



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 962 636**

⑮ Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

C12N 15/09 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.07.2015 E 20215353 (2)**

⑯ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.08.2023 EP 3835430**

⑮ Título: **Métodos para la detección y análisis de mycobacterium tuberculosis**

⑯ Prioridad:

24.07.2014 US 201462028527 P

⑯ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

20.03.2024

⑯ Titular/es:

**ABBOTT MOLECULAR INC. (100.0%)
1300 East Touhy Avenue
Des Plaines, IL 60018, US**

⑯ Inventor/es:

**TANG, NING;
LECKIE, GREGOR;
PAHALAWATTA, VIHANGA;
FRANK, ANDREA y
LAMPINEN, JOHN**

⑯ Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 962 636 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

Métodos para la detección y análisis de mycobacterium tuberculosis

5 **ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN**

La mycobacterium tuberculosis (MTB) constituye una grave amenaza para la salud pública en el mundo y solo es superada por el VIH/SIDA como el mayor asesino a nivel mundial debido a un agente infeccioso individual (Warren et al, Differentiation of Mycobacterium tuberculosis complex by PCR amplification of genomic regions of difference, 2006 Jul, Int J Tuberc Lung Dis.10 (7):818-822.) Los CDC informan que en 2011, se estimaron 8,7 millones de nuevos casos de MTB (13% coinfectados con VIH); 1,4 millones de personas murieron por MTB, incluyendo casi un millón de muertes entre personas VIH negativas y 430.000 entre personas VIH positivas. La Organización Mundial de la Salud (OMS) informa que la MTB es una de las principales causas de muerte de mujeres, con 300.000 muertes entre mujeres VIH negativas y 200.000 muertes entre mujeres VIH positivas en 2011. Se encuentra entre las tres causas de muerte principales para mujeres de 15 a 44 años de edad. La MTB también es una de las principales causas de muerte de personas que viven con el VIH, provocando una cuarta parte de todas las muertes. Hubo 0,5 millones de casos estimados y 64.000 muertes entre niños en 2011. La MTB resistente a múltiples fármacos (MDR-TB) está aumentando y está presente en prácticamente todos los países evaluados. Geográficamente, la carga de MTB es más alta en Asia y África. La OMS informó que la detección general de casos de MTB todavía es inferior al 60% en países de bajos ingresos (LIC) y solo el 66% globalmente. Es decir, de una estimación de 8,7 millones de personas que enfermaron con MTB en 2011, 2,9 millones con enfermedad activa no fueron diagnosticadas y notificadas a los programas nacionales de control de MTB. Además, solo el 19% de los casos de MDR-MTB fueron diagnosticados y notificados adecuadamente. Menos de 1 de cada 20 nuevos pacientes con MTB tienen acceso a pruebas de susceptibilidad a fármacos. Debido al riesgo de propagación de MTB, el potencial para la aparición de cepas resistentes a los fármacos y la gravedad de la enfermedad en pacientes infectados con VIH-1, es extremadamente importante una prueba molecular de MTB de bajo precio, rápida y precisa. Los cultivos rutinarios llevan mucho tiempo y pueden tardar hasta seis semanas. El examen microscópico de frotis acidorresistentes es el método más rápido para la detección de micobacterias, pero es insensible y no específico.

30 **SUMARIO DE LA INVENCIÓN**

La presente divulgación composiciones y métodos útiles para la detección de MTB. En particular, en la presente se divultan kits, reactivos, mezclas de reacción y métodos que implican tales procedimientos de amplificación y detección de ácidos nucleicos, que detectan específicamente y sensiblemente MTB en muestras. Tales composiciones y métodos incluyen cebadores, sondas, conjuntos de cebadores, conjuntos de cebadores y sondas, y métodos para detectar el complejo MTB en diferentes muestras humanas como esputo, lavado alveolar bronquial (BAL) y sedimentos de N-acetil-L-cisteína (NALC)-NaOH de muestras de esputo y de BAL.

40 La invención proporciona un kit que comprende: a) los pares de cebadores de ácidos nucleicos de las SEQ ID NO: 1 y 2 y las SEQ ID NO: 3 y 4, y las sondas de las SEQ ID NO: 5 y 6; y b) por lo menos un reactivo para realizar una reacción de amplificación de ácidos nucleicos.

45 Los reactivos de polinucleótidos proporcionados en la presente como las SEQ ID NO: 1-6 se combinan en una composición (en donde la composición es un kit. En algunas realizaciones, uno o más o todos los reactivos de ácidos nucleicos comprenden una fracción detectable (por ejemplo, un marcador sintético). En algunas realizaciones, las composiciones comprenden la sonda (por ejemplo, sonda marcada) de la SEQ ID NO: 9. En algunas realizaciones, las composiciones comprenden reactivos de control interno, como las SEQ ID NO: 7-9.

50 En algunas realizaciones, el componente de polinucleótidos de la composición consiste de las combinaciones de cebadores, sondas, conjuntos de cebadores, o conjuntos de sondas descritas anteriormente. Como mezclas de la reacción, las composiciones pueden consistir de tales polinucleótidos así como de cualquier polinucleótido incluido en una muestra (Es decir, las únicas moléculas de ácidos nucleicos no de la muestra son los polinucleótidos representados por las SEQ NO: 1-9, individualmente o en combinaciones (por ejemplo, las combinaciones descritas anteriormente).

55 Los conjuntos de cebadores proporcionados en la presente comprenden dos cebadores y son útiles para la amplificación de secuencias objetivo, por ejemplo, en PCR. Las composiciones comprenden cebadores y sondas que detectan amplicones generados por los cebadores.

