediante alineamiento manual e inspección visual.

Como se usa en la presente descripción, el término "sustancialmente homólogas" abarca dos o más secuencias biomoleculares que son significativamente similares entre sí al nivel de la secuencia de nucleótidos primaria. Por ejemplo, en el contexto de dos o más secuencias de ácidos nucleicos, "sustancialmente homólogas" puede referirse a al menos 45 alrededor de 75 %, preferentemente al menos alrededor de 80 %, y con mayor preferencia al menos alrededor de 85 %, o al menos alrededor de 90 % de identidad, e incluso con mayor preferencia al menos alrededor de 95 %, con mayor preferencia al menos alrededor de 97 % idéntico, con mayor preferencia al menos alrededor de 98 % idénticas, con mayor preferencia al menos alrededor de 99 % idénticas, e incluso aún con mayor preferencia, completamente idénticas (*es decir*, 100 % o "invariantes").

Del mismo modo, como se usa en la presente descripción, el término "sustancialmente idénticas" abarca dos o más 55 secuencias biomoleculares (y en particular secuencias de polinucleótidos) que exhiben un alto grado de identidad entre sí al nivel de nucleótidos. Por ejemplo, en el contexto de dos o más secuencias de ácidos nucleicos, "sustancialmente idénticas" puede referirse a secuencias que son al menos alrededor de 80 %, y con mayor preferencia al menos alrededor de 85 % o al menos alrededor de 90 % idénticas entre sí, e incluso con mayor preferencia al menos alrededor de 95 %, con mayor preferencia al menos alrededor de 97 % idénticas, con mayor preferencia al menos alrededor de 98 % idénticas, con mayor preferencia al menos alrededor de 99 % idénticas, e incluso aún con mayor preferencia, completamente idénticas (*es decir*, 100 % idénticas o "no redundantes").

Como se usa en la presente descripción, el término "operativamente enlazado" se refiere a un enlace de dos o más 65 polinucleótidos o dos o más secuencias de ácidos nucleicos en una relación funcional. Un ácido nucleico está "operativamente enlazado" cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo,

un promotor o un potenciador está operativamente enlazado a la secuencia codificante si este afecta la transcripción de la secuencia codificante. "Operativamente enlazado" significa que las secuencias de ácidos nucleicos que se enlazan son típicamente contiguas o sustancialmente contiguas y, cuando es necesario unir dos regiones codificantes de proteínas, contiguas y en el marco de lectura. Dado que los potenciadores funcionan generalmente cuando están separados del promotor por varias kilobases y las secuencias intrónicas pueden tener longitudes variables; sin embargo, algunos elementos polinucleotídicos pueden estar operativamente enlazados pero no son contiguos.

Los siguientes ejemplos ilustran modalidades de la invención, y ejemplos de la descripción pero no deben considerarse limitantes del alcance de la invención, que está de acuerdo con las reivindicaciones.

EJEMPLOS

Ejemplo 1 - Recolección de muestras biológicas, extracción de ácidos nucleicos y procesamiento molecular posterior

Se toman muestras orofaríngeas, nasales, traqueales, y/o bronquiales, de un sujeto con sospecha de tener una infección de tuberculosis, típicamente en forma de muestras de esputo o de lavado. Este ejemplo describe el uso de PrimeStore® (Longhorn Vaccines & Diagnostics, San Antonio, TX, Estados Unidos) (también se describe en detalle en la Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos núm: 2009/0312285), un sistema de recolección de muestras clínicas o ambientales formulado específicamente para pruebas de diagnóstico molecular posteriores.

Cuatro especímenes de esputo con baciloscopia positiva obtenidos de un banco de esputo (Universidad de Pretoria, Sudáfrica) con una calificación cualitativa de +, ++ o +++, según lo observado por microscopía óptica, y diferentes viscosidades se recolectaron haciendo que los pacientes expectoraran en un vaso de espécimen. Los volúmenes de expectoración típicos fueron de alrededor de 5 ml a alrededor de 20 ml de esputo. Las muestras de esputo se observaron cualitativamente en cuanto a si eran sanguinolentas, purulentas, esponjosas, espumosas o salivas. Las muestras calificadas como "purulentas" fueron aquellas que se observó que contenían pus, mientras que las muestras calificadas como "salivas" contenían cantidades más grandes de saliva que de otros componentes tales como mucosa. Después se usaron hisopos flocados (Copan Italia SpA, Brescia, Italia) para recolectar pequeñas cantidades de esputo girando el hisopo cinco veces dentro de cada contenedor de espécimen de esputo. Los especímenes de esputo se pesaron antes de la recolección con hisopo y después de cada recolección con hisopo para estimar el volumen de esputo tomado. Cada hisopo contenía aproximadamente 25 ml a 500 ml de esputo. Los hisopos individuales se transfirieron a tubos de recolección, cada uno de los cuales contenía 1,5 ml de la formulación de recolección y conservación descrita en la presente descripción ("PrimeStore®"). El procedimiento de recolección con hisopo se llevó a cabo por triplicado para cada espécimen de esputo. PrimeStore® también se añadió al resto del espécimen de esputo en una relación de 1:1 como control y después se colocó a -4 °C hasta que se procesó. Los hisopos, suspendidos en PrimeStore® en cada tubo de recolección, se mantuvieron a temperatura ambiental durante aproximadamente doce horas antes de retirar una muestra para el procesamiento de ácidos nucleicos mediante extracción de ácidos nucleicos y PCR en tiempo real. Se extrajo el ADN de alícuotas de 100 µl de los especímenes de esputo restante de control y los tubos con hisopo con el uso del kit AMPLICOR® MTB Respiratory (Roche) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Todos los especímenes se agitaron por vórtice a la velocidad máxima durante 10 segundos para extraer los ácidos nucleicos. Las concentraciones de ADN después de la extracción se midieron con el uso de un espectrofotómetro NanoDrop® 1000 (Thermo Scientific, DE, Estados Unidos), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y los resultados calculados se muestran en la Tabla 2. Se usaron cuatro microlitros del ADN extraído para la PCR en tiempo real con el uso del kit de detección de *Mycobacterium* LightCycler® (Roche Diagnostics, Estados Unidos).

Inactivación microbiana con PrimeStore® y conservación del ácido nucleico microbiano

Se demostró que PrimeStore® es eficaz para el uso en la preparación de ácidos nucleicos de muestras biológicas para técnicas de ADN y/o extracción de ADN, y el análisis molecular posterior. Como puede observarse en la Tabla 2, los volúmenes recolectados después de cada recolección con hisopo estuvieron en el intervalo de alrededor de 0,05 ml a alrededor de 0,5 ml. La concentración de ADN después de la extracción estuvo en el intervalo de entre alrededor de 231 y 281 ng/µl. No se obtuvo una diferencia significativa cuando se comparó la concentración de ADN de las muestras de control con la concentración de ADN de las muestras obtenidas mediante el uso de los hisopos.

Tabla 2

CONCENTRACIÓN DE ADN DE MUESTRAS DE ESPUTO DESPUÉS DE LA RECOLECCIÓN Y CONSERVACIÓN EN PRIMESTORE®										
Especimen	Estado del espécimen por microscopía de frotis	Calidad	Vol. en Hisopo 1 (ml)	Vol. en Hisopo 2 (ml)	Vol. en Hisopo 3 (ml)	Vol. del Control (ml)	Concentración de ADN (ng/ul)			
							Control	Hisopo 1	Hisopo 2	Hisopo 3
A	+	salivoso/sanguinolento	0,05	0,05	0,15	1,20	258,05	243,68	238,15	235,15
B	+++	purulento	0,05	0,45	0,25	1,70	251,76	240,34	238,43	231,54
C	+++	purulento	0,15	0,10	0,05	1,65	248,60	261,86	246,75	246,66
D	++	purulento/salivoso	0,25	0,30	0,15	17,90	258,32	281,31	241,89	246,66

La PCR en tiempo real fue positiva para todos los especímenes, excepto uno en el que ocurrió inhibición de la PCR. Los resultados se muestran en la Tabla 3 y la Figura 1.

Tabla 3

RESULTADOS DE PCR EN TIEMPO REAL DESPUÉS DE LA INMERSIÓN EN PRIMESTORE® Y USO DEL KIT DE DETECCIÓN DE <i>MYCOBACTERIUM</i> LIGHTCYCLER®	
Espécimen	Valor de C _T
Positivo	27,28
Negativo	-
A*	31,54
A-1	32,14
A-2	32,75
A-3	34,97
B*	31,56
B-1	31,77
B-2	32,03
B-3	32,14
C*	23,8
C-1	26,62
C-2	26,56
C-3	26,5
D*	26,64
D-1	29,63
D-2	<i>inhibición</i>
D-3	28,95
* Espécimen restante (control) -1/-2/-3 indica el orden de recolección con hisopo	

El procedimiento de recolección con hisopo es un método útil para la recolección de especímenes directamente del espécimen de esputo recolectado para el procesamiento molecular posterior. En este estudio, las concentraciones de ADN después de las extracciones mostraron intervalos similares para los componentes del espécimen de esputo recolectado con hisopo y el espécimen restante (control). Un volumen tan bajo como alrededor de 50 µl de esputo diluido en 1,5 ml de PrimeStore® fue suficiente para el análisis de PCR. Sin embargo, en dos de los especímenes, se ha observado un retraso en el valor de C_T de ~ 3 logaritmos. En el caso de la inhibición única, esto podría deberse a la presencia de solución PrimeStore® residual como resultado de su transferencia del proceso de extracción de ADN a la PCR.

El procesamiento del diagnóstico molecular simple y rápido directamente de especímenes recolectados con hisopo tratados con PrimeStore® así como de las pruebas convencionales de rutina se realizó a partir de colecciones de esputo individuales. Los resultados del procesamiento molecular a partir de pequeñas cantidades de especímenes de TB con baciloscopia positiva, obtenidas por transferencia con hisopo a PrimeStore®, son factibles y exactos.

Ejemplo 2 - Inactivación de microbios en muestras de tuberculina con el uso de PrimeStore®

Para evaluar el grado de inactivación de bacterias tuberculosas dentro de las muestras de esputo cuando se exponen a PrimeStore®, se realizaron tres estudios:

En el primer estudio, una cepa de *M. tuberculosis* MDR conocida se cultivó en un sistema líquido MGIT® (tubo indicador de crecimiento de micobacterias, Becton Dickinson, Estados Unidos). El aislado de la cepa era ácido resistente (AF) y con baciloscopia positiva, y la resistencia a múltiples fármacos (MDR) se confirmó con el uso de un ensayo con sondas en línea (Hain Lifescience GmbH, Nehren, Alemania). Se colocó un inóculo de 0,15 ml o 0,5 ml de la cepa de tuberculosis MDR conocida en 1,5 ml de PrimeStore® para una incubación de 2 o 10 minutos. Después cada solución se agitó por vórtice, y se cultivó adicionalmente en el sistema líquido MGIT®, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Una muestra de control no expuesta a PrimeStore® también se colocó en el cultivo líquido MGIT®.

El segundo estudio colocó muestras conocidas de esputo con baciloscopia positiva (> 10 bacilos ácido resistentes [AFB]/campos de alta potencia [hpf]cada uno) en 1,5 ml de PrimeStore® durante 1 minuto o 5 minutos seguido de Auramina O, y tinción de Ziehl-Neelsen para observar la morfología e integridad de la pared celular.

El tercer estudio usó una concentración de 10^5 a 10^6 de una cepa de micobacteria de referencia, específicamente H37rv (Universidad de Pretoria, Sudáfrica), para realizar un ensayo de muerte en el tiempo. Se colocaron inóculos de 0,5 ml de la cepa en 1,5 ml de PrimeStore® durante 5 segundos, 10 segundos, 20 segundos, 40 segundos, 80 segundos, o 160 segundos, y después se subcultivaron 2 gotas de las soluciones resultantes en agar Middlebrook 7H11 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, Estados Unidos). Las muestras de control no expuestas a PrimeStore® también se sembraron de manera similar. En un control, se colocó 0,5 ml de la cepa H37rv en 1,5 ml de solución salina. En otro control, se colocó 0,5 ml de inóculo de H37rv directamente en el agar Middlebrook 7H11. Las placas se mantuvieron en condiciones ambientales durante 30 minutos, después se sellaron y se incubaron en condiciones aerobias a 37 °C durante seis semanas. Este estudio se realizó por duplicado.

En el primer estudio, no se observó crecimiento en los cultivos líquidos MGIT® para ninguna de las muestras tuberculosas MDR almacenadas en PrimeStore®, incluso después de 42 días de incubación. La muestra de control no expuesta a PrimeStore® mostró un crecimiento positivo después de 9 días. La extracción y amplificación adicionales de las dos muestras que se almacenaron en PrimeStore® demostraron una buena formación de bandas, y confirmaron la estabilidad del ácido nucleico en PrimeStore®.

En el segundo estudio, no se observaron AFB en ninguna de las muestras incubadas con PrimeStore®, en ninguno de los tiempos de exposición.

En el tercer estudio, no se observó crecimiento después de 42 días de incubación en ninguno de los puntos de tiempo. Las unidades formadoras de colonias se detectaron en la placa de control después de 7 días.

PrimeStore® exterminó una variedad de cepas de *M. tuberculosis* dentro de un periodo de exposición muy corto, lo que confirma de este modo que PrimeStore® permite la recolección y el transporte seguro y rápido en puntos de atención de muestras biológicas con sospecha de contener *M. tuberculosis*.

Ejemplo 3 - Almacenamiento, extracción de ácidos nucleicos, procesamiento molecular de muestras de tuberculina y diagnóstico de la tuberculosis

Las muestras de esputo se procesaron con el uso de la misma técnica de recolección con hisopo descrita en el Ejemplo 1, así como con el uso de relaciones 1:1 de PrimeStore® respecto a esputo. Las muestras de esputo usadas en estos experimentos se obtuvieron del banco de esputo al igual que antes, y se habían clasificado previamente por microscopía de frotis y resultados de cultivo. Todas las muestras se caracterizaron inicialmente en cuanto a su resistencia a ácido (es decir, por los indicadores +, ++, o +++ en microscopía de frotis), y posteriormente se clasificaron como positivos, negativos o débiles para *M. tuberculosis*, por cultivo.

El ADN se extrajo de la muestra de esputo en PrimeStore® en varios puntos de tiempo en el intervalo de 6 días a 6 semanas. Como se muestra en la Tabla 4, los especímenes en PrimeStore® se mantuvieron a temperatura ambiental durante diferentes periodos de tiempo antes de llevar a cabo la extracción de ácidos nucleicos. La extracción via el kit minipreparativo de ADN QiaAmp® (Qiagen®, Hilden, Alemania) y el sistema MagNA Pure 96™ (Roche Diagnostics, Estados Unidos) se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Todos los extractos de ácidos nucleicos se mantuvieron a -20 °C hasta que se procesaron para la amplificación.

Los extractos de ADN se amplificaron mediante el kit de detección de *Mycobacterium* LightCycler® (Roche), o con el uso de la mezcla principal de la presente invención, en lo adelante denominada "kit Prime Mix Universal TB", "kit PrimeMix Universal TB", o simplemente "PrimeMix". Cuatro microlitros de solución de ácidos nucleicos extraídos se usaron con el kit Prime Mix Universal TB. Todos los sistemas anteriores son plataformas de PCR en tiempo real con detección de productos incluida. La amplificación de los extractos de Qiagen® se realizó por triplicado para determinar la reproducibilidad del kit de detección de *Mycobacterium* LightCycler®, y el kit Prime Mix Universal TB.