60 También se divultan en la presente métodos para detectar MTB en una muestra. Los métodos pueden comprender (a) formar una mezcla de la reacción que comprende reactivos de amplificación de ácido nucleico, por lo menos cebador o sonda de polinucleótidos descritos en la presente, y una muestra de prueba que potencialmente contiene por lo menos una secuencia objetivo; y (b) someter la mezcla a condiciones de amplificación para generar por lo menos una copia de una secuencia de ácidos nucleicos complementaria a la secuencia objetivo. El método puede comprender además detectar amplicones generados. La detección puede comprender (c) hibridar una sonda

con la secuencia de ácidos nucleicos complementaria a la secuencia objetivo para formar un híbrido que comprende la sonda y la secuencia de ácidos nucleicos complementaria con la secuencia objetivo; y (d) detectar, directa o indirectamente, el híbrido como una indicación de la presencia de MTB en la muestra de prueba.

5 Además, cuando la amplificación es PCR, o un proceso de amplificación de termociclado similar, el paso (b) puede repetirse varias veces para aumentar el número de copias de la secuencia objetivo.

10 De acuerdo con otro método, se detectan tanto MTB como uno o más agentes infecciosos adicionales (por ejemplo, VIH) u otras moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, secuencias humanas). Por consiguiente, en algunas realizaciones, las composiciones comprenden reactivos para detectar tales otros agentes o moléculas de ácido nucleico.

15 En algunas realizaciones, las composiciones y métodos emplean además reactivos de control o componentes del kit (por ejemplo, controles positivos, controles negativos). En algunos casos, los reactivos de control incluyen un ácido nucleico objetivo sintético. En algunos casos, los reactivos de control incluyen reactivos para detectar una secuencia de MTB, humana u otra que se espera que esté presente en una muestra. En algunas realizaciones, se selecciona un ácido nucleico objetivo de control, ya sea sintético o endógeno en una muestra, de tal manera que los cebadores de amplificación que amplifican el ácido nucleico objetivo de MTB también amplifiquen el ácido nucleico objetivo control. En algunas de tales realizaciones, una sonda que detecta el ácido nucleico objetivo de MTB o un amplicón generado a partir del mismo no detecta el objetivo de control o un amplicón generado a partir del mismo. En algunas realizaciones, se proporciona una sonda de control que detecta el ácido nucleico objetivo de control o un amplicón generado a partir del mismo pero no detecta el ácido nucleico objetivo de MTB o un amplicón generado a partir del mismo. En algunas realizaciones, se proporcionan estándares internos para cuantificación.

20 25 En algunas realizaciones, los kits, además de los reactivos tratados anteriormente, incluyen uno o más recipientes adecuados, instrucciones de uso, software (por ejemplo, software de análisis de datos), y similares. En algunas realizaciones, los kits incluyen reactivos para marcar polinucleótidos. En algunas realizaciones, uno o más componentes en el kit están en forma liofilizada.

30 35 En la presente se divultan composiciones, kits, sistemas y métodos para identificar MTB en muestras biológicas complejas como esputo o lavado broncoalveolar y sedimentos de los mismos. En algunas realizaciones, las composiciones y métodos proporcionan reactivos de inactivación, y métodos de detección en tiempo real de sonda única o sonda múltiple que son capaces de aislar e identificar MTB de forma específica y con precisión.

40 45 La presente divulgación proporciona una composición que comprende: por lo menos pares de cebadores de las SEQ ID NO: 1 y 2, las SEQ ID NO: 3 y 4, y las sondas de las SEQ ID NO: 5 y 6. En algunas realizaciones, la composición comprende las SEQ ID NO: 1-4 y 7-8. En algunas realizaciones, la composición comprende además la sonda de la SEQ ID NO: 9.

50 55 Realizaciones adicionales proporcionan una composición, que comprende cada uno de los ácidos nucleicos de las SEQ ID NO: 1-9. En algunas realizaciones, la composición anterior incluye además una o más secuencias de ácidos nucleicos seleccionadas de las SEQ ID NO: 10-36.

60 65 La invención proporciona un kit que comprende: a) cualquiera de las composiciones anteriormente mencionadas, y b) por lo menos un reactivo para realizar una reacción de amplificación de ácidos nucleicos (por ejemplo, una polimerasa de ácidos nucleicos; una pluralidad de dNTPS, un tampón o un reactivo de inactivación). En algunas realizaciones, el reactivo de inactivación comprende agua, un detergente, un alcohol y NaOH (por ejemplo, isopropanol, hidróxido de sodio, TWEEN-20 y agua).

70 75 En la presente se divulga una mezcla de la reacción, que comprende: la composición de la invención o ácidos nucleicos hibridados con un ácido nucleico de mycobacterium tuberculosis (MTB). En algunas realizaciones, el ácido nucleico objetivo de MTB es uno o más (por ejemplo, ambos) de la secuencia de inserción (IS) 6110 y el Antígeno de Proteína B (PAB).

80 85 En la presente se divulga un método para identificar un ácido nucleico de MTB en una muestra biológica, que comprende: a) poner en contacto una muestra biológica de un sujeto con cualquiera de los cebadores o sondas de ácidos nucleicos mencionados anteriormente, y b) detectar directa o indirectamente la unión de los cebadores o sondas de ácidos nucleicos con el ácido nucleico de MTB. En algunas realizaciones, el método comprende además el paso de c) determinar la presencia de MTB en la muestra cuando se detecta la unión. En algunos casos, la detección se realiza mediante detección por PCR en tiempo real. En algunos casos, el método comprende además el paso de inactivar la MTB en la muestra usando el tampón de inactivación. En algunos casos, la muestra es esputo, lavado broncoalveolar [BAL] o sedimentos de N-acetil-L-cisteína [NALC] de esputo y BAL. En algunos casos, el método comprende el paso de extraer ADN de la muestra después de la inactivación.

90 95 Un método para detectar un ácido nucleico de MTB en una muestra biológica puede comprender: a)

5 inactivar la muestra biológica con un reactivo de inactivación para generar una muestra inactivada; b) extraer ADN de la muestra inactivada; c) poner en contacto el ADN con uno o más pares de cebadores y una o más sondas de ácidos nucleicos; d) realizar un ensayo de amplificación para amplificar uno o más objetivos de ácido nucleico de MTB; y e) identificar la presencia de los objetivos en la muestra.