Como puede observarse en la Tabla 4, cuatro muestras eran de baciloscopia positiva, siete muestras eran de baciloscopia negativa y tres eran débiles.

Tabla 4

DURACIÓN DEL ESPÉCIMEN EN PRIMESTORE® ANTES DE LA EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS		
Procedimiento de extracción	Retraso antes de la extracción (días)	
	Baciloscopia Negativa / Débil	Baciloscopia Positiva
Kit Minipreparativo de ADN QiaAmp® (Qiagen®)	6	28
MagNA Pure™ 96 (Roche)	20	42

Tabla 5

RESULTADOS DE BACILOSCOPIA Y PCR EN TIEMPO REAL (VALORES DE C_T) CON EL USO DE VARIOS KITS DE EXTRACCIÓN PARA ESPÉCIMENES RECOLECTADOS CON HISOPO

Especimen núm.	Baciloscopia	Extracción con QiaAmp®/PrimeMix®			Extracción con QiaAmp®/LightCycler®			Extracción con MagNA Pure™/LightCycler®		Extracción con MagNA Pure™/PrimeMix
		1	2	3	1	2	3			
1	+	35,00	X	X	-	X	X	-		35,00
4	++	X	X	X	X	X	X	30,98		28,97
2	+++	32,18	X	X	34,19	X	X	34,60		35,00
3	+++	X	X	X	X	X	X	27,94		27,12
5	Neg	35,00	35,00	35,00	34,71	-	-	-		35,00
6	Neg	-	35,00	-	-	-	-	-		-
10	Neg	35,00	35,00	35,00	36,48	-	36,20	-		35,00
11	Neg	32,96	32,70	32,85	35,71	35,17	33,83	35,21		35,00
12	Neg	34,54	35,00	34,56	34,14	34,83	34,18	33,54		35,00
13	Neg	-	35,00	-	-	-	-	-		-
14	Neg	28,15	28,07	28,60	29,56	29,61	29,10	30,34		29,34
8	débil 1	32,36	32,28	32,42	34,46	34,47	35,31	34,62		35,00
7	débil 7	31,79	31,73	31,83	32,10	32,79	32,08	32,70		33,53
9	débil 9	33,15	33,51	33,43	36,10	34,53	34,56	34,27		35,00

X indica que el experimento no se realizó; (-) indica que los resultados fueron negativos

Resumen de los resultados analizados (Número de valores de C_T obtenidos/Número de muestras analizadas)

	Extracción con QiaAmp®/PrimeMix®			Extracción con QiaAmp®/LightCycler®			Extracción con MagNA Pure™/LightCycler®		Extracción con MagNA Pure™/PrimeMix
Baciloscopia	1	2	3	1	2	3			
Baciloscopia positiva	2/2	X	X	1/2	X	X	3/4	4/4	
Baciloscopia negativa	5/7	7/7	5/7	5/7	3/7	4/7	3/3	5/7	
Débil	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	

Tabla 6

RESULTADOS DE BACILOSCOPIA Y PCR EN TIEMPO REAL (VALORES DE CT) CON EL USO DE VARIOS KITS DE EXTRACCIÓN PARA MUESTRAS DE ESPUTO SUMERGIDAS EN PRIMESTORE® EN UNA RELACIÓN 1:1			
Espécimen núm.	Baciloscopia	Extracción con MagNA Pure™/PrimeMix	Extracción con MagNA Pure™/LightCycler®
1	+	35,00	33,02
2	+++	28,96	33,62
3	+++	23,97	25,53
4	++	26,30	28,27
5	neg	35,00	34,00
6	neg	-	-
7	débil 7	30,20	30,72
8	débil 1	33,59	32,85
9	débil 9	31,76	31,81
10	neg	35,00	35,19
11	neg	30,05	30,70
12	neg	32,68	32,90
13	neg	-	-
14	neg	26,16	26,74
(-) indica que no se obtuvieron resultados			

Como puede observarse en la Tabla 5, para muestras de esputo recolectadas con hisopo, el ADN extraído con el uso del kit minipreparativo de ADN QiaAmp® o el sistema MagNA Pure™ 96 y después procesado con el uso del PrimeMix® de la presente invención detectó la presencia de ADN bacteriano causante de tuberculosis cuando la muestra de frotis indicó un resultado ligeramente positivo (es decir, "+"), a diferencia del ADN extraído con el uso del kit minipreparativo de ADN QiaAmp® o el sistema MagNA Pure™ 96 y después procesado con el kit de detección de *Mycobacterium* LightCycler®, que no detectó ningún ácido nucleico específico de bacterias causantes de tuberculosis (TB). Lo que es más importante, los ensayos PrimeMix® fueron capaces de detectar ácidos nucleicos bacterianos causantes de tuberculosis en más especímenes con baciloscopia negativa y cultivo positivo, que lo que fue capaz de detectar el kit de *Mycobacterium* LightCycler®. Los ADN bacterianos causantes de tuberculosis se detectaron por igual con el uso de los procedimientos PrimeMix® y Lightcycler®, cuando se analizaron cantidades más grandes de esputo.

En general el rendimiento de la técnica de recolección con hisopo y el uso de PrimeStore® han mostrado resultados consistentes con el uso de PrimeMix® en comparación con los resultados variables del kit LightCycler®. PrimeStore® ha mostrado compatibilidad con los diferentes sistemas de extracción y en ningún caso la inhibición de la PCR fue una razón de un resultado negativo.

Ejemplo 4 - Compatibilidad de PrimeStore® con ensayos de diagnóstico

Se obtuvieron quince muestras de esputo con baciloscopia positiva y quince con baciloscopia negativa (determinado mediante la tinción con Auramina O) de pacientes con sospecha de tener tuberculosis pulmonar. Las muestras con baciloscopia positiva se analizaron con el uso del ensayo con sondas en línea, seguido de cultivo. Las muestras con baciloscopia negativa también se cultivaron. Después todas las muestras de esputo crudo generalmente se licuaron, descontaminaron y concentraron con el uso del procedimiento de NaCl/NaOH ("DTT/NaOH"), como conocerá un experto en la técnica y como se describe en Kubica, GP, y otros (1963) Sputum Digesting and Decontamination with N-acetyl-L-cysteine as a Sputum Digestant for the Isolation of Mycobacteria, Amer. Rev. Resp. Dis.; 89: 284-286 y Kubica, GP, y otros (1963) Sputum Digesting and Decontamination with N-acetyl-L-cysteine-sodium hydroxide for Culture of Mycobacteria, Amer. Rev. Resp. Dis.; 87:775-779. En general el procedimiento de NaCl/NaOH se usa antes de los métodos de cultivo y las pruebas de ácidos nucleicos para *M. tuberculosis*. Después se añadieron alícuotas de 0,5 ml de las muestras de esputo tratadas con NaCl/NaOH a PrimeStore® y se almacenaron durante toda la noche. Se usó además un control en donde no se añadieron alícuotas de 0,5 ml de las muestras de esputo tratadas con NaCl/NaOH a PrimeStore®. Se realizó la extracción *via* el kit de preparación de especímenes respiratorios AMPLICOR® (Roche). Dos ensayos comerciales, el kit de detección de *Mycobacterium* LightCycler® (Roche) y el Genotype MTBDRplus (Hain Lifesciences GmbH) se usaron para detectar la presencia o ausencia de ácidos nucleicos específicos de *M. tuberculosis*.

Se encontró que el ensayo Genotype MTBDRplus es compatible con el uso de muestras de esputo crudo en contacto con PrimeStore® y se detectaron cepas de TB resistentes a fármacos en estas muestras con el uso de este ensayo.

La Tabla 7 muestra los resultados obtenidos con el kit de detección de *Mycobacterium* LightCycler® (LC).

Tabla 7

IDONEIDAD DE PRIMESTORE® PARA PRUEBAS MOLECULARES DESPUÉS DE LA DESCONTAMINACIÓN						
DTT/NaOH - Sin PS			DTT/NaOH - con PS			
	bac+	bac-		bac+	bac-	
LC pos	13	0	LC pos	13	1	
LC neg	2	15	LC neg	2	14	
	15	15		15	15	

Como puede observarse en la Tabla 7, después del almacenamiento en PrimeStore®, el ensayo LightCycler® dio positivo para *M. tuberculosis* en una muestra con baciloscopia negativa, que no se obtuvo cuando no se usó PrimeStore®. Por lo tanto, PrimeStore® puede tener una mayor capacidad de detectar cantidades más bajas de *M. tuberculosis*. De cualquier otra manera, los resultados obtenidos fueron comparables y, por lo tanto PrimeStore® es compatible con los ensayos de detección disponibles en el mercado.

Ejemplo 5 - Sensibilidad de detección de *M. tuberculosis* después del almacenamiento en PrimeStore®

En esta evaluación se incluyeron siete especímenes con baciloscopia negativa y cultivo positivo, y tres especímenes débiles (SC1, SC7 y SC9) de un banco de esputo (Universidad de Pretoria, Sudáfrica). Se usaron hisopos flocados (Copan) para recolectar pequeñas cantidades de esputo girando el hisopo dentro de cada espécimen de esputo (500 µl en criofrasco). Los hisopos individuales se transfirieron a tubos de recolección con PrimeStore®, cada uno de los cuales contenía 1,2 ml de solución PrimeStore®. Los especímenes de esputo se pesaron antes de la recolección con hisopo, y después de cada recolección con hisopo para estimar el volumen de esputo extraído del espécimen. La solución PrimeStore® también se añadió al resto del espécimen de esputo en una relación de 1:1 como control. Los hisopos, suspendidos en la solución PrimeStore® en cada tubo de recolección, se mantuvieron a temperatura ambiental durante aproximadamente doce horas antes del procesamiento por PCR en tiempo real. El ADN del espécimen de esputo restante (control) y de los tubos con hisopo se extrajo con el uso del kit de preparación de especímenes respiratorios AMPLICOR®. Los especímenes de esputo obtenidos de los mismos cultivos también se procesaron de acuerdo con los procedimientos de NaLc/NaOH convencionales, y se extrajeron con el uso del protocolo AMPLICOR®. Se evaluó además un método de extracción adicional que usa el kit de virus Invitrogen™ iPrep™ Purelink™ (Carlsbad, CA, Estados Unidos) a partir de esputo crudo de estos especímenes. Todos los especímenes se agitaron por vórtice a velocidad máxima durante 10 segundos y se usó una alícuota de 100 µl para el procedimiento de extracción. Las concentraciones de ADN después de la extracción se determinaron con el uso del instrumento NanoDrop® 1000. Cuatro microlitros del ADN extraído se usaron para la PCR en tiempo real con el uso del kit de detección de *Mycobacterium* LightCycler®.

Como puede observarse en la Tabla 8, los volúmenes recolectados después de cada recolección con hisopo estuvieron en el intervalo de alrededor de 0,05 ml a alrededor de 0,1 ml. La concentración de ADN después de la extracción estuvo en el intervalo entre alrededor de 205 a alrededor de 706 ng/µl para el espécimen en hisopo, PrimeStore® (1:1) y en NaLc/NaOH. El esputo crudo extraído del kit de virus Invitrogen™ iPrep™ Purelink™ (Carlsbad, CA, Estados Unidos) tuvo concentraciones de ADN en el intervalo de alrededor de 7,0 a alrededor de 22,6 ng/µl.

Tabla 8

CARACTERIZACIONES DE ESPUTOS, VOLÚMENES EN HISOPO ESTIMADOS Y CONCENTRACIONES DE ADN DESPUÉS DE LAS EXTRACCIONES										
Baciloscopia	Cultivo	Alicuota (500 µl)	Alicuota Final	Vol en Hisopo	Vol Alícuota Restante	de	Concentración de ADN después de la extracción (ng/µl)			
		mg	mg	µl	µl		Kit Invitrogen™ para la extracción de esputo crudo	PrimeStore® + Extracción con AMPLICOR®	PrimeStore® Extracción con AMPLICOR®	(1:1)*; con
neg	pos	300	295	50	450	16,8	222,9	213,8	211,7	
neg	pos	305	300	50	450	22,6	221,6	284,4	223,4	
neg	pos	305	295	100	400	9,9	205,7	706,4	412,7	
neg	pos	305	300	50	450	10,9	206,9	231,7	214,9	
neg	pos	310	305	50	450	20,4	212,9	277,2	219,3	
neg	pos	250	240	100	400	7	255,7	267	239,4	
neg	pos	260	250	100	400	9,3	226,6	276,1	217,1	
débil 1	pos	300	295	50	450	12,7	224,9	273,4	208,7	
débil 7	pos	260	245	50	450	13,1	216,2	243,3	225,7	
débil 9	pos	295	290	50	450	6,8	222,7	233,4	225,6	

*1:1 es la relación de PrimeStore respecto a la muestra clínica de esputo
 Los resultados de PCR en tiempo real pueden observarse en la Tabla 9 y la Figura 2.

Tabla 9

RESULTADOS DE PCR EN TIEMPO REAL PARA MUESTRAS CON EL USO DEL KIT DE DETECCIÓN DE MYCOBACTERIUM LIGHTCYCLER®							
Número del Banco de Espustos	Baciloscopia	Cultivo	ID	Valores de Ct de la PCR			
				Extracción con Invitrogen™ de esputo crudo	Hisopo PrimeStore®; Extracción con AMPLICOR®	en PrimeStore® (1:1); Extracción con AMPLICOR®	DDT/NaOH; Extracción con AMPLICOR®
57	neg	pos	MTB	35,33	-	-	-
95	neg	pos	MTB	32,12	39,49	32	34,79
96	neg	pos	MTB	27,41	29,26	37,75	26,24
198	neg	pos	MTB	-	-	-	-
224	neg	pos	MTB	30,77	33,28	31,87	-
347	neg	pos	MTB	-	37,45	33,03	-
402	neg	pos	MTB	-	-	-	-
72	débil 1	pos	MTB	34,3	-	32,11	34,25
394	débil 7	pos	MTB	31,9	34,09	29,51	31,59
88	débil 9	pos	MTB	31,9	-	31,01	32,51
(-) símbolo indica que no se obtuvieron resultados.							

No se observó amplificación en dos de los especímenes débiles, *es decir*, débil 1 y débil 9, para los especímenes en hisopo. Se observó un aumento del 100 % en la sensibilidad para las muestras con baciloscopia negativa y cultivo positivo cuando se usa PrimeStore® en una relación 1:1 o mediante recolección con hisopo en comparación con la metodología de NaLc/NaOH convencional. De hecho, el uso de PrimeStore®, ya sea mediante recolección con hisopo o en una relación 1:1, dio como resultado la detección de dos muestras con baciloscopia negativa y cultivo positivo adicionales en comparación con la metodología de NaLc/NaOH convencional. En general, el kit de Invitrogen™ es más eficaz que el de AMPLICOR®, por lo tanto, cualquier variación entre los datos de PrimeStore® y los obtenidos mediante el uso de Invitrogen™ podría explicarse por esta discrepancia.

Ejemplo 6 - Formulaciones de PrimeStore® que contienen IPC

Este ejemplo describe el uso de polinucleótidos de control positivo interno (IPC) exógenos no específicos para dar seguimiento a la integridad de un espécimen desde el punto de recolección hasta el análisis molecular con el uso del sistema de recolección PrimeStore® (Longhorn Vaccines & Diagnostics, San Antonio, TX, Estados Unidos).

Se usó el método de filtración por membrana para la recuperación de bacterias y hongos para evaluar la capacidad de exterminación de PrimeStore®. *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* [*Staphylococcus aureus* no resistente a la metilina (MRSA)], *Candida albicans*, *Bacillus subtilis*, y *Aspergillus brasiliensis* se usaron para determinar si PrimeStore® podía exterminar e inactivar eficazmente un panel de bacterias y mohos (levaduras y hongos filamentosos). Los controles positivos incubados en una matriz de agua se realizaron solamente en el día 0. Una población de 1×10^6 ufc para cada cepa bacteriana se inoculó en 0,5 ml de PrimeStore® para cada punto de tiempo y posteriormente se incubó a 20-25 °C. Los contenedores se enumeraron y evaluaron en los días 0, 1, 7, 14 y 28. El inóculo se pasó asépticamente a través de un dispositivo de filtración estéril y posteriormente se enjuagó tres veces con 100 ml de líquido neutralizante D estéril [1 g de digestión péptica de tejido animal (peptona) y 1 ml de polisorbato 80 disuelto en 1,0 l de agua estéril (pH final 7,1 ± 0,2)]. Cuando fue necesario, se realizaron diluciones del artículo de prueba inoculado para suministrar un recuento diana de 25-250 ufc por filtro. Para cada punto de tiempo, los controles negativos inoculados se procesaron de una manera similar. Los filtros inoculados con muestras que contenían bacterias se sembraron en placas sobre agar triptico de soya (TSAP) con lecitina y polisorbato 80 y se incubaron a 30-35 °C durante 72 h. Los filtros inoculados con muestras que contenían levadura o moho se sembraron en placas sobre agar de dextrosa Sabouraud (SAB) y se incubaron a 20-25 °C durante no menos de 72 h pero no más de 5 días. Se contaron las colonias para calcular el log₁₀ de las recuperaciones y el porcentaje (%) de muertes para cada organismo usado durante el reto microbiano.

Una placa de reserva que contenía alrededor de 10⁸ ufc de MRSA (ATCC 33592) se transfirió a TSB, se agitó por vórtice brevemente y se incubó a temperatura ambiental durante 10 min. Se transfirió un total de 0,1 ml de suspensión bacteriana a 0,9 ml de PrimeStore® y se agitó por vórtice durante 60 segundos. Se transfirió un total de 0,1 ml de suspensión a 0,3 ml de TSB (dilución 1:4) y se transfirieron 100 µl a placas de agar sangre (RBC de oveja al 5 % en TSA) después de 0, 5

y 15 minutos. Los controles positivos incluyeron volúmenes equivalentes de MRSA y TSB. Las placas se dejaron secar, se incubaron durante toda la noche a 37 °C y se analizaron en cuanto a ufc/ml.

Se demostró que PrimeStore® inactiva rápidamente los microbios que incluyen hongos, bacterias grampositivas y gramnegativas, y virus. La prueba de eficacia antimicrobiana se realizó con el uso de la técnica de filtración por membrana para la cuantificación de bacterias y hongos. En el primer período de prueba (24 h), se exterminó el 100 % de las bacterias y hongos en comparación con los controles positivos. Para estos microbios, PrimeStore® cumplió los criterios de inactivación descritos en los productos de la Categoría 1 de la USP (inyecciones, emulsiones, productos ópticos, productos nasales estériles, y productos oftálmicos fabricados con bases o vehículos acuosos). Además, se sometieron a reto esporas de *Bacillus subtilis* con el uso del método descrito en USP 51 para evaluar aún más la inactivación de poblaciones microbianas con PrimeStore®. Las esporas de *B. subtilis* se redujeron en un 99 % dentro de 24 h de exposición. En un estudio de muerte en el tiempo de MRSA inoculada en PrimeStore®, no se detectaron bacterias viables (100 % de muertes) en el tiempo más temprano del estudio (5 minutos después de la inoculación) o en ninguno de los tiempos de evaluación posteriores. Los datos demostraron además que PrimeStore® extermina rápidamente la *M. tuberculosis* de muestras clínicas de esputo.

En ejemplos ilustrativos, se ha descrito un ARNmc de IPC único que puede añadirse por adelantado (*por ejemplo*, alrededor de 3×10^5 copias diana/0,5 ml) a PrimeStore®, y usarse como control interno para comprobar la estabilidad de la muestra desde el momento de la recolección de muestras hasta la extracción y detección. Además, el ARNmc de IPC es útil como una especie portadora (particularmente para muestras que contienen niveles muy bajos de ácidos nucleicos diana), y sirve como control para monitorear la integridad, eficiencia, y fidelidad del proceso de extracción de ácidos nucleicos desde el punto de recolección hasta el análisis de ácidos nucleicos. Los IPC ilustrativos adecuados para la formulación en PrimeStore® incluyen, sin limitación, ADNmc o ARNmc exógenos y/o producidos por síntesis (*in vitro*), y preferentemente incluyen aquellos polímeros que no son homólogos (*por ejemplo*, determinados por análisis informáticos BLAST) a las secuencias de polinucleótidos encontradas en el huésped mamífero o en el uno o más patógenos o flora bacteriana normal contenida en este.

Se ha demostrado que PrimeStore® facilita la secuenciación estándar y el análisis metagenómico de muestras clínicas originales al mejorar la calidad de los ácidos nucleicos microbianos diana en los especímenes recolectados originalmente, incluso cuando llegan al laboratorio analítico horas, o incluso días más tarde, que incluyen los almacenados y/o transportados en condiciones inferiores a las ideales, o incluso ambientales del entorno. Se ha observado la recuperación de fragmentos de amplificación por RT-PCR de más de 1.400 bases a partir de ARN viral conservado y enviado en PrimeStore® a temperatura ambiental durante varias semanas. En condiciones duras, *es decir*, incubación a 38 °C, se observó amplificación por RT-PCR de fragmentos de 574 pb y 825 pb de virus conservado en PrimeStore® donde no se observó amplificación del virus de reserva en VTM comercial.

Lo que es más importante, se ha demostrado que PrimeStore® es compatible con muchos kits comerciales de extracción de ácidos nucleicos. Los ácidos nucleicos se extraen directamente de PrimeStore® de acuerdo con el protocolo estándar del fabricante y solo se observan pequeñas diferencias en los valores de C_t entre kits basados en columna o microesferas. Por otra parte, PrimeStore® recibió la Autorización de uso de emergencia de la FDA como parte del ensayo completo Prime RRT-PCR Assay™ para Influenza A/H1N1-09 de Longhorn. PrimeStore® es el primer medio de transporte molecular en recibir la aprobación de la FDA de Estados Unidos, y el primero en contener un IPC para controlar el monitoreo de la degradación del espécimen desde la recolección hasta la detección.

Ejemplo 7: PrimeStore® para la conservación prolongada de muestras microbianas y aislados de ARN

Este ejemplo demuestra la utilidad de las formulaciones de PrimeStore® para inactivar organismos patógenos, y al mismo tiempo retener el almacenamiento a largo plazo y la retención del ARN aislado a partir de tales organismos inactivados. Como ejemplo ilustrativo, se usó PrimeStore® para recolectar muestras biológicas que contenían virus de la influenza A/Vietnam/1203/2004 (H5N1). Los resultados demostraron que la formulación no solo inactivó H5N1 y el virus A/México/4108/09 (H1N1, aislado clínico) en las muestras recolectadas, sino que también conservó el ARN microbiano para el análisis de PCR posterior. El estudio demostró la carencia de efectos citopáticos (CPE) o reacciones tipo CPE del reactivo PrimeStore® (dilución 1:100) en monocapas de células de riñón canino Madin-Darby, la eficacia de PrimeStore® para inactivar el virus H5N1 viable ($1,26 \times 10^7$ TCID₅₀), y la capacidad de PrimeStore® de conservar el ARN viral de H5N1 y H1N1 durante hasta 62 días en condiciones ambientales para el análisis de PCR en tiempo real que dio como resultado la detección de una abundancia de producto de ARN.

La Parte 1 del estudio comprendía dos secciones: (1) Evaluación de la toxicidad *in vitro* del reactivo PrimeStore® en células epiteliales de riñón canino Madin-Darby (MDCK) y (2) prueba de la eficacia de inactivación del reactivo PrimeStore® contra H5N1. La Parte 2 del estudio evaluó la calidad del ARN de H5N1 y H1N1 que se había afectado como resultado directo del almacenamiento a largo plazo del virus de la influenza en PrimeStore®.

La evaluación de la toxicidad *in vitro* de la Parte 1 se realizó cargando los hisopos de recolección de muestra por triplicado con 0,1 ml de *tampón de almacenamiento viral* (medio de cultivo de células completo o Medio Esencial Mínimo + 10 % de suero bovino fetal), estos se colocaron en tubos de 5 ml que contenían 1,5 ml de PrimeStore® y se incubaron a temperatura ambiental (del entorno) durante 10, 30, o 60 minutos. Tras la incubación, los hisopos se procesaron con el

5 uso de dos métodos: (1) Se extrajo una alícuota de la muestra de *tampón de almacenamiento viral* + PrimeStore® y se diluyó en serie (10 veces) a 10^{40} en medio de cultivo de células completo en una placa de 96 pocillos que contenía una monocapa de células MDCK. Las células se dejaron incubar durante hasta 96 horas y después se examinaron visualmente en cuanto a la presencia de efectos citopáticos (CPE) y se determinó la dilución que no exhibió CPE observables. (2)
 10 Cada uno de los hisopos *cargados con tampón de almacenamiento viral* se retiró de PrimeStore® y se colocó en un tubo cónico de 50 ml que contenía 10 ml de medio de cultivo de células completo. Los hisopos se agitaron a 200 rpm durante 15 minutos, y se extrajo una alícuota de cada extracto y se diluyó en serie (10 veces) en medio de cultivo de células completo en una placa de 96 pocillos que contenía una monocapa de células MDCK. Las células se dejaron incubar durante hasta 96 horas y después se examinaron visualmente en cuanto a la presencia de CPE y se determinó la dilución que no exhibió CPE observables.

15 La eficacia de la inactivación de la Parte 1 se realizó en base a los resultados de la evaluación de la toxicidad *in vitro*. Los hisopos de recolección de muestras ($n = 6$) se cargaron con 0,1 ml de H5N1 ($1-5 \times 10^7$ TCID₅₀/ml) o tampón de almacenamiento viral (controles negativos, $n = 3$), se colocaron en tubos de 5 ml que contenían 1,5 ml de PrimeStore® y se incubaron en condiciones ambientales durante 10, 30, o 60 min. Después de la incubación, los hisopos se procesaron con el uso del enfoque más apropiado determinado a partir de la prueba de toxicidad *in vitro*. Las células se dejaron incubar durante hasta 96 horas y después se examinaron visualmente en cuanto a la presencia de efectos citopáticos (CPE) y se determinó el TCID₅₀ total. La eficacia de la inactivación se calculó en términos de una reducción logarítmica en comparación con los controles no tratados.

20 El estudio de almacenamiento ambiental prolongado para la Parte 2 involucró la conservación del ARN de H5N1 y H1N1 en PrimeStore® durante hasta 62 días a temperatura ambiental. Los puntos de tiempo fueron en el Día 0 (día de la inoculación de H5N1 en PrimeStore®), +1, +2, +5, +7, +14, +30, y +62 días a partir de la fecha de inoculación. Los virus H5N1 y H1N1 se diluyeron a 1×10^5 TCID₅₀ antes de la inoculación en PrimeStore®. En cada punto de tiempo, se realizaron aislamientos de ARN con el uso del kit RNAqueous-Micro (Ambion núm de Cat. AM1931, Austin, TX, Estados Unidos) en muestras de H5N1 y H1N1 almacenadas en PrimeStore®. El ARN resultante se almacenó a < -80 °C hasta que se aislaron los ARN de todos los puntos de tiempo. La PCR en tiempo real se realizó en un instrumento 7900HT (Sistema de PCR en tiempo real rápido) de Applied Biosystems (Forster City, CA, Estados Unidos).

30 El primer método usado en la evaluación de la toxicidad *in vitro* de la Parte 1 (se extrajo una alícuota de la muestra de *tampón de almacenamiento viral* + PrimeStore® y se diluyó en serie después se añadió a una placa de 96 pocillos), dio como resultado la observación de CPE o reacción tipo CPE en la monocapa de células iVIDCK a 1:10.000 para todos los puntos de tiempo (10, 30, y 60 min). El segundo método usado en la evaluación de la toxicidad *in vitro* de la Parte 1 (cada uno de los hisopos *cargados con tampón de almacenamiento viral* se retiró de PrimeStore® y se colocó en un tubo cónico de 50 ml que contenía 10 ml de medio de cultivo de células completo, los hisopos se agitaron durante 15 minutos, y se extrajo una alícuota de cada extracto y se diluyó en serie) dio como resultado la observación de CPE o reacción tipo CPE en la monocapa de células MDCK a 1:100 para todos los puntos de tiempo. Por lo tanto, la evaluación de la toxicidad *in vitro* de la Parte 1 determinó que el segundo método de extracción de muestras dio como resultado CPE o reacción tipo CPE en las células MDCK por PrimeStore®, y este segundo método se consideró adecuado para la eficacia de la prueba de inactivación de la Parte 1. El punto de tiempo de 60 minutos (*es decir*, el punto de tiempo más largo registrado) se eligió para la prueba de eficacia dado que no determinó si los CPE o las reacciones tipo CPE se correspondían con algún punto de tiempo. Los CPE o las reacciones tipo CPE para el punto de tiempo más largo fueron equivalentes al punto de tiempo más corto (10 min), esto demostró claramente que los CPE o las reacciones tipo CPE eran dependientes de la dilución (1:100) y del método de extracción (segundo método).

45 La eficacia de la prueba de inactivación de la Parte 1 dio como resultado H5N1 viable no detectable dado que la recuperación del virus fue equivalente al control negativo (*es decir*, PrimeStore® sin virus añadido). En tanto que, el control positivo (*es decir*, sin PrimeStore® añadido, medio de cultivo de células usado *in lieu* del reactivo PrimeStore®, virus añadido) dio como resultado una excelente recuperación (promedio de 67,59 % de recuperación) de H5N1 como se esperaba. Los resultados indican que el reactivo PrimeStore® fue capaz de inactivar un título alto de H5N1 ($1,26 \times 10^7$ TCID₅₀) a los 60 minutos hasta el nivel del control negativo.

50 La PCR en tiempo real del estudio de almacenamiento prolongado en condiciones ambientales para la Parte 2 mostró que la detección de la diana para los cuatro ensayos (H1N1 de BBRC, H5N1 de BBRC, H1N1 de Longhorn y H5N1 de Longhorn) del ARN extraído del punto de tiempo más largo a los 62 días demostró ser igual de sensible (todos los promedios de $C_T < 26,00$) que el punto de tiempo más corto en el Día 0 (día de la inoculación). Los resultados indican que el reactivo PrimeStore® no tuvo efectos perjudiciales sobre el ARN durante períodos de almacenamiento prolongados en condiciones ambientales.

60 Ejemplo 8 - Análisis de especímenes que contienen ácidos nucleicos específicos de *Mycobacterium*

65 Los ensayos específicos de especie universales se dirigen a una región altamente conservada del gen de IS6110, un elemento de inserción que se encuentra casi exclusivamente dentro de los miembros del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. Se pueden encontrar múltiples copias del elemento IS6110 en diferentes ubicaciones en los genomas de los miembros del complejo *M. tuberculosis*, por lo que estos cebadores también pueden ayudar en la genotipificación de cepas. Todos los cebadores y sondas se obtuvieron de Applied Biosystems (Foster City, CA, Estados Unidos).