10 5 Un método para detectar un ácido nucleico de MTB en una muestra biológica puede comprender: a) inactivar dicha muestra biológica con un reactivo de inactivación que comprende isopropanol, hidróxido de sodio, TWEEN-20, y agua para generar una muestra inactivada; b) extraer ADN de la muestra inactivada; c) poner en contacto el ADN con uno o más pares de cebadores seleccionados de las SEQ ID NO: 1 y 2 y las SEQ ID NO: 3 y 4; y una o más sondas de ácidos nucleicos seleccionadas de las SEQ ID NO: 5 y 6; d) realizar un ensayo de amplificación para amplificar uno o más objetivos de ácido nucleico de MTB; y e) identificar la presencia de los objetivos en dicha muestra.

15 10 Un método para detectar un ácido nucleico de MTB en una muestra biológica puede comprender: a) inactivar dicha muestra biológica con un reactivo de inactivación para generar una muestra inactivada; b) extraer ADN de la muestra inactivada; c) poner en contacto el ADN con uno o más pares de cebadores seleccionados de las SEQ ID NO: 1 y 2 y las SEQ ID NO: 3 y 4; y una o más sondas de ácidos nucleicos seleccionadas de las SEQ ID NO: 5 y 6; d) realizar un ensayo de amplificación para amplificar uno o más objetivos de ácido nucleico de MTB; y e) identificar la presencia de los objetivos en la muestra.

20 15 Un método para detectar un ácido nucleico de MTB en una muestra biológica puede comprender: a) inactivar la muestra biológica con un reactivo de inactivación para generar una muestra inactivada; b) extraer ADN de la muestra inactivada; c) poner en contacto el ADN con uno o más pares de cebadores seleccionados de las SEQ ID NO: 1 y 2 y las SEQ ID NO: 3 y 4; y una o más sondas de ácidos nucleicos seleccionadas de las SEQ ID NO: 5 y 6; d) realizar un ensayo de PCR en tiempo real para amplificar uno o más objetivos de ácido nucleico de MTB; y e) identificar la presencia de los objetivos en la muestra.

25 20 Un método para detectar un ácido nucleico de MTB en una muestra biológica puede comprender: a) inactivar la muestra biológica con un reactivo de inactivación para generar una muestra inactivada; b) extraer ADN de la muestra inactivada; c) poner en contacto dicho ADN con uno o más pares de cebadores seleccionados de las SEQ ID NO: 1 y 2 y las SEQ ID NO: 3 y 4; y una o más sondas de ácidos nucleicos seleccionadas de las SEQ ID NO: 5 y 6; d) realizar un ensayo de amplificación para amplificar uno o más objetivos de ácido nucleico de MTB seleccionados de IS6110 y PAB; y e) identificar la presencia de los objetivos en la muestra.

30 25 Un método para detectar un ácido nucleico de MTB en una muestra biológica puede comprender: a) inactivar la muestra biológica con un reactivo de inactivación para generar una muestra inactivada; b) extraer ADN de la muestra inactivada; c) poner en contacto el ADN con los pares de cebadores de las SEQ ID NO: 1 y 2 y las SEQ ID NO: 3 y 4; y las sondas de ácidos nucleicos de las SEQ ID NO: 5 y 6; d) realizar un ensayo de amplificación para amplificar uno o más objetivos de ácido nucleico de MTB; y e) identificar la presencia de los objetivos en la muestra.

35 30 Un método para detectar un ácido nucleico de MTB en una muestra biológica puede comprender: a) inactivar la muestra biológica con un reactivo de inactivación que comprende isopropanol, hidróxido de sodio, TWEEN-20 y agua para generar una muestra inactivada; b) extraer ADN de la muestra inactivada; c) poner en contacto el ADN con los pares de cebadores de las SEQ ID NO: 1 y 2 y las SEQ ID NO: 3 y 4; y las sondas de ácidos nucleicos de las SEQ ID NO: 5 y 6; d) realizar un ensayo de amplificación para amplificar uno o más objetivos de ácido nucleico de MTB; y e) identificar la presencia de los objetivos en la muestra.

40 35 En la presente se describen realizaciones adicionales.

50 DESCRIPCIÓN DE FIGURAS

45 50 La Figura 1 muestra un diagrama de flujo de trabajo del ensayo de MTB en algunas realizaciones de la tecnología proporcionada en la presente.

55 45 La Figura 2 muestra datos de la detección de 46 aislados de MTB filogenéticamente y geográficamente diversos de MTB.

La Figura 3 muestra un diagrama de flujo de trabajo del ensayo de MTB para la preparación de muestras.

60 55 La Figura 4 muestra los valores del número de ciclos medios determinados cuando se probaron los ADN genómicos complejos de MTB para determinar la inclusividad del ensayo.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

65 60 En la presente se proporcionan composiciones y métodos útiles para la detección de MTB. En particular, en la presente se proporcionan kits, reactivos, mezclas de la reacción, y métodos que implican tales procedimientos de amplificación y detección de ácidos nucleicos, que detectan MTB de manera específica y con sensibilidad en

muestras.

En la presente se proporcionan polinucleótidos que hibridan específicamente con una secuencia de ácidos nucleicos, o complemento de la misma, de MTB. Estos polinucleótidos encuentran uso para amplificar MTB, si está presente en una muestra, y para detectar específicamente la presencia de MTB. Los polinucleótidos ejemplares se describen, por ejemplo, por las SEQ ID NO: 1-9 o 10-36.

Los ensayos descritos en la presente utilizan múltiples (por ejemplo, dos) diferentes conjuntos de cebadores/sondas específicos de MTB. Por ejemplo, en algunos casos, un primer conjunto está diseñado para detectar el elemento de inserción de copias múltiples, IS6110 (Thierry D, et al., Nucleic Acids Res 1990;18: 188), y el segundo conjunto, el gen de copia única, PAB (Anderson AB, Hansen EB, Infect Immun 1989;57:2481-2488). Debido a que ha habido informes de cepas de MTB que carecen de IS6110 (Mathema B, et al., Clinical Microbiology Reviews 2006; 19: 658-685), o que tienen una delección en el gen PAB (Gilpin CM, et al., J Clin Microbiol 2002; 40: 2305-2307), el uso de ambos objetivos minimiza el riesgo de resultados falsos negativos. Los experimentos descritos en la presente demostraron que la estrategia de objetivo doble da como resultado la detección de ADN genómico de MTB con alta fiabilidad. Sharma et al., Indian J Med Microbiol 2013; 31(4):370-373) evalúa un RT-PCR multiplex que usa objetivos IS61110, PAB y MPB64 para el diagnóstico de la tuberculosis.

La pared celular micobacteriana es resistente a las técnicas de lisis celular convencionales debido a la estructura compleja de las moléculas y los polisacáridos lipófilos. Por tanto, los ensayos de detección de MTB utilizan un método de purificación de micropartículas magnéticas de tiocianato de guanidinio con temperaturas de incubación optimizadas y condiciones de mezclado para lisis de células de TB y liberación de ADN genómico. Los experimentos realizados durante el desarrollo de las realizaciones de los ensayos descritos en la presente mostraron que el método de extracción de ADN de muestra es comparable en eficacia al batido mecánico de perlas para lisis de células de TB.

Experimentos adicionales demostraron todos los 66 ADN complejos de MTB (incluyendo ocho especies complejas de MTB diferentes). La fiabilidad del ensayo se evaluó de cuatro maneras. Primero, se evaluó la especificidad del ensayo probando 80 reactores cruzados potencialmente diferentes. Ninguno de los posibles reactores cruzados fue detectado. En segundo lugar, se realizó una evaluación de transferencia en la que se procesaron muestras de MTB altamente positivas junto con muestras negativas para determinar si se detectaron falsos positivos o transferencia en las muestras negativas. No se observaron falsos positivos. Tercero, se probaron varias sustancias potencialmente interferentes para su impacto sobre el rendimiento del ensayo. No se observó interferencia, excepto con el 8,3% y el 5,0% de moco bovino, donde se observó interferencia. Esta interferencia se eliminó cuando la concentración de moco se redujo a ≤2,5%. Cuando se analizaron especímenes clínicos, la tasa de especímenes con resultados de Cl inválidos fue del 0,3%, lo que demuestra que los métodos de preparación de muestras descritos en la presente eliminaron los inhibidores de PCR de manera eficaz. Esto proporciona evidencia de la solidez del protocolo e indica que el impacto de la interferencia provocada por el moco bovino probablemente no sea significativo para el ensayo. Finalmente, se realizó un estudio de reproducibilidad en el que múltiples usuarios usaron múltiples sistemas de instrumentos m2000, o preparación manual de muestras, para probar paneles positivos bajos (tres veces el LOD) y negativos. Se observó una reproducibilidad del 100%. Estos datos respaldan la naturaleza robusta del ensayo cuando se usa en estudios analíticos y pruebas de muestras clínicas.

La utilidad clínica de los ensayos de detección de MTB se evaluó probando especímenes de esputo y NALC recogidas de pacientes que se sospechaba que tenían TB en cinco países usando tanto muestras archivadas como muestras recolectadas prospectivamente. La sensibilidad general del ensayo fue del 93%, mientras que fue del 99% en muestras positivas de cultivo con frotis positivo y del 81% en muestras positivas de cultivo con frotis negativo. La especificidad fue del 97%. Los resultados de la prueba de especificidad analítica y la prueba de muestra de esputo de población no sospechosa de TB en los Estados Unidos mostraron todos una especificidad del 100%. La especificidad clínica se determinó en base a la comparación de los resultados del ensayo con los resultados del cultivo.

Las realizaciones de la tecnología descrita en la presente proporcionan detección de MTB automatizada de alto rendimiento con alta sensibilidad y especificidad. En comparación con los ensayos de cultivo convencionales, la tecnología mejora significativamente el diagnóstico rápido de TB al permitir la detección directa de micobacterias en especímenes clínicos. Los ensayos proporcionan una sensibilidad y especificidad superiores en comparación con el examen microscópico de frotis acidorresistente convencional. Un vacío con los ensayos diagnósticos de MTB actuales es la falta de sensibilidad en las poblaciones de cultivo positivo y frotis negativo (con baja concentración de TB en las muestras). Las realizaciones de la tecnología proporcionada en la presente llenan ese vacío. Los ensayos divulgados en la presente son robustos con una tasa de inhibición muy baja, incluso si es difícil trabajar con muestras de esputo. Esto reduce el tiempo requerido para repetir las pruebas de muestras no válidas. En ciertos casos, se interroga a un objetivo de MTB multicopia, proporcionando una mayor sensibilidad objetivo y menos posibilidades de resultados falsos negativos en el ensayo provocados por mutaciones/delecciones en la región objetivo. Los casos proporcionan además métodos de inactivación de MTB únicos y eficaces.

5 El término "hibridar específicamente" como se usa en la presente se refiere a la capacidad de un ácido nucleico para unirse detectable y específicamente a un segundo ácido nucleico. Los polinucleótidos se hibridan específicamente con cadenas de ácido nucleico objetivo en condiciones de hibridación y lavado que minimizan cantidades apreciables de unión detectable con ácidos nucleicos no específicos. Las condiciones estrictas que

5 pueden usarse para lograr la hibridación específica se conocen en la técnica.