El instrumento LightCycler® 2.0 de laboratorio (Roche Molecular Diagnostics, Indianápolis, IN, Estados Unidos), y su versión portátil ligera (50 lb), el dispositivo de identificación de patógenos avanzado y resistente (R.A.P.I.D., Idaho Technologies, Salt Lake City, UT, Estados Unidos), son instrumentos capilares en tiempo real de 32 pocillos, que emplean componentes y software operativos similares. El instrumento R.A.P.I.D. está configurado dentro de una caja reforzada, y puede emplearse de forma remota (*por ejemplo*, en el campo, o en el punto de atención).

Las secuencias de los cebadores y sondas se muestran arriba. Los puntos de fusión de los pares de cebadores están dentro de 2 °C y se hibridan/extienden a 58-60 °C. Las sondas respectivas se hibridan/extienden a 8-10 °C más que los cebadores. El termociclado funciona en un formato rápido de 2 temperaturas, con hibridación y extensión, cada una a 60 °C durante al menos alrededor de 30 segundos en total, facilitado por la naturaleza corta de los amplicones respectivos.

La amplificación en tiempo real se realizó en un formato de una sola etapa, con recipiente de una sola reacción. Con el uso del ensayo PrimeMix® Universal MTB (Longhorn Vaccines & Diagnostics, Estados Unidos), se añadieron 2 µl, 3 µl, 4 µl o 5 µl de ácidos nucleicos a 18 µl, 17 µl, 16 µl o 15 µl, respectivamente, de mezcla maestra (*es decir*, PrimeMix®) que contiene los siguientes componentes a las concentraciones finales indicadas: (a) tampón de reacción 1X que contiene 50 mM de Tris, pH 8,0, 70 mM de KCl, 3 mM de MgSO₄, 45 mM de Betaina, 0,05 µM de ROX™, 0,025 µg/µl de BSA ultrapura, 0,2 mM de dNTP, y 0,1 mM de EDTA; (b) mezcla de enzima 1X que contiene 20 µM de cada cebador, 1 unidad de polimerasa *Taq*, y 20 µM de sonda etiquetada. El cebador directo para amplificar la secuencia diana de *M. tuberculosis* consistió en la siguiente secuencia: 5'-CTCGTCCAGCGCCGCTTC-3' (SEQ ID NO:2). El cebador inverso para amplificar la secuencia diana de *M. tuberculosis* consistió en la siguiente secuencia: 5'-ACAAAGGCCACGTAGGCGA-3' (SEQ ID NO:3). La sonda etiquetada para detectar la presencia de la secuencia diana de *M. tuberculosis* consistió en la siguiente secuencia: 5'-6FAM-ACCAGCACCTAACCGGCTGTGGGTA-MGBNFQ-3' (SEQ ID NO:4). La Figura 5 muestra que la adición de más ADN plantilla de *M. tuberculosis*, *es decir*, 5 µl en lugar de 2 µl de ADN extraído de paciente, da como resultado resultados de detección y amplificación por RT-PCR ligeramente mejores, *es decir*, un valor de C_t promedio de 25,1 para 2 µl frente a un valor de C_t promedio de 23,4 para 5 µl.

El termociclado se realizó de la siguiente manera: un comienzo en caliente inicial a 95 °C durante 5 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 10 segundos, y una hibridación y extensión combinadas a 60 °C durante 32 segundos. La eficiencia de amplificación se determinó con el uso del método de pendiente de C_t de acuerdo con la ecuación: $E = [10^{(-1/Pendiente)} - 1] \times 100$. Todos los ensayos descritos aquí exhibieron una eficiencia de amplificación mayor que 98,5 %.

Para cada análisis, se incluyeron controles "sin plantilla" y "positivos". La fluorescencia de referencia para cada análisis se ajustó manualmente a la de la reacción de control "sin plantilla" respectiva. El control "positivo" da lugar a un aumento de la intensidad de fluorescencia con relación al valor de referencia sin plantilla. Un "positivo" desconocido se define como la amplificación que excede la fluorescencia de referencia con un valor de C_t correspondiente que no excede de 36 en una corrida de 40 ciclos.

Las muestras se recolectaron haciendo remolinos con un hisopo Copan cinco veces alrededor de un espécimen de esputo y este se sumergió en un tubo de recolección con PrimeStore® que contenía 1,5 ml de solución PrimeStore®. Se usó además una relación 1:1 de muestra respecto a PrimeStore®, como se describió anteriormente. Antes de esta evaluación el material recolectado con hisopo se extrajo con el uso del kit de preparación de especímenes respiratorios AMPLICOR® y se amplificó con el kit de detección de *Mycobacterium* LightCycler®. Los especímenes se mantuvieron a temperaturas ambientales durante aproximadamente 6 - 30 días antes de la extracción y amplificación de ácidos nucleicos con el uso del ensayo PrimeMix™ Universal MTB como se describió anteriormente. El ensayo PrimeMix™ Universal MTB se envió al laboratorio desde los Estados Unidos a 4 °C (4 días) y una vez recibido permaneció a temperatura ambiental durante 48 horas antes de almacenarlo a - 20 °C.

La extracción de ácidos nucleicos se llevó a cabo con el uso del kit minipreparativo de ADN QIAamp® (Qiagen®, Hilden, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. 200 µl del material recolectado con hisopo en PrimeStore® se agitó por vórtice brevemente (*por ejemplo*, 5 a 10 segundos) y se usó como material de partida para el procedimiento de extracción.

La amplificación de ácidos nucleicos se llevó a cabo con el uso del ensayo PrimeMix™ Universal MTB. El cebador directo para amplificar la secuencia diana de *M. tuberculosis* consistió en la siguiente secuencia: 5'-CTCGTCCAGCGCCGCTTC-3' (SEQ ID NO:2). El cebador inverso para amplificar la secuencia diana de *M. tuberculosis* consistió en la siguiente secuencia: 5'-ACAAAGGCCACGTAGGCGA-3' (SEQ ID NO:3). La sonda etiquetada para detectar la presencia de la secuencia diana de *M. tuberculosis* consistió en la siguiente secuencia: 5'-6FAM-ACCAGCACCTAACCGGCTGTGGGTA-MGBNFQ-3' (SEQ ID NO:4). La reacción de PCR contenía 18 µl de PrimeMix™ Universal MTB y 2 µE de ácidos nucleicos extraídos. El perfil de amplificación consistió en un comienzo en caliente inicial a 95 °C durante 5 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 10 segundos y una hibridación y extensión combinadas a 60 °C durante 32 segundos, como se describió anteriormente. La amplificación se llevó a cabo en la plataforma LightCycler® 480 (Roche) y el amplicón se detectó debido al etiquetado con FAM de la sonda.

65

De manera similar a los Ejemplos descritos anteriormente, se realizaron estudios comparativos con el uso de los siguientes protocolos: (1) Procedimiento de descontaminación con NaLc/NaOH seguido de extracción mediante el uso del kit de preparación de especímenes respiratorios AMPLICOR® y amplificación con el uso del kit de detección de *Mycobacterium* LightCycler® (MTB); (2) el procedimiento de recolección con hisopo del cultivo en PrimeStore®, seguido de la extracción mediante el uso del kit de preparación de especímenes respiratorios AMPLICOR® y la amplificación con el uso del kit de MTB LightBycler®; (3) una relación 1:1 de espécimen respecto a PrimeStore®, seguido de extracción mediante el uso del kit de preparación de especímenes respiratorios AMPLICOR® y amplificación con el uso del kit de MTB LightBycler®; (4) el procedimiento de recolección con hisopo del cultivo en PrimeStore®, seguido de extracción mediante el uso del kit de preparación de especímenes respiratorios AMPLICOR® y amplificación con el uso del ensayo PrimeMix® Universal MTB; y (5) el procedimiento de recolección con hisopo del cultivo en PrimeStore®, seguido de extracción mediante el uso del kit minipreparativo de ADN QIAamp® y amplificación con el kit de MTB LightCycler®.

Los resultados del ensayo PrimeMix® Universal MTB pueden observarse en las Tablas 10 y 11.

15 Tabla 10

INFORMACIÓN DE LOS ESPECÍMENES				
Espécimen núm.	Baciloscopia	ID del Cultivo	Volumen de espécimen hisopo (µl)	Duración (días) de muestra en hisopo en PrimeStore® a temperatura ambiental antes de la amplificación
1	+	<i>M. tuberculosis</i>	50	28
2	+++	<i>M. tuberculosis</i>	50	28
3	+++	<i>M. tuberculosis</i>	150	28
4	++	<i>M. tuberculosis</i>	250	28
5	Negativa	<i>M. tuberculosis</i>	100	6
6	Negativa	<i>M. tuberculosis</i>	100	6
7	Débil 7	<i>M. tuberculosis</i>	50	6
8	Débil 1	<i>M. tuberculosis</i>	50	6
9	Débil 9	<i>M. tuberculosis</i>	50	6
10	Negativa	<i>M. tuberculosis</i>	50	6
11	Negativa	<i>M. tuberculosis</i>	50	6
12	Negativa	<i>M. tuberculosis</i>	50	6
13	Negativa	<i>M. tuberculosis</i>	50	6
14	Negativa	<i>M. tuberculosis</i>	100	6

45 Tabla 11

COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS DE PCR CON EL USO DE MÉTODOS DE PROCESAMIENTO DIFERENTES						
Espécimen núm.	Baciloscopia	NaLc/NaOH; Kit LightCycler® MTB	Hisopo en PrimeStore®; Kit LightCycler® MTB	Espécimen respecto a PrimeStore® (1:1); Kit LightCycler® MTB	Hisopo en PrimeStore®; Ensayo PrimeMix® Universal MTB	Hisopo en PrimeStore®; Kit Qiagen®; LightCycler® Mtb
		Valor de Ct	Valor de Ct	Valor de Ct	Valor de Ct	Valor de Ct
1	+	27,00	31,34	31,54	35,00	31,67
2	+++	28,82	31,77	31,56	33,43	32,74
3	+++	29,21	26,62	23,80	26,24	26,56
4	++	28,04	29,63	26,64	27,51	28,96
5	neg	-	37,45	33,03	35,00	33,11
6	neg	-	-	-	-	-

COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS DE PCR CON EL USO DE MÉTODOS DE PROCESAMIENTO DIFERENTES

Espécimen núm.	Baciloscopia	NaLc/NaOH; Kit LightCycler® MTB	Hisopo en PrimeStore®; Kit LightCycler® MTB	Espécimen respecto a PrimeStore® Kit (1:1); LightCycler® MTB	Hisopo en PrimeStore®; Ensayo PrimeMix® Universal MTB	Hisopo en PrimeStore®; Qiagen®; Kit LightCycler®
		Valor de Ct	Valor de Ct	Valor de Ct	Valor de Ct	Valor de Ct
7	débil 7	34,25	34,09	29,51	33,03	31,85
8	débil 1	31,59	-	32,11	35,00	34,21
9	débil 9	32,51	-	31,01	35,00	33,75
10	neg	-	-	-	35,00	33,89
11	neg	-	33,28	31,87	35,00	33,59
12	neg	34,79	39,49	32,00	35,00	32,72
13	neg	-	-	-	-	34,47
14	neg	26,24	29,26	37,75	35,00	29,19

(-) símbolo indica que no se obtuvieron resultados.

El ensayo PrimeMix™ Universal MTB detectó el 71 % de los casos de baciloscopia negativa, así como un 100 % de las baciloscopias positivas. El ensayo PrimeMix™ Universal MTB detectó un mayor número de muestras con cultivo positivo que el uso del MTB LightCycler®. El ensayo PrimeMix™ Universal MTB fue compatible con el uso de la solución PrimeStore®.

Ejemplo 9 - Estabilidad del ensayo PrimeMix® Universal MTB

Los componentes del ensayo PrimeMix® Universal MTB como se describió anteriormente se retiraron del almacenamiento a una temperatura de -20 °C y se colocaron a temperatura ambiental un número variable de veces, es decir, una, tres, cinco y diez veces, para determinar la estabilidad de los reactivos combinados y si la descongelación y congelación repetidas inhibirían el rendimiento del ensayo PrimeMix® Universal MTB en la detección del complejo *M. tuberculosis* en muestras de ácidos nucleicos. Todos los componentes del ensayo estaban en un solo tubo y se descongelaron a temperatura ambiental durante alrededor de tres a alrededor de cinco minutos. Después el tubo se colocó a una temperatura de -20 °C durante alrededor de una hora para comenzar el siguiente ciclo de congelación y descongelación. Después del ciclo de congelación y descongelación final, se llevó a cabo la RT-PCR como se describió anteriormente para el ensayo PrimeMix® Universal MTB con el uso de una cepa MDR-TB previamente identificada (Universidad de Pretoria, Sudáfrica). Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado para cada número de ciclos de congelación y descongelación y los valores de Ct resultantes se promediaron.

Los resultados del ensayo PrimeMix® Universal MTB después de colocarlo en una serie de ciclos de congelación/descongelación pueden observarse en la Figura 3. Como puede observarse en este gráfico, el ensayo PrimeMix® Universal MTB no mostró reducción en la amplificación por PCR, como indican los valores de Ct resultantes, que no varían significativamente entre sí, incluso cuando los componentes del ensayo PrimeMix® Universal MTB se descongelan y se vuelven a congelar diez veces. El promedio de los valores de Ct después de un ciclo de congelación y descongelación (Ct = 23,6) y después de diez ciclos de congelación y descongelación (Ct = 23,7) no varió significativamente. Por lo tanto, el ensayo PrimeMix® Universal MTB contiene componentes estables que no se degradan en condiciones de temperatura variables lo que lo hace particularmente adecuado para el uso en el campo, lejos de los entornos de laboratorio tradicionales.

Ejemplo 10 - Detección de IPC(s) para monitorear la integridad de la muestra/la fidelidad de los ácidos nucleicos en ensayos PrimeMix

Diseño del control positivo interno a colocar en PrimeStore®, junto con los cebadores y sondas para su detección

Como se indica en la presente descripción, en ciertas modalidades es conveniente incluir una molécula de ácido nucleico portadora y/o una secuencia de IPC para ayudar en la preparación, estabilización, y cuantificación de los polinucleótidos aislados. Los IPC descritos en la presente descripción pueden obtenerse directamente por síntesis química con el uso de métodos convencionales, o alternativamente, prepararse con el uso de tecnología de ADN recombinante. Es conveniente formular una secuencia de IPC que no sea genómica, y que no se hibride significativamente con un genoma de mamífero, o con el genoma de la especie patógena de interés. Las composiciones y los métodos de uso particulares pueden

encontrarse en la Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos núm. 2009/0233309 en tramitación del Solicitante (presentada el 20 de abril de 2009).

En un ejemplo, los inventores han empleado una molécula de ADN monocatenario que comprende la secuencia de la SEQ ID NO:8 (5'-GGGATCGTATAATCGTCGTGCAGTCAGTCCCTCGGTTAAAGTCTCGAGTCGCTCTGT CAAAATATCCGTACCGTAGTCGATGCGAGCGAGTCCGATCAGTCCAGGTTTCAAAGT CAAATGACTA-3') como control positivo interno para monitorear la fidelidad y la integridad de los ácidos nucleicos analizados. Típicamente, se colocó en PrimeStore® alrededor de 0,02 pg/ml de diana de ADN monocatenario. En ejemplos ilustrativos, los cebadores de amplificación seleccionados y las sondas de detección de oligonucleótidos etiquetadas se unen cada uno preferentemente al menos a una primera secuencia de nucleótidos aislada de la SEQ ID NO:8. Con el uso de los siguientes cebadores de amplificación específicos, el producto de amplificación resultante es de alrededor de 100 pb de longitud:
 Cebador directo: 5'-GTGCAGTCAGTCCCTCGGTTA-3' (SEQ ID NO:9)
 Cebador inverso: 5'-TTGACTTTGAAACCTGGACTGATC-3' (SEQ ID NO:10)

Como una sonda de detección de oligonucleótido ilustrativa específica para este producto de amplificación, los inventores seleccionaron la secuencia de la SEQ ID NO:11 (5'-[FAM]-AAATATCCGTACCGTAGTCG-[MGB]-3').

No es necesario que los IPC útiles en la práctica de la presente descripción incluyan una de las secuencias ilustrativas descritas en la presente descripción, incluso no es necesario que los IPC sean sustancialmente homólogos a cualquiera de las secuencias de IPC adjuntas en la presente descripción. Para ilustrar este punto, las siguientes secuencias representan variantes de la SEQ ID NO:8 que también son funcionales como secuencias de ADN portador/IPC, a pesar de tener redundancia de secuencias:

No es necesario preparar los IPC de la presente descripción a partir del amplicón de ADN ilustrativo preciso descrito en la presente descripción como la SEQ ID NO:8. Ejemplos adicionales de secuencias de ADN útiles en la preparación *in vitro* de moléculas de ARN portadoras adecuadas incluyen, sin limitación, una o más de las siguientes secuencias. En cada caso, el sitio de transcripción de la polimerasa se muestra en subrayado sencillo, mientras que las secuencias de los dominios de unión de los cebadores de PCR directo e inverso ilustrativos se muestran en subrayado doble. Los dominios de secuencia ilustrativos a los que se unen las sondas moleculares etiquetadas adecuadas se muestran en negrita.

5'-X_nTATTAATACGACTCACTATAGGGX_nGTGCAGTCAGTCCCTCGGTTAAAGTCTCG
 AGTCGCTCTGTCAA**AATATCCGTACCGTAGTCGATGCGAGCGAGTCCGATCAGTCC**
 AGGTTTCAAAGTCAAX_n-3' (SEQ ID NO:12),

en donde X es cualquier nucleótido y n es cualquier número entero de 0 a alrededor de 500.

5'-ATCGTATTAATACGACTCACTATAGGGAATCGTCGTGCAGTCAGTCCCTCGGTTA
 AAGTCTCGAGTCGCTCTGTCAA**AATATCCGTACCGTAGTCGATGCGAGCGAGTCCG**
 ATCAGTCCAGGTTTCAAAGTCAAATGACTA-3' (SEQ ID NO:13).

5'-ATCGTATTAATACGACTCACTATAGGGAATCGTCGTGCAGTCAGTCCCTCGGTTA
 AAGTCTCGAGTCGCTCTGTCAA**AATATCCGTACCGTAGTCGATGCGAGCGAGTCC**
 GATCAGTCCAGGTTTCAAAGTCAAATGACTA-3' (SEQ ID NO:14).

5'-ATCGTATTAATACGACTCACTATAGGGAATCGTCGTGCAGTCAGTCCCTCGGTTA
 AAGTCTCGAGTCGCTCTGTCAA**AATATCCGTACCGTAGTCGATGCGAGCGAGTCC**
 GATCAGTCCAGGTTTCAAAGTCAAATGACTA-3' (SEQ ID NO:15).

5'-ATATTAATACGACTCACTATAGGGAGTGCAGTCAGTCCCTCGGTTAAAGTCTCGA
 GTCGCTCTGTCAA**AATATCCGTACCGTAGTCGATGCGAGCGAGTCCGATCAGTCCA**
 GGTTTCAAAGTCAAAT-3' (SEQ ID NO:16).

5'-ATATTAATACGACTCACTATAGGGAGTGCAGTCAGTCCCTCGGTTAAAGTCTCGA
 GTCGCTCTGTCAA**AATATCCGTACCGTAGTCGATGCGAGCGAGTCCGATCAGTCC**
 AGGTTTCAAAGTCAAAT-3' (SEQ ID NO:17).

5'-ATATTAATACGACTCACTATAGGGAGTGCAGTCAGTCCCTCGGTTAAAGTCTCGA
 GTCGCTCTGTCAA**AATATCCGTACCGTAGTCGATGCGAGCGAGTCCGATCAGTCCA**
 GGTTTCAAAGTCAAAT-3' (SEQ ID NO:18).

5'-TATTAATACGACTCACTATAGGGGTGCAGTCAGTCCCTCGGTTAAAGTCTCGAGT
CGCTCTGTCAAAATATCCGTACCGTAGTCGATGCGAGCGAGTCCGATCAGTCCAG
GTTTCAAAGTCAA-3' (SEQ ID NO:19).

5'-TATTAATACGACTCACTATAGGGGTGCAGTCAGTCCCTCGGTTAAAGTCTCGAGT
CGCTCTGTCAAAATATCCGTACCGTAGTCGATGCGAGCGAGTCCGATCAGTCCAGG
TTTCAAAGTCAA-3' (SEQ ID NO:20).

5'-TATTAATACGACTCACTATAGGGGTGCAGTCAGTCCCTCGGTTAAAGTCTCGAGT
CGCTCTGTCAAAATATCCGTACCGTAGTCGATGCGAGCGAGTCCGATCAGTCCAGG
TTTCAAAGTCAA-3' (SEQ ID NO:21).

15 Ejemplo 11 - Detección de sondas fluorescentes de ADN de IPC

La(s) sonda(s) de detección de IPC puede(n) incluir una etiqueta radioactiva, luminiscente, quimioluminiscente, fluorescente, enzimática, magnética, o de resonancia de espín, o una combinación de estas. Las etiquetas fluorescentes pueden incluir fluoresceína, 6-carboxifluoresceína (6-FAM), o 6-carboxifluoresceína-*N*-succinimidil éster (6-FAMSE), colorante VIC™, o similares, o una combinación de estos.

La sonda de detección de IPC (SEQ ID NO:11) se etiquetó con colorante 6-FAM (FAM) o VIC™ por métodos conocidos para el experto en la técnica, para evaluar su efecto sobre la detección del IPC en muestras, una vez realizada la RT-PCR. PrimeMix® que contiene estas sondas así como los cebadores de IPC (SEQ ID NO:9 y SEQ ID NO:10) se usó para amplificar y después detectar la presencia del IPC. El experimento se realizó cuatro veces para cada tipo de sonda etiquetada. La detección se realizó con el uso del sistema de PCR en tiempo real rápido ABI 7500 (Applied Biosystems™, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, Estados Unidos). Como puede observarse en la Figura 4, no hubo diferencia significativa entre los valores de C_T para la sonda de detección de IPC etiquetada con colorante VIC™ (valor de $C_T = 32,5$) y la etiquetada con 6-FAM (valor de $C_T = 31,5$). Por lo tanto, el tipo de etiqueta de sonda usada tiene un efecto mínimo o nulo en la realización del análisis y la evaluación de la presencia y la cantidad del IPC.

Ejemplo 12 - Ensayo múltiple: Control positivo interno en combinación con el ensayo PrimeMix® Universal MTB

Como se indicó anteriormente, es conveniente formular una secuencia de IPC que no sea genómica, y que no se hibride significativamente con un genoma de mamífero, o con el genoma de la especie patógena de interés. Esto es para evitar la posibilidad de que los cebadores y sondas de IPC detecten otro(s) ácido(s) nucleico(s) presente(s) en una muestra extraída de paciente, tal como el ADN de los propios pacientes o de otros microorganismos que no son de interés y que pueden estar presentes en la muestra.

Para garantizar que el IPC, los cebadores de IPC y las sondas de IPC de la presente descripción no afecten o inhiban la amplificación o detección de la secuencia de *M. tuberculosis* en las muestras, el IPC de ADN monocatenario se colocó en PrimeStore® que contenía alrededor de 33 ng/μl de ADN de *M. tuberculosis* MDR previamente identificada. Después el ácido nucleico se extrajo con el uso del kit minipreparativo de ADN QIAamp® (Qiagen®) y se usó PrimeMix® que contenía cebadores y sondas para *M. tuberculosis* y el IPC, como se describió anteriormente, en un ensayo PrimeMix® Universal MTB múltiple. Como comparación, el mismo procedimiento se llevó a cabo en la misma cepa de *M. tuberculosis* pero no se añadieron IPC, cebadores o sondas de IPC. Este experimento se llevó a cabo por triplicado tanto para el procedimiento múltiple como para el simple. Como puede observarse en la Figura 6, la amplificación y detección del ácido nucleico de *M. tuberculosis* no se afectó significativamente en el procedimiento múltiple, es decir, el valor de C_T promedio para el procedimiento múltiple ("MTB múltiple") fue 24,6 mientras que el valor de C_T para el procedimiento simple ("MTB") fue 23,6.

Ejemplo 13 - Ensayos simples y múltiples: Concentraciones variables de IPC

La concentración del IPC colocado en PrimeStore® se varió. Se colocaron 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , y 10^{-8} ng/μl de IPC en la misma cantidad de PrimeStore®. En dependencia de si se realizó una reacción simple o múltiple, un conjunto de cebadores y sonda específicos del complejo *M. tuberculosis* también se colocó en el PrimeMix®. No se añadieron ácidos nucleicos específicos del complejo *M. tuberculosis* a la solución PrimeStore®. Como puede observarse en la Figura 7, la variación de la concentración del IPC en PrimeStore® en un ensayo PrimeMix® Universal MTB múltiple ("IPC Vic en ensayo múltiple") no mostró diferencias significativas en comparación con las mismas variaciones de concentración de IPC en el ensayo PrimeMix® simple (solo para IPC) ("IPC Fam" e "IPC Vic"). Además no hubo diferencias significativas entre las sondas de IPC etiquetadas con 6-FAM y las etiquetadas con colorante VIC™ en un formato simple cuando se varió la concentración de IPC.

Ejemplo 14 - Ensayos simples y múltiples: Concentraciones variables de muestra de *M. tuberculosis*

Como puede observarse en la Figura 8, el aumento de la cantidad inicial de muestra de *M. tuberculosis* de 15 µl a 150 µl (una diferencia de 10 veces) como se almacenó inicialmente en 1,5 ml de PrimeStore®, mejora ligeramente los resultados obtenidos a partir de un ensayo PrimeMix® Universal MTB simple (valor de C_T promedio de 15 µl de muestra = 26,5, valor de C_T promedio de 150 µl de muestra = 24,1) y un ensayo PrimeMix® Universal MTB múltiple (valor de C_T promedio de 15 µl de muestra = 26,8, valor de C_T promedio de 150 µl de muestra = 24,2). Como se esperaba la detección del IPC no se afecta. Hubo poca diferencia observable en la amplificación por PCR de MTB, medida por las puntuaciones de C_T entre el ensayo de PrimeMix® Universal MTB simple y múltiple.

Ejemplo 15 - Ensayos simples y múltiples: Detección de cepas de micobacterias

Varias cepas de micobacterias (*es decir*, cinco cepas diferentes de *M. tuberculosis*, dos cepas diferentes de *M. avium*, una cepa de *M. intracellulerae*, una cepa de *M. gordonii*, y una cepa de *M. kansasii*) se analizaron con el uso tanto de PrimeMix® simple ("MTB simple") como múltiple ("MTB en ensayo múltiple") mediante procedimientos similares a los descritos anteriormente. Las cantidades de extracción de ácidos nucleicos variaron, en dependencia de los contenidos de la muestra de esputo de alrededor de 80 a alrededor de 180 ng/µl. Como puede observarse en la Figura 9, tanto los ensayos simples como múltiples detectaron fácilmente las cinco cepas diferentes de *M. tuberculosis* pero no las otras cepas que no son de MTB. Esto indica que el ensayo PrimeMix® detecta fácilmente organismos causantes de tuberculosis y no otras especies de micobacterias. No se detectó diferencia significativa entre los resultados de los ensayos simples y múltiples para la detección de MTB lo que indica poca o ninguna pérdida de sensibilidad entre los ensayos simples y múltiples. El IPC se detectó fácilmente en todos los ensayos múltiples, independientemente de la cepa de micobacteria usada.

Ejemplo 16 - Ensayos simples y múltiples: Dilución del patógeno diana *M. tuberculosis*

Como puede observarse en la Figura 10, la variación de la cantidad de concentración de secuencia diana de *M. tuberculosis* de una cepa purificada particular, *es decir*, 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} son representativos de diluciones de diez veces en donde 10^{-1} representa una concentración de ADN de 330 ng/µl, 10^{-2} representa una concentración de ADN de 33 ng/µl, 10^{-3} representa una concentración de ADN de 3,3 ng/µl y 10^{-4} representa una concentración de ADN de 0,33 ng/µl, aumentó significativamente la capacidad del ensayo PrimeMix® de detectar *M. tuberculosis*, tanto en los ensayos simples como múltiples. La concentración de secuencia diana de IPC fue 0,02 pg/ml para cada ensayo. La detección de IPC se afectó mínimamente por la concentración más alta de ácido nucleico de *M. tuberculosis*, como se espera típicamente en la realización de ensayos múltiples en los que la concentración de una secuencia diana es generalmente mucho más alta que la de la diana de IPC. Esto podría abordarse mediante el aumento de la concentración de la secuencia diana de IPC en el ensayo o la optimización molar adicional de los cebadores y/o la sonda de IPC en la reacción múltiple.

Ejemplo 17 - Ensayos múltiples: Dilución de la cepa de *M. tuberculosis*

Como puede observarse en la Figura 11, la variación de la cantidad de ácido nucleico de *M. tuberculosis* de una cepa purificada particular, *es decir*, 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} son representativos de diluciones de diez veces en donde 10^{-1} representa una concentración de ADN de 33 ng/µl, 10^{-2} representa una concentración de ADN de 3,3 ng/µl, 10^{-3} representa una concentración de ADN de 0,33 ng/µl y 10^{-4} representa una concentración de ADN de 0,033 ng/µl, no tuvo efecto significativo sobre la detección del IPC cuando se usaron sondas de IPC etiquetadas con colorante 6-FAM o VIC™. Las sondas etiquetadas con 6-FAM mostraron valores de C_T más bajos en general, pero ambos métodos de detección fueron eficaces por igual.

Ejemplo 18 - Variación en el ciclo umbral de la PCR en tiempo real a varias concentraciones de BSA

Las enzimas de ADN y/o ARN de PCR y los tampones de PCR 10X se suministran típicamente en tubos separados y se mantienen a una temperatura constante de -20 grados Celsius. Las preparaciones de "mezcla maestra" se preparan típicamente por descongelación y combinación de la enzima y el tampón de PCR 10X con los cebadores de amplificación. La presente invención es una mezcla con todo incluido que incluye tampones, sales, enzimas, y cebadores y sonda para la amplificación en tiempo real de un tubo de uso único 1x que es considerablemente más termoestable que los tampones de PCR en la técnica. Por ejemplo, a diferencia del tampón de PCR 10X comercial suministrado con la polimerasa de ADN Platinum Taq (Invitrogen, Cat # 10966-018 y 10966-026), la presente invención incluye la adición de BSA para estabilizar las enzimas de PCR en la reacción.