10 Una "secuencia objetivo" o "secuencia de ácidos nucleicos objetivo", como se usa en la presente, significa una secuencia de ácidos nucleicos de MTB u otra secuencia a detectar (por ejemplo, VIH), o un complemento de la misma, que se amplifica, detecta o tanto se amplifica como se detecta usando uno o más de los polinucleótidos proporcionados en la presente. Adicionalmente, aunque el término secuencia objetivo refiere algunas veces a una secuencia de ácidos nucleicos de cadena doble, los expertos en la técnica reconocerán que la secuencia objetivo también puede ser de cadena sencilla. En los casos en que el objetivo es de cadena doble, las secuencias de cebador polinucleotídico amplifican preferiblemente ambas cadenas de la secuencia objetivo. Se puede seleccionar una secuencia objetivo que sea más o menos específica para un organismo particular. Por ejemplo, la secuencia objetivo puede ser específica para un género entero, para más de un género, para una especie o subespecie, serogrupo, auxotipo, serotipo, cepa, aislado u otro subconjunto de organismos

15 20 El término "muestra de prueba", como se usa en la presente, significa una muestra tomada de un organismo, fluido biológico, muestra ambiental u otra muestra que se sospecha que contiene o contiene potencialmente una secuencia objetivo de MTB. La muestra de prueba se puede tomar de cualquier fuente biológica, como por ejemplo, tejido, sangre, saliva, esputa, sedimentos de N-acetil-L-cisteína (NALC)-NaOH de esputo, moco, lavado bronquio alveolar (BAL), sudor, orina, torundas uretrales, torundas cervicales, torundas urogenitales o anales, torundas conjuntivales, fluido de lentes oculares, fluido cefalorraquídeo, leche, fluido ascítico, fluido sinovial, fluido peritoneal, fluido amniótico, caldos de fermentación, cultivos celulares, mezclas de reacciones químicas y similares.

25 30 La muestra de prueba puede usarse (i) directamente como se obtiene de la fuente o (ii) después de un tratamiento previo para modificar el carácter de la muestra. Por tanto, la muestra de prueba puede pre-tratarse antes del uso, mediante, por ejemplo, preparación de plasma o suero de la sangre, desorganizando células o partículas virales, preparando líquidos a partir de materiales sólidos, diluyendo fluidos viscosos, filtrando líquidos, destilando líquidos, concentrando líquidos, inactivando componentes interferentes, añadiendo reactivos, purificando ácidos nucleicos, y similares.

35 40 El término "marcador" como se usa en la presente significa una molécula o fracción que tiene una propiedad o característica que es capaz de detección y, opcionalmente, de cuantificación. Un marcador puede ser detectable directamente, como con, por ejemplo (y sin limitación), radioisótopos, fluoróforos, quimioluminóforos, enzimas, partículas coloidales, micropartículas fluorescentes y similares; o un marcador puede ser detectable indirectamente, como con, por ejemplo, miembros de unión específicos. Se entenderá que los marcadores detectables directamente pueden requerir componentes adicionales como, por ejemplo, sustratos, reactivos de activación, fracciones de neutralización, luz y similares para permitir la detección y/o cuantificación del marcador. Cuando se usan marcadores detectables indirectamente, se usan típicamente en combinación con un "conjugado".

45 50 Un conjugado es típicamente un miembro de unión específico que se ha unido o acoplado a una molécula detectable directamente. Las químicas de acoplamiento para sintetizar un conjugado son bien conocidas en la técnica y pueden incluir, por ejemplo, cualquier medio químico y/o medio físico que no destruya la propiedad de unión específica del miembro de unión específico o la propiedad detectable del marcador. Como se usa en la presente, "miembro de unión específico" significa un miembro de un par de unión, por ejemplo, dos moléculas diferentes en las que una de las moléculas a través de, por ejemplo, medios químicos o físicos se une específicamente a la otra molécula. Además de los pares de unión específica de antígeno y anticuerpo, otros pares de unión específica incluyen, pero no están limitados a, avidina y biotina; haptenos y anticuerpos específicos para haptenos; secuencias de nucleótidos complementarias; cofactores o sustratos enzimáticos y enzimas; y similares.

55 60 Un polinucleótido es un polímero de ácido nucleico de ácido ribonucleico (ARN), ácido desoxirribonucleico (ADN), ARN o ADN modificado, o miméticos de ARN o ADN (como, sin limitación, APN) y derivados de los mismos, y homólogos de los mismos. Por tanto, los polinucleótidos incluyen polímeros compuestos de nucleobases de origen natural, azúcares y enlaces internucleósidos (estructura principal) covalentes, así como polímeros que tienen porciones de origen no natural que funcionan de manera similar. Tales polímeros de ácidos nucleicos modificados o sustituidos son bien conocidos en la técnica y para los propósitos de la presente invención, son referidos como "análogos". Para facilitar la preparación y la familiaridad de los expertos en la técnica, los polinucleótidos son preferiblemente polímeros modificados o no modificados de ácido desoxirribonucleico o ácido ribonucleico.

65 70 Los análogos de polinucleótidos que son útiles incluyen polímeros con estructuras principales modificadas o enlaces internucleósidos no naturales. Las estructuras principales modificadas incluyen aquellas que retienen un átomo de fósforo en la estructura principal como fosforotioatos, fosforotioatos quirales, fosforoditioatos, fosfotriésteres, aminoalquilfosfotriésteres, fosfonatos de metilo y otros de alquilo, así como aquellos que ya no tienen un átomo de fósforo, como estructuras principales formadas por enlaces internucleosídicos de alquilo o de cicloalquilo de cadena corta, heteroátomos mixtos y enlaces internucleosídicos de alquilo o cicloalquilo, o uno o más enlaces internucleósidos heteroatómicos o heterocíclicos de cadena corta. Un ejemplo de dicha estructura principal

que no contiene fósforo es un enlace morfolino (ver, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos Nº. 5.185.444, 5.034.506 y 5.142.047) Los polímeros de ácido nucleico modificados (análogos) pueden contener una o más fracciones de azúcar modificada. Por ejemplo, las fracciones de azúcar pueden modificarse mediante sustitución en la posición 2' con un grupo 2-metoxietoxi (2-MOE) (ver, por ejemplo, Martin et al., (1995) *Helv. Chim. Acta*, 78:486-504).