La albúmina sérica bovina (BSA) se usa comúnmente en reacciones de enzimas de restricción para estabilizar algunas enzimas durante la digestión del ADN y para impedir la adhesión de la enzima a los tubos de reacción, particularmente a los tubos capilares de vidrio usados para la PCR. Debido a sus características estabilizantes en las reacciones enzimáticas de restricción prolongadas, *es decir*, durante toda la noche, la BSA puede mejorar del mismo modo la estabilidad y la integridad de las polimerasas de ADN y ARN usadas en las amplificaciones por PCR y RT-PCR, especialmente cuando estas enzimas se almacenan a temperaturas menores que -20 grados Celsius. Se informa que la BSA estabiliza las reacciones al interferir con sustancias inhibitorias y contaminantes del ADN. La presencia de BSA a concentraciones entre 0,1-0,5 mg/ml en las concentraciones de reacción finales no tiene efecto perjudicial sobre las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) posteriores como se determina por los valores de ciclo umbral de la PCR en tiempo real.

La betaína mejora la amplificación conjunta de dos variantes de corte y empalme alternativo del ARNm del antígeno de membrana específico de la próstata y la amplificación del ADNc de c-jun. La betaína y los compuestos zwitteriónicos funcionalizados catiónicos mejoran la amplificación de los genes mediante la reducción de la formación de la estructura secundaria causada por regiones ricas en GC y, por lo tanto, pueden ser generalmente aplicables para mejorar la amplificación de cualquier secuencia de ADN rica en GC. La betaína en PrimeMix conserva y estabiliza los nucleótidos individuales (A, T, C, G) e impide la hibridación, la estabilidad, la hidrólisis y la degradación oxidativa de los cebadores y sondas de PCR en las soluciones PrimeMix. La betaína presente a una concentración final entre 10-100 mM tuvo un efecto aditivo sobre la amplificación por PCR como se determinó por el ciclo umbral durante la amplificación en tiempo real. La betaína es una molécula estabilizada y muy adecuada para mezclas de reacción de PCR mantenidas a temperaturas mayores que menos 20 grados Celsius porque no promueve la tasa de mutación de nucleótidos durante la amplificación y no se degrada tan fácilmente como DTT y DMSO.

El pH final del tampón tiene un gran impacto sobre la estabilidad general durante la amplificación por PCR. El pH preferido para la PCR se informa típicamente a 8,4, aunque tampones tan básicos como 9,0 han sido eficaces. En la presente invención que contiene una mezcla con todo incluido de enzimas, tampones y cebadores, se ha encontrado que el pH óptimo es 8,2 (+/- 0,1). Se demostró que un tampón ligeramente menos básico mejora la amplificación por PCR mediante la PCR en tiempo real, específicamente cuando las formulaciones de PrimeMix se mantienen a lo largo del tiempo a temperaturas mayores que menos 20 grados Celsius.

El virus de la influenza A (H3N2) (10^2 TCID₅₀/ml) se amplificó con el uso de PrimeMix Universal para Influenza A en un gradiente de 0,1-0,5 mg/ml de BSA (ver la Figura 12). Como puede observarse, no hubo variación en el ciclo umbral de PCR en tiempo real indicado a estas concentraciones, lo que indica que la BSA no inhibe la PCR.

Otras modalidades y usos de la invención resultarán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la consideración de la descripción y la práctica de la invención descrita en la presente descripción. El término que comprende, cuando se usa, pretende incluir los términos que consiste y consiste esencialmente en. Además, los términos que comprende, que incluye, y que contiene no pretenden ser limitantes. Se pretende que la descripción y los ejemplos se consideren solamente ilustrativos con el verdadero alcance de la invención indicado por las reivindicaciones.

30 Listado de secuencias

<110> Fischer, Gerald W.
Daum, Luke T.

35 <120> Composiciones y métodos para detectar e identificar secuencias de ácidos nucleicos en muestras biológicas.

<130> 3022.008

<140> 13/094,809

40 <141> 2011-04-26

<150> 60/697,728

<151> 2007-10-01

45 <150> 12/243,949

<151> 2008-10-01

<150> 12/426,890

<151> 2009-04-20

50

<150> 12/510,968

<151> 2009-07-28

<150> 12/916,263

55 <151> 2010-10-29

<160> 21

<170> PatentIn versión 3.5

60

<210> 1

<211> 180

<212> ADN

<213> Mycobacterium tuberculosis

65

<400> 1
gtcccgccga tctcgtccag cgccgcttcg gaccaccagc acctaaccgg ctgtgggtag 60
5 cagacctcac ctatgtgtcg acctgggcag ggttcgcta cgtggccttt gtcaccgacg 120
cctacgtcgc aggatcctgg gctggcgggt cgctccacg atggccacct ccatggtcct 180

<210> 2
<211> 18
10 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
15 <223> Cebador oligonucleotídico directo sintético

<400> 2
ctcgtccagc gccgcttc 18

<210> 3
20 <211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
25 <223> Cebador oligonucleotídico inverso sintético

<400> 3
aaaaggcca cgtaggcga 19

<210> 4
30 <211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
35 <223> Sonda oligonucleotídica sintética

<400> 4
40 accaccagca cctaaccggc tgtgggta 28

<210> 5
<211> 18
45 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador oligonucleotídico directo sintético

<400> 5
50 accagcacct aaccggct 18

<210> 6
<211> 18
55 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador oligonucleotídico inverso sintético

<400> 6
60 accgacgct acgtcgca 18

<210> 7
65 <211> 24
<212> ADN

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sonda oligonucleotídica sintética
 5
 <400> 7
 agggttcgcc tacgtggcct ttgt 24
 <210> 8
 10 <211> 124
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 8
 gggatcgat aatcgtcgtg cagtcagtcc ctcggtaaa gtctcgagtc gctctgtcaa 60
 20 aatatccgta ccgtagtcga tgcgagcgag tccgatcagt ccaggtttca aagtcaaatg 120
 acta 124
 <210> 9
 25 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 30 <223> Cebador oligonucleotídico directo sintético
 <400> 9
 gtgcagtcag tcctcggtt a 21
 35 <210> 10
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico inverso sintético
 <400> 10
 45 ttgacttga aacctggact gatc 24
 <210> 11
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> Sonda oligonucleotídica sintética
 <400> 11
 55 aaatatccgt accgtagtcg 20
 <210> 12
 <211> 126
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético N = cualquier nucleótido
 65 <220>
 <221> misc_característica

<222> (1)..(1)
 <223> n es a, c, g, o t

5 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (25)..(25)
 <223> n es a, c, g, o t

10 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (126)..(126)
 <223> n es a, c, g, o t

15 <400> 12
 ntattaatac gactcactat agggngtgca gtcagtcacct cggttaaagt ctcgagtcgc 60
 tctgtcaaaa tatccgtacc gtagtcgatg cgagcgagtc cgatcagtc aggtttcaaa 120
 20 gtcaan 126

<210> 13
 <211> 141
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

30 <400> 13
 atcgtattaa tacgactcac tatagggaaat cgtcgtgcag tcagtcacct ggttaaagtc 60
 35 tcgagtcgct ctgtcaaaat atccgtaccg tagtcgatgc gagcgagtcc gatcagtcga 120
 ggtttcaaag tcaaatgact a 141

<210> 14
 <211> 141
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 45 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 14
 atcgtattaa tacgactcac tatagggaaat cgtcgtgcag tcagtcacct ggttaaagtc 60
 50 tcgagtcgct ctgtcaaaat atccgtaccg tagtcgatgc gagcgagtcc gatcagtcga 120
 ggtttcaaag tcaaatgact a 141

<210> 15
 <211> 141
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 15

65

ES 2 732 706 T3

	atcgtattaa tacgactcac tatagggaaat cgtcgtgcag tcagtcacctc ggttaaagtc	60
	tcgagtcgct ctgtcaaaaat atccgtaccg tagtcgatgc gagcaggtcc gatcagtcga	120
5	ggtttcaaag tcaaatgact a	141
	<210> 16	
	<211> 127	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
15	<400> 16	
	atattaatac gactcactat agggagtgca gtcagtcacct cggttaaagt ctcgagtcgc	60
	tctgtcaaaa tatccgtacc gtagtcgatg cgagcaggtc cgatcagtc cc aggtttcaaa	120
20	gtcaaat	127
	<210> 17	
	<211> 127	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
30	<400> 17	
	atattaatac gactcactat agggagtgca gtcagtcacct cggttaaagt ctcgagtcgc	60
	tctgtcaaaa tatccgtacc gtagtcgatg cgagcaggtc cgatcagtc cc aggtttcaaa	120
35	gtcaaat	127
	<210> 18	
	<211> 127	
	<212> ADN	
40	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
45	<400> 18	
	atattaatac gactcactat agggagtgca gtcagtcacct cggttaaagt ctcgagtcgc	60
	tctgtcaaaa tatccgtacc gtagtcgatg cgagcaggtc cgatcagtc cc aggtttcaaa	120
50	gtcaaat	127
	<210> 19	
	<211> 123	
	<212> ADN	
55	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
60	<400> 19	
	tattaatac actcactata ggggtgcagt cagtcacctc gttaaagtct cgagtcgctc	60
	tgtaaaaata tccgtaccgt agtcgatgcg agcaggtccg atcagtcag gtttcaaagt	120
65	caa	123

REIVINDICACIONES

1. Una composición lista para PCR para la detección de un miembro del complejo *M. tuberculosis* en una muestra biológica que comprende como componentes:
 - una mezcla de desoxinucleótidos trifosfatados que comprende cantidades sustancialmente equivalentes de dATP, dCTP, dGTP y dTTP, presentes colectivamente en la composición a una concentración de 0,1 mM a 1 mM;
 - un agente quelante seleccionado del grupo que consiste en ácido etilenglicol tetraacético, ácido hidroxietilendiaminotriacético, ácido dietilentriamino pentaacético, *N,N*-bis(carboximetil)glicina, etilendiaminotetraacético, citrato anhidro, citrato de sodio, citrato de calcio, citrato de amonio, bicitrato de amonio, ácido cítrico, citrato de diamonio, citrato de potasio, citrato de magnesio, citrato de amonio férrico, citrato de litio y cualquier combinación de estos, presente en la composición a una concentración de 0,01 mM a 1 mM;
 - el agente de osmolaridad de PCR *N,N,N*-trimetilglicina (betaina), presente en la composición a una concentración de 1 mM a 1 M;
 - una albúmina seleccionada del grupo que consiste en albúmina sérica bovina, albúmina sérica humana, albúmina sérica de cabra, albúmina de mamífero, y cualquier combinación de estas, presente en la composición a una concentración de 5 ng/ml a 100 ng/ml;
 - al menos dos sales, la primera es una sal de potasio seleccionada del grupo que consiste en cloruro de potasio y glutamato de potasio y la segunda es una sal de magnesio seleccionada del grupo que consiste en cloruro de magnesio y sulfato de magnesio, presentes colectivamente en la composición a una concentración de 50 mM a 1 M; y
 - un tampón seleccionado del grupo que consiste en tris(hidroximetil) aminometano (Tris), citrato, ácido 2-(*N*-morfolino)etanosulfónico (MES), ácido *N,N*-Bis(2-hidroxietil)-2-aminoetanosulfónico (BES), 1,3-bis(tris(hidroximetil)metilamino)propano (Bis-Tris), ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanosulfónico (HEPES), ácido 3-(*N*-morfolino)propanosulfónico (MOPS), *N,N*-bis(2-hidroxietil)glicina (Bicina), *N*-[tris(hidroximetil)metil]glicina (Tricina), ácido *N*-2-acetamido-2-iminodiacético (ADA), ácido *N*-(2-acetamido)-2-aminoetanosulfónico (ACES), piperazina-1,4-bis(ácido 2-etanosulfónico) (PIPES), bicarbonato, fosfato, y cualquier combinación de estos, presente en la composición a una concentración de 1 mM a 1 M y con un pH de 6,5 a 9,0, en donde el pKa del tampón está dentro de una unidad del pH de la composición a una temperatura ambiental, en donde los componentes se combinan con agua libre de nucleasas; y en donde la composición comprende uno o más colorantes;
 - una polimerasa termoestable presente en una cantidad de 0,05 U a 1 U;
 - una sonda de detección etiquetada que se une a una secuencia de ácido nucleico amplificada por PCR que es específica para los miembros del complejo *M. tuberculosis*, en donde la sonda de detección etiquetada es una secuencia específica de *Mycobacterium* de 20 a 35 nucleótidos de longitud y comprende la secuencia de la SEQ ID NO 4 o la SEQ ID NO 7; y
 - un par de cebadores de PCR configurados para amplificar por PCR la secuencia de ácido nucleico que es específica para los miembros del complejo *M. tuberculosis*, presentes colectivamente en la composición a una concentración de 0,5 μ M a 50 μ M, en donde cada cebador de PCR es de 18 a 35 nucleótidos de longitud.
2. Una composición como se reivindica en la reivindicación 1 en donde la composición mantiene la actividad de amplificación por PCR después de descongelarse y volver a congelarse diez veces.
3. Una composición como se reivindica en la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el uno o más colorantes se seleccionan del grupo que consiste en fluoresceína, ROX™ y 5-carboxi-X-rodamina.
4. Una composición como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 o la reivindicación 2, en donde el pH es de 6,5 a 7,5; y/o el pKa del tampón está dentro de 0,5 del pH del tampón a temperatura ambiental; preferentemente dentro de 0,2 del pH del tampón a temperatura ambiental.
5. Una composición como se reivindica en cualquier reivindicación precedente, que comprende además un ácido nucleico de control que proporciona una medida cualitativa o cuantitativa de la amplificación por PCR que está presente en la composición a una concentración de 1 fg a 1 ng.
6. Una composición como se reivindica en la reivindicación 5, en donde el ácido nucleico de control comprende la secuencia de la SEQ ID NO 8, la secuencia de la SEQ ID NO 12 o la secuencia de la SEQ ID NO 21.
7. Una composición como se reivindica en cualquier reivindicación precedente en donde un cebador del par de cebadores de PCR comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO 2 o la SEQ ID NO 5, y el otro cebador del par de cebadores de PCR comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO 3 o la SEQ ID NO 6.
8. Un método para la detección de un miembro del complejo *M. tuberculosis* en una muestra biológica que comprende:
 - poner en contacto la muestra biológica con la composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para formar una mezcla;

realizar múltiples etapas de termociclado en la mezcla para formar un producto de amplificación que se deriva del ácido nucleico que es específico para un miembro del complejo *M. tuberculosis*;
detectar la presencia o ausencia del producto de amplificación para determinar la presencia o ausencia de un miembro del complejo *M. tuberculosis* en la muestra biológica.

5

9. Un método como se reivindica en la reivindicación 8, que comprende además detectar una secuencia amplificada de un ácido nucleico de control y determinar la calidad o la cantidad de amplificación que se produjo a partir de las múltiples etapas de termociclado.

10

10. Un kit que comprende la composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, contenido dentro de un recipiente estéril configurado para la adición de una muestra biológica y el termociclado, e instrucciones para determinar la presencia o ausencia de un miembro del complejo *M. tuberculosis* a partir de los resultados del termociclado.

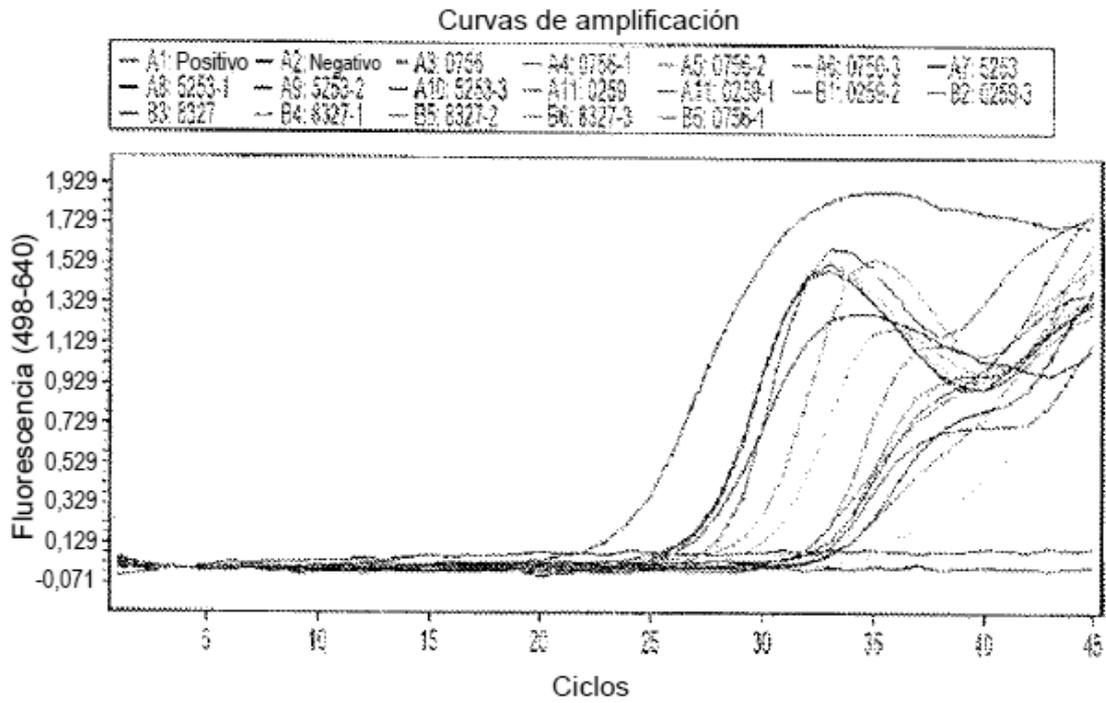


Figura 1

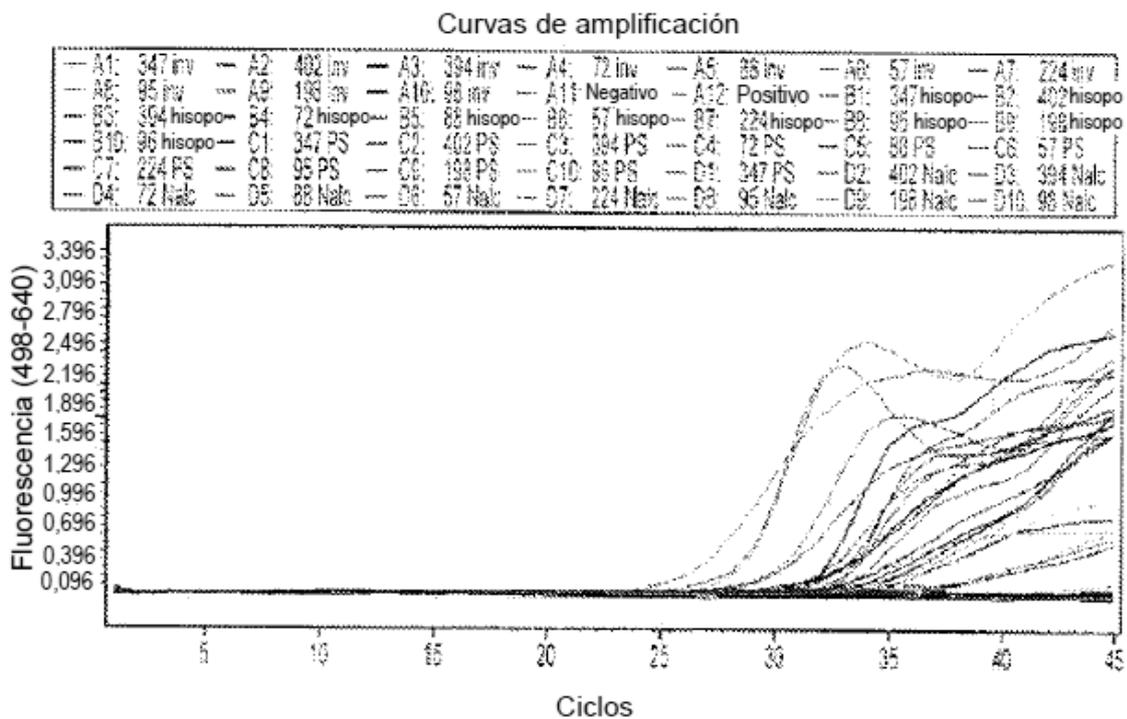


Figura 2

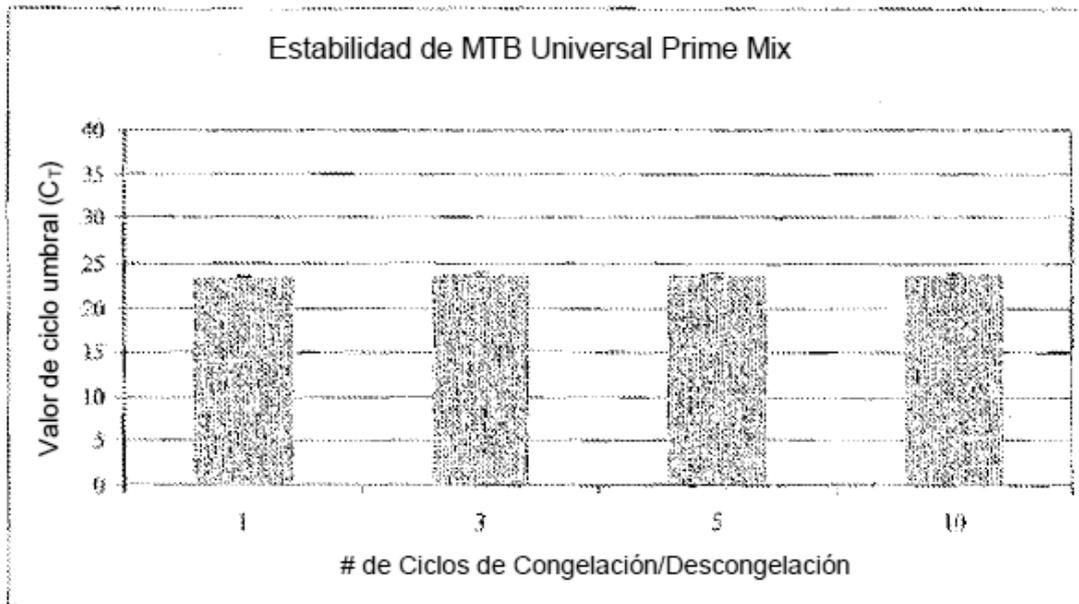


Figura 3

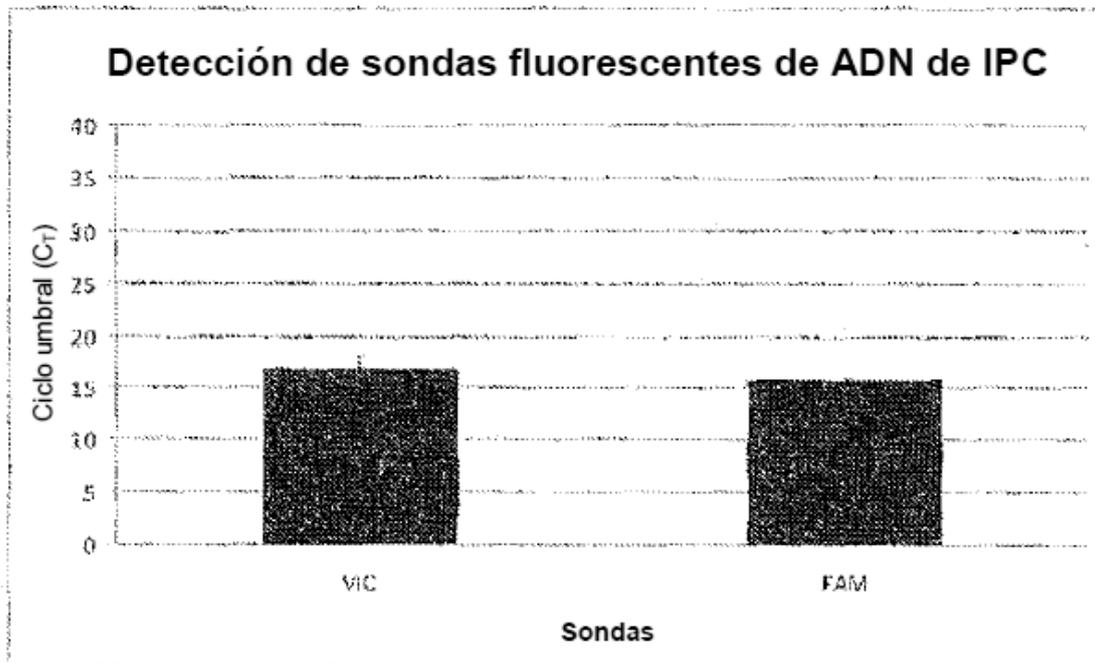


Figura 4

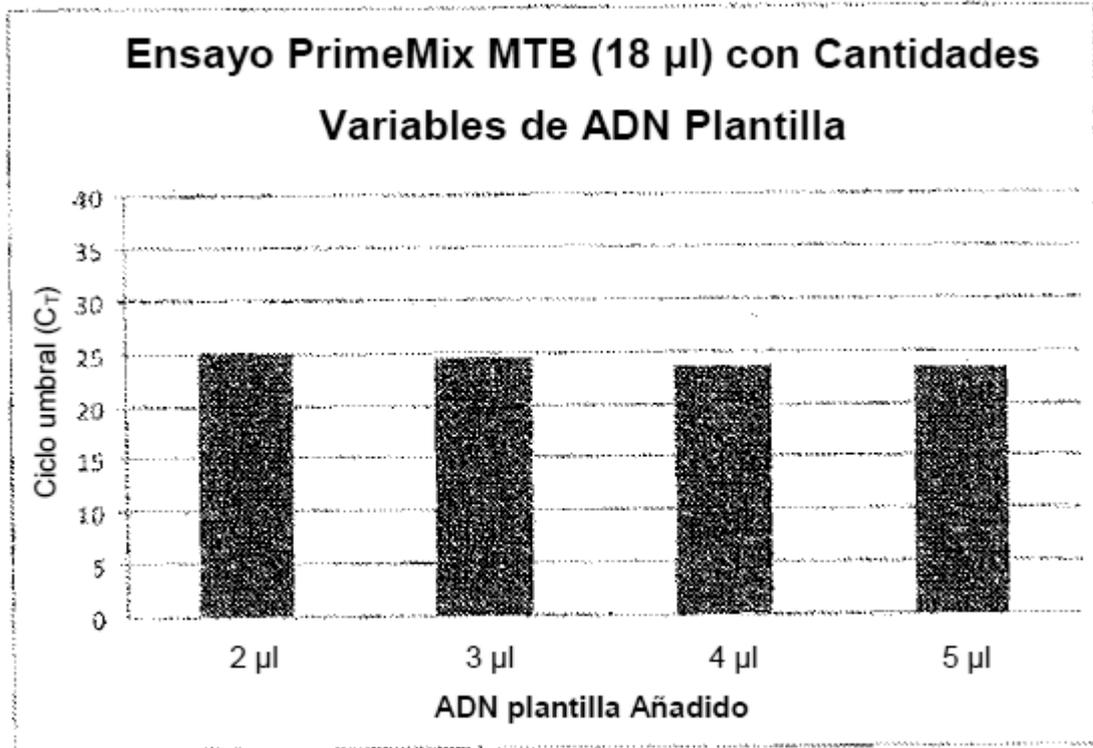


Figura 5

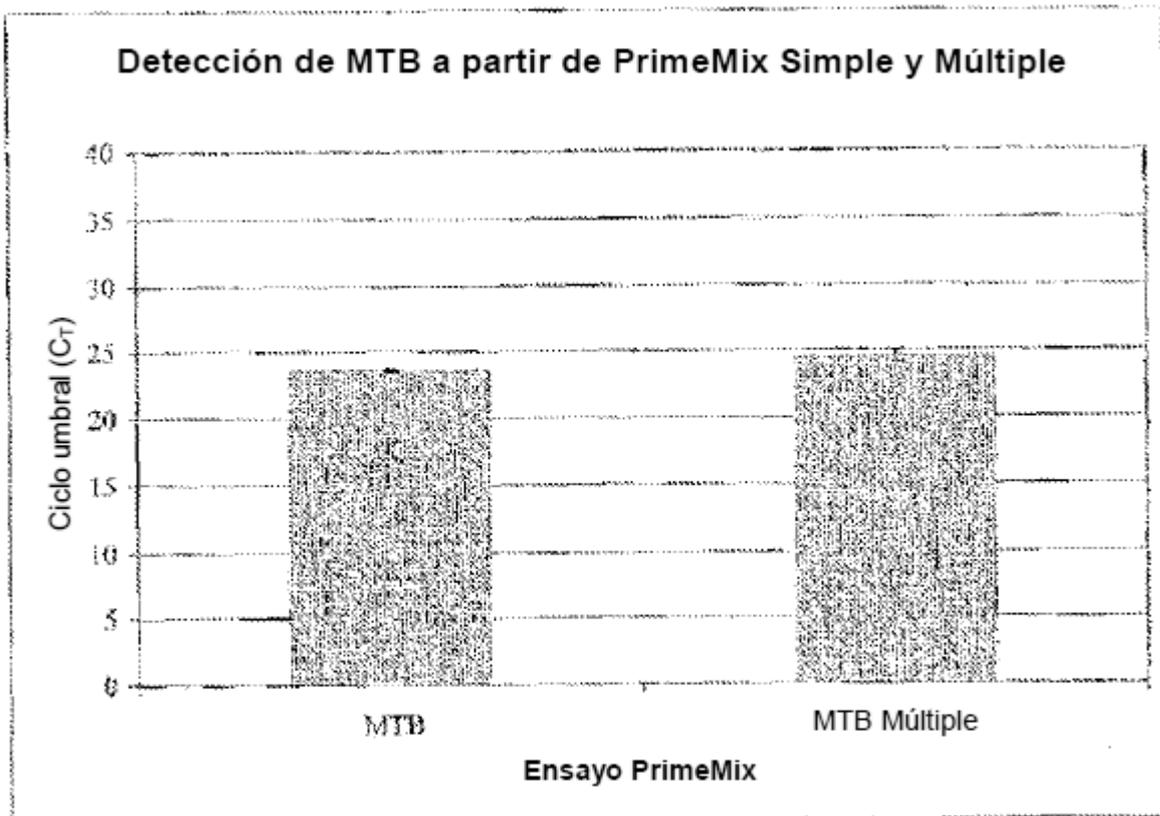


Figura 6

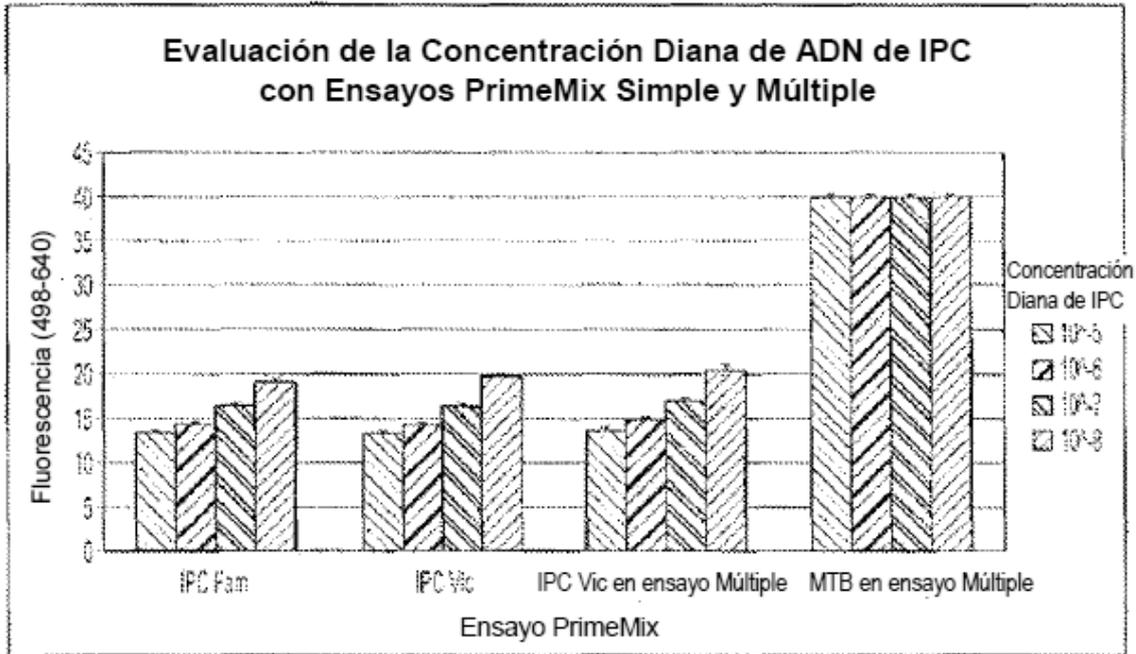


Figura 7

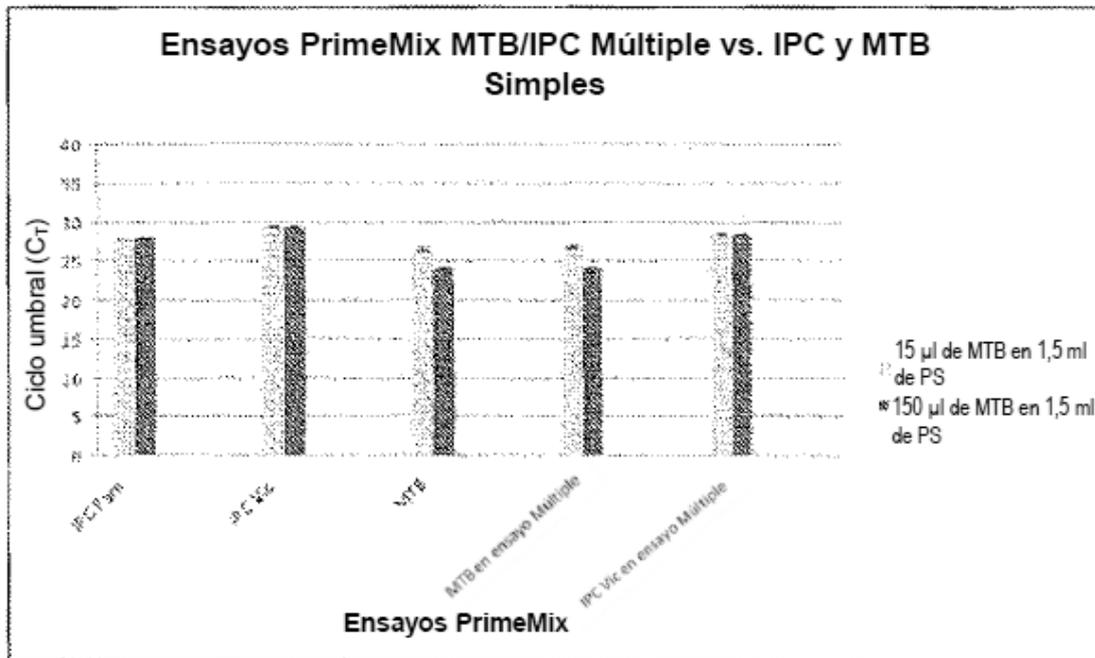


Figura 8

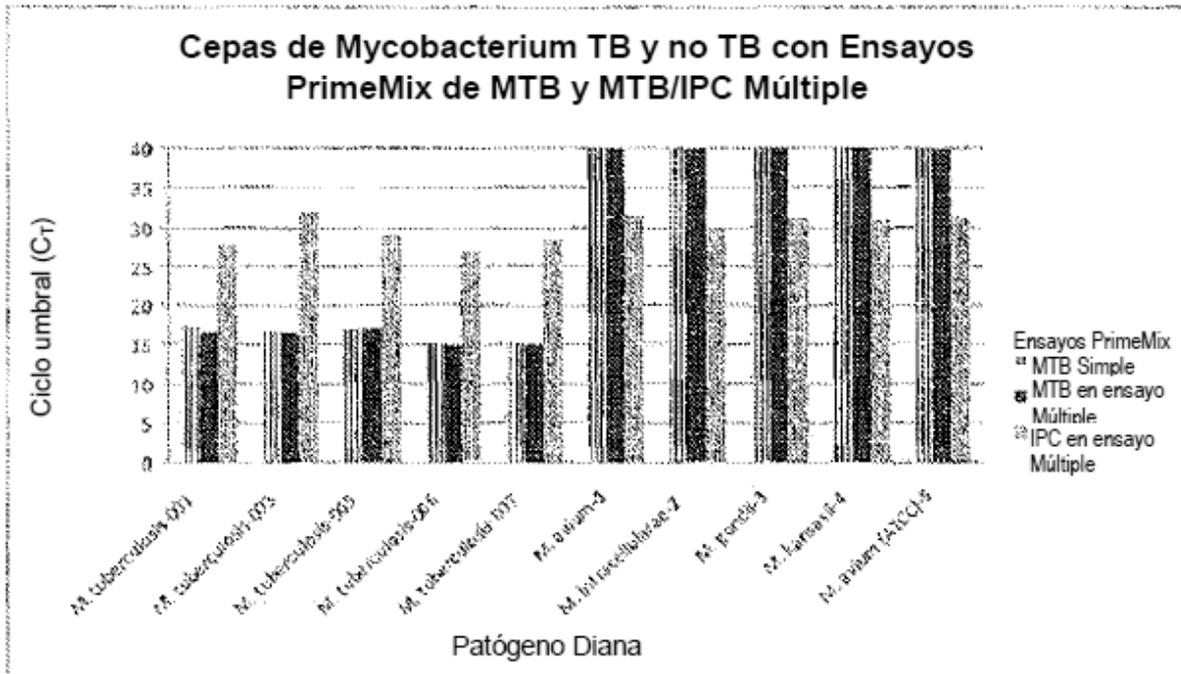