Las realizaciones también contemplan análogos que son miméticos de ARN o ADN, en los que tanto el azúcar como el enlace internucleosídico de las unidades de nucleótidos se reemplazan con grupos nuevos. En estos miméticos, las unidades base se mantienen para la hibridación con la secuencia objetivo. Un ejemplo de tal mimético, que se ha demostrado que tiene excelentes propiedades de hibridación, es un ácido peptidonucleico (APN) (Nielsen et al., (1991) *Science*, 254:1497-1500; Solicitud de Patente Internacional WO 92/20702) En los compuestos de APN, la estructura principal de azúcar de un oligonucleótido se reemplaza con una estructura principal que contiene amida, por ejemplo, una estructura principal de aminoetilglicina. Las nucleobases se retienen y se unen directa o indirectamente a los átomos de aza-nitrógeno de la porción amida de la estructura principal.

Los polinucleótidos contemplados pueden incluir además derivados en los que la molécula de ácido nucleico se ha modificado covalentemente por sustitución, medios químicos, enzimáticos u otro medio apropiado con un fracción distinta de un nucleótido de origen natural, por ejemplo con una fracción que funciona como un marcador, como se describe en la presente.

La presente invención abarca además homólogos de los polinucleótidos que tienen secuencias de ácidos nucleicos establecidas en las SEQ ID NO: 7-9 o 10-36. Los homólogos son ácidos nucleicos que tienen por lo menos una alteración en la secuencia principal expuesta en cualquiera de las SEQ ID NO: 7-9 o 10-36, que no destruye la capacidad del polinucleótido para hibridar específicamente con una secuencia objetivo, como se ha descrito anteriormente. Por consiguiente, se puede alterar una secuencia principal, por ejemplo, mediante la inserción, adición, delección o sustitución de uno o más de los nucleótidos de, por ejemplo, las SEQ ID NO: 7-9 o 10-36. Por tanto, los homólogos que son fragmentos de una secuencia divulgada en las SEQ ID NO: 7-9 o 10-36 pueden tener una secuencia consecutiva de por lo menos aproximadamente 7, 10, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 20, 21, 22, 23 o más nucleótidos de las secuencias de ácidos nucleicos de las SEQ ID NO: 7-9 o 10-36, y mantendrán la capacidad de hibridar específicamente con una secuencia objetivo, como se ha descrito anteriormente. Normalmente, los homólogos tendrán una secuencia de ácidos nucleicos que tiene por lo menos aproximadamente un 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90% o 95% de identidad de secuencia de ácidos nucleicos con una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en las SEQ ID NO: 7-9 o 10-36. La identidad con respecto a tales secuencias se define en la presente como el porcentaje de nucleótidos en la secuencia candidata que son idénticos a los polinucleótidos conocidos después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad. No se entenderá que las delecciones, extensiones o inserciones terminales (5' o 3') o internas en la secuencia de nucleótidos afectan a la identidad.

En algunas realizaciones, los polinucleótidos pueden comprender cebadores y sondas que se hibridan específicamente con una secuencia objetivo de MTB, por ejemplo, las moléculas de ácido nucleico que tienen cualquiera de las secuencias de ácidos nucleicos expuestas en las SEQ ID NO: 7-9 o 10-36, incluyendo análogos y/o derivados de dichas secuencias de ácidos nucleicos, y homólogos de los mismos, que pueden hibridar específicamente con una secuencia objetivo de MTB. Como se describe a continuación, los polinucleótidos encuentran uso como cebadores y/o sondas para amplificar o detectar MTB.

Los polinucleótidos pueden prepararse mediante una variedad de técnicas. Por ejemplo, los polinucleótidos pueden prepararse usando síntesis en fase sólida usando equipo comercialmente disponible, como el disponible de Applied Biosystems USA Inc. (Foster City, Calif.), DuPont, (Wilmington, Del.) o Milligen (Bedford, Mass.). Los polinucleótidos modificados, como los fosforotioatos y los derivados alquilados, también pueden prepararse fácilmente (ver, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos Nº 5.464.746; 5.424.414; y 4.948.882)

Los polinucleótidos pueden emplearse directamente como sondas para la detección, o cuantificación, o ambas, de ácidos nucleicos de MTB en una muestra de prueba. La muestra de prueba se pone en contacto con por lo menos uno de los polinucleótidos en condiciones de hibridación adecuadas y luego se detecta la hibridación entre la secuencia objetivo y por lo menos uno de los polinucleótidos. La detección puede ser directa o indirecta. Un híbrido entre la sonda y el objetivo puede detectarse directamente. El híbrido puede detectarse indirectamente, por ejemplo, detectando subproductos de la reacción generados por una reacción enzimática que se produce en presencia de un dúplex entre una sonda y el objetivo de MTB.

Los polinucleótidos pueden incorporar uno o más marcadores detectables. Los marcadores detectables son moléculas o fracciones que tienen una propiedad o característica que puede detectarse directa o indirectamente y se eligen de manera tal que la capacidad del polinucleótido para hibridar con su secuencia objetivo no se vea afectada adversamente.

Los marcadores de detección tienen la misma definición que los "marcadores" definidos anteriormente y los

"marcadores de captura" se usan típicamente para separar los productos de extensión, y las sondas asociadas con cualquiera de tales productos, de otros reactivos de amplificación. Los miembros de unión específicos (como se ha definido anteriormente) son muy adecuados para este propósito. Además, las sondas usadas de acuerdo con este método pueden bloquearse en sus extremos 3' para que no se extiendan bajo condiciones de hibridación. Los métodos para evitar la extensión de una sonda son bien conocidos y son una cuestión de elección para un experto en la técnica.

En los casos en que se emplean marcadores para detectar productos amplificados con cebadores, las secuencias de cebador pueden marcarse opcionalmente con un marcador de captura o un marcador de detección.

10 En algunas realizaciones, el cebador comprende una porción 3' que se hibrida con un ácido nucleico objetivo de MTB y una porción 5' que introduce una secuencia no de MTB para productos de extensión generados a partir de ella. Tales porciones 5' pueden incluir una secuencia de marcador sintética para su uso, por ejemplo, en tecnologías de secuenciación de próxima generación.