Figura 9

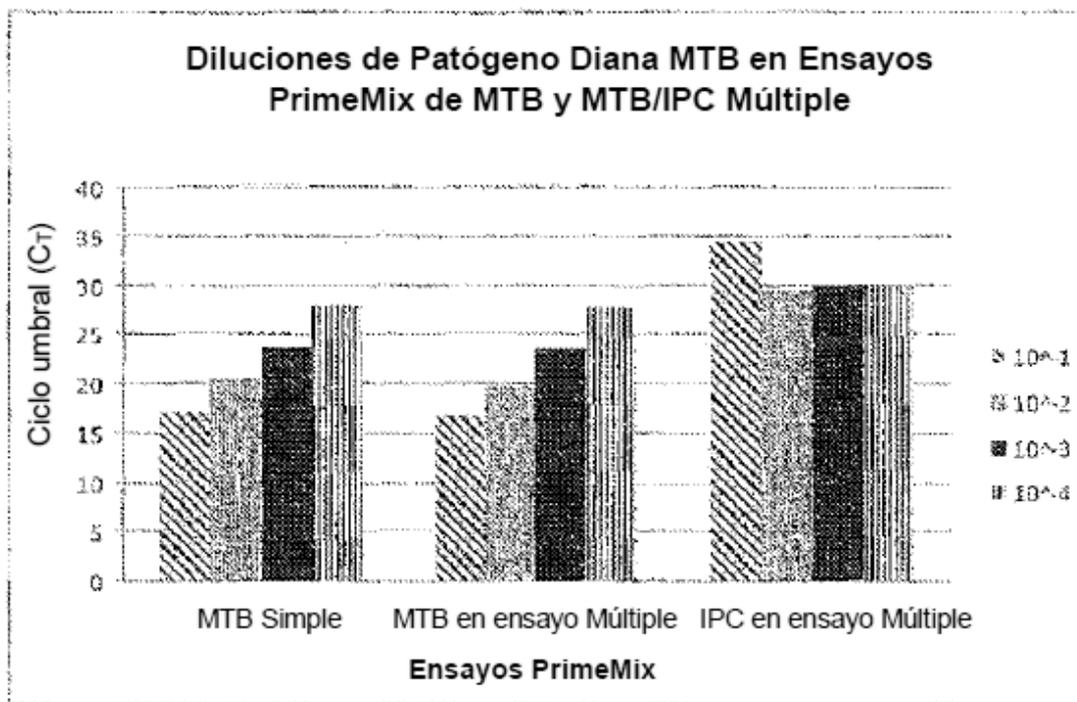


Figura 10

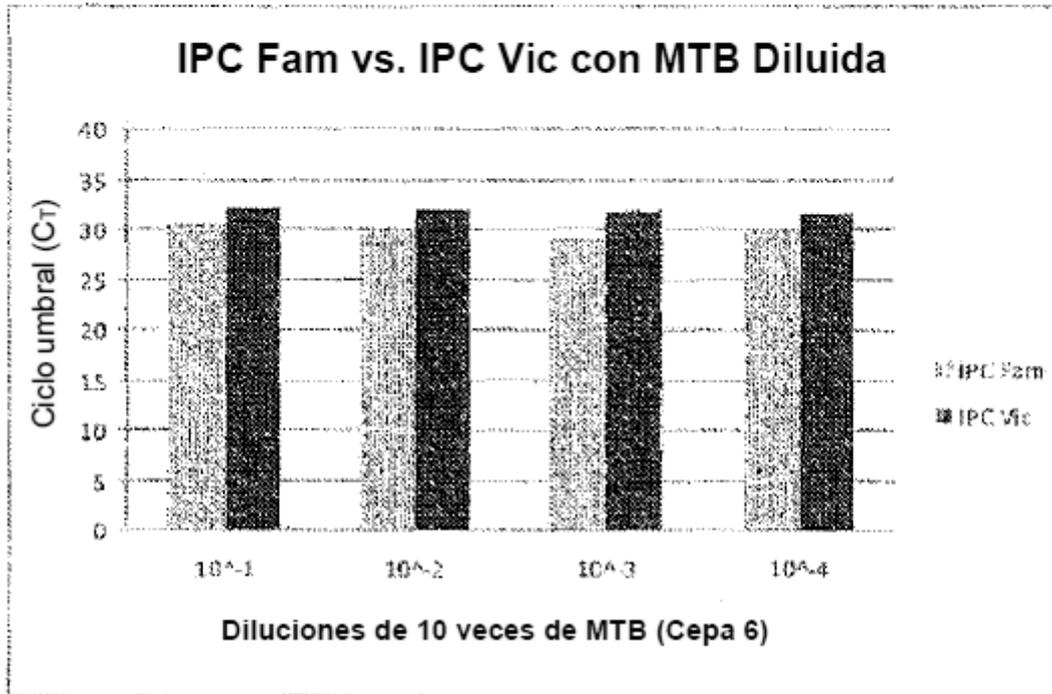
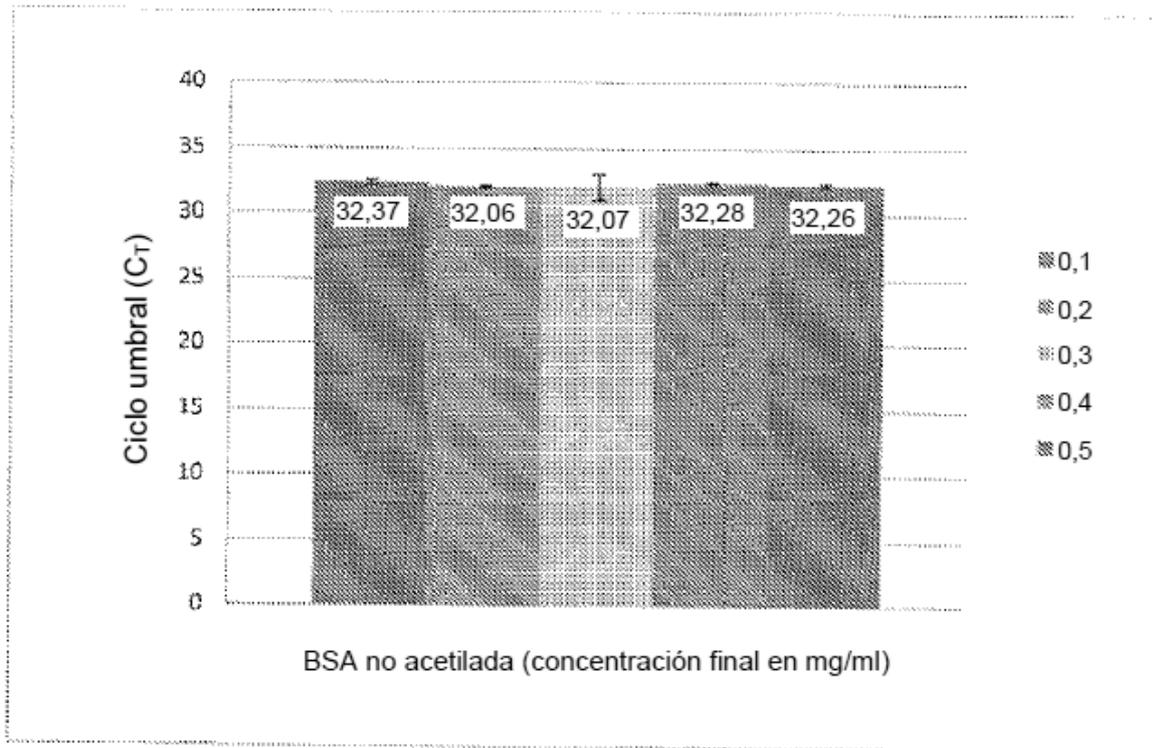


Figura 11



	BSA (no acetilada) mg/ml				
	<u>0.1</u>	<u>0.2</u>	<u>0.3</u>	<u>0.4</u>	<u>0.5</u>
	32,25	31,98	31,89	32,33	32,21
	32,58	32,09	32,25	32,42	32,17
	32,28	32,1	32,07	32,4	32,41
Prom. =	32,37	32,06	32,07	32,38	32,26
s.d. =	0,18	0,07	0,18	0,05	0,13
	(Ciclo Umbral)				

Figura 12