15 Se usa una sonda para hibridar con el producto de extensión o amplicón generado por las secuencias del cebador, y típicamente hibrida con una secuencia que no incluye las secuencias del cebador. De manera similar a la secuencia del cebador, la secuencia de la sonda también puede marcarse con un marcador de captura o un marcador de detección con la advertencia de que, en algunas realizaciones, cuando el cebador se marca con un marcador de captura, la sonda se marca con un marcador de detección, y viceversa. Tras la formación de los 20 híbridos de secuencia/sonda de las copias, los marcadores diferenciales (es decir, marcadores de captura y detección) en la secuencia de copia y la secuencia de sonda pueden usarse para separar y detectar tales híbridos.

25 Los polinucleótidos también son adecuados para su uso como sondas de captura en ensayos de tipo sandwich. Brevemente, la sonda de captura de polinucleótidos se une a un soporte sólido y se pone en contacto con una muestra de prueba en condiciones de hibridación adecuadas de tal manera que se forma un híbrido sonda:objetivo entre la sonda de captura y cualquier ácido nucleico objetivo presente en la muestra de prueba. Despues de uno o más pasos de lavado apropiados, se detecta el híbrido sonda:objetivo, generalmente por medio 30 de una segunda sonda de "divulgación" o por un anticuerpo específico que reconoce la molécula híbrida.

35 Las realizaciones también contemplan el uso de los polinucleótidos en ensayos de hibridación de ácidos nucleicos modificados. Por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Nº 5.627.030 divulga un método para amplificar la señal de detección en un ensayo de hibridación de ácidos nucleicos. En el ensayo divulgado, una primera secuencia de sonda de polinucleótidos se hibrida bajo condiciones adecuadas con una secuencia objetivo, el híbrido sonda:objetivo posteriormente se inmunocaptura y se inmoviliza. Una segunda sonda de polinucleótidos que 40 contiene muchas unidades de secuencia de repetición se hibrida luego con el componente de sonda del híbrido sonda:objetivo. La detección se logra mediante la hibridación de muchas sondas de secuencia de ácidos nucleicos marcadas, una para cada una de las unidades de secuencia de repetición presentes en la segunda sonda. La unión de múltiples sondas marcadas con la segunda sonda amplifica por tanto la señal de detección y aumenta la sensibilidad del ensayo.

40 Amplificación y detección de secuencias de nucleótidos de MTB

45 Los polinucleótidos pueden usarse como cebadores o sondas para amplificar y/o detectar MTB en una muestra de prueba. Los conjuntos de cebador/sonda proporcionados en la presente comprenden por lo menos dos cebadores y por lo menos una sonda. Estos conjuntos de cebadores/sondas pueden emplearse de acuerdo con las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos. Por lo tanto, los cebadores en cualquier conjunto de cebador/sonda particular pueden emplearse para amplificar una secuencia objetivo. En la mayoría de los casos, la sonda hibrida con las copias de la secuencia objetivo generadas por uno o más de los cebadores y generalmente facilita la detección de cualquier copia de la secuencia objetivo generada durante el curso de la reacción de amplificación. 50 Todos los conjuntos de cebador/sonda pueden emplearse de acuerdo con los procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos para detectar MTB específicamente y con sensibilidad cuando se combinan los cebadores y las sondas apropiadas. Se contempla que los cebadores y las sondas individuales de los conjuntos de cebador/sonda proporcionados en la presente puedan usarse alternativamente en combinación con cebadores y/o sondas distintos de los descritos en los conjuntos de cebador/sonda proporcionados en la presente. Se emplean los dos conjuntos de 55 cebadores y sondas en la composición de la invención para detectar dos secuencias objetivo de MTB diferentes.

60 Los procedimientos de amplificación incluyen, pero no están limitados a, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), TMA, amplificación de círculo rodante, amplificación basada en secuencia de ácidos nucleicos (NASBA) y amplificación de desplazamiento de cadena (SDA). Un experto en la técnica entenderá que para su uso en ciertas técnicas de amplificación, los cebadores pueden necesitar ser modificados, por ejemplo, para SDA, el cebador comprende nucleótidos adicionales cerca de su extremo 5' que constituyen un sitio de reconocimiento para una endonucleasa de restricción. De manera similar, para NASBA, el cebador comprende nucleótidos adicionales cerca del extremo 5' que constituyen un promotor de ARN polimerasa.

65 En algunas realizaciones, se tienen en cuenta ciertos criterios cuando se selecciona un cebador para una

reacción de amplificación. Por ejemplo, cuando se requiere un par de cebadores para la reacción de amplificación, los cebadores deben seleccionarse de tal manera que se minimice la probabilidad de formar dúplex 3' y que las temperaturas de fusión (T_m) sean lo suficientemente similares como para optimizar el apareamiento con la secuencia objetivo y minimizar la cantidad de apareamiento no específico.

5 El método de amplificación puede comprender (a) formar una mezcla de la reacción que comprende reactivos de amplificación de ácidos nucleicos, por lo menos un conjunto de cebador/sonda, y una muestra de prueba que se sospecha que contiene por lo menos una secuencia objetivo y (b) someter la mezcla a condiciones de amplificación para generar por lo menos una copia de una secuencia de ácidos nucleicos complementaria a la secuencia objetivo. El paso (b) de los métodos anteriores puede repetirse cualquier cantidad adecuada de veces (antes del paso (c) en el método de detección), por ejemplo, ciclando térmicamente la mezcla de la reacción entre 10 y 100 veces, típicamente entre aproximadamente 20 y aproximadamente 60 veces, más típicamente entre aproximadamente 25 y aproximadamente 45 veces.

10 15 Los reactivos de amplificación de ácidos nucleicos incluyen, pero no están limitados a, una enzima que tiene por lo menos actividad de polimerasa, cofactores enzimáticos como magnesio o manganeso; sales; nicotinamida adenina dinucleótido (NAD); y trifosfatos de desoxinucleótidos (dNTP) como, por ejemplo, trifosfato de desoxiadenina, trifosfato de desoxiguanina, trifosfato de desoxitosina y trifosfato de desoxitina.

20 25 Las condiciones de amplificación son condiciones que generalmente promueven el apareamiento y la extensión de una o más secuencias de ácidos nucleicos.

30 35 Los amplicones específicos producidos por la amplificación de secuencias de ácidos nucleicos objetivo usando los polinucleótidos, como se ha descrito anteriormente, pueden detectarse mediante una variedad de métodos. Por ejemplo, uno o más de los cebadores usados en las reacciones de amplificación pueden marcarse de manera que un amplicón pueda detectarse directamente mediante técnicas convencionales posteriores a la reacción de amplificación. Alternativamente, se puede añadir una sonda que consiste de una versión marcada de uno de los cebadores usados en la reacción de amplificación, o un tercer polinucleótido distinto de las secuencias de cebador que se ha marcado y es complementario a una región de la secuencia amplificada, después de que se haya completado la amplificación. La mezcla se somete luego a condiciones de hibridación y lavado apropiadas y el marcador se detecta mediante métodos convencionales.

40 45 El producto de la amplificación producido como anteriormente puede detectarse durante o posteriormente a la amplificación de la secuencia objetivo. Los métodos para detectar la amplificación de una secuencia objetivo durante la amplificación (por ejemplo, PCR en tiempo real) se han resumido anteriormente y se describen, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos Nº 5.210.015. Alternativamente, los productos de amplificación se hibridan con sondas, luego se separan de otros componentes de la reacción y se detectan usando micropartículas y sondas marcadas.

50 55 60 Se apreciará fácilmente que sería ventajoso un procedimiento que permita que tanto la amplificación como la detección de secuencias de ácidos nucleicos objetivo tengan lugar simultáneamente en un único recipiente de reacción sin abrir. Tal procedimiento evita el riesgo de contaminación por "transferencia" en los pasos de procesamiento posteriores a la amplificación, y también facilita la selección o ensayos de alto rendimiento y la adaptación del procedimiento a la automatización. Además, este tipo de procedimiento permite la monitorización "en tiempo real" de la reacción de amplificación, así como la monitorización de "punto final". Los ejemplos de moléculas de sonda que son particularmente adecuadas para este tipo de procedimiento incluyen sondas de baliza molecular y sondas TAQMAN. Las sondas TAQMAN son generalmente sondas de ácidos nucleicos fluorogénicas de doble marcación compuestas de un polinucleótido complementario a la secuencia objetivo que está marcada en el extremo terminal 5' con un fluoróforo y en el extremo terminal 3' con un neutralizador. En la sonda libre, la proximidad del fluoróforo y el neutralizador asegura que el fluoróforo se neutraliza internamente. Durante la fase de extensión de la reacción de amplificación, la sonda se escinde por la actividad de nucleasa 5' de la polimerasa y se libera el fluoróforo. El fluoróforo liberado puede luego fluorescer y producir por tanto una señal detectable.

65 En algunas realizaciones, se emplean sondas de "baliza molecular". Las sondas de baliza molecular se describen, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos Nº 6.150.097; 5.925.517 y 6.103.476. Básicamente, las balizas moleculares son sondas de polinucleótidos capaces de formar una estructura de tallo-giro (horquilla). El giro es una estructura de cadena sencilla que contiene secuencias complementarias a la secuencia objetivo, mientras que el tallo típicamente no está relacionado con la secuencia objetivo y se autohíbrida para formar una región de cadena doble. Los nucleótidos que son tanto complementarios con la secuencia objetivo y que pueden autohíbridarse también pueden formar parte de la región del tallo. Unido a un brazo del tallo hay un fracción de fluoróforo y al otro brazo un fracción de neutralizador. Cuando el polinucleótido adopta una forma de horquilla, el fluoróforo y el neutralizador están muy cerca y la energía emitida por el fluoróforo es por tanto absorbida por el neutralizador y liberada como calor, dando como resultado la neutralización interna del fluoróforo. Tras la unión del polinucleótido con su secuencia objetivo, el fluoróforo y el neutralizador se separan espacialmente y el fluoróforo puede fluorescer produciendo una señal detectable.

5 Los ejemplos de fluoróforos que encuentran uso incluyen, pero no están limitados a, fluoresceína y derivados de fluoresceína como una dihalo-(C₁ a C₈)dialcoxicarboxifluoresceína, ácido 5-(2'-aminoetil)aminonaftaleno-1-sulfónico (EDANS), cumarina y derivados de cumarina, amarillo Lucifer, rojo Texas, tetrametilrodamina, tetracloro-6-carboxifluoresceína, 5-carboxirodamina, tintes de cianina y similares. Los neutralizadores incluyen, pero no están limitados a, DABCYL, ácido 4'-(4-dimetilaminofenilazo)benzoico (DABSYL), 4-dimetilaminofenilazofenil-4'-maleimida (DABMI), tetrametilrodamina, carboxitetrametilrodamina (TAMRA), colorantes Black Hole Question (BHQ) y similares.

10 En algunas realizaciones, se emplean ensayos cuantitativos. En algunas de tales realizaciones, en la reacción se emplea un estándar interno. Tales estándares internos generalmente comprenden una secuencia de ácido nucleico objetivo de control y una sonda de polinucleótido de control. El estándar interno puede incluir adicionalmente una pareja adicional de cebadores. La secuencia primaria de estos cebadores de control puede no estar relacionada con los polinucleótidos de MTB y ser específica para la secuencia de ácido nucleico objetivo de control. Alternativamente, no es necesario usar ningún cebador adicional si la secuencia objetivo de control se designa de tal manera que se una a los cebadores de MTB. La cantidad de ácido nucleico objetivo en una muestra de prueba puede cuantificarse usando métodos de "punto final" o métodos de "tiempo real".

20 Los ensayos de detección de MTB pueden ser ensayos de alto rendimiento. Para los ensayos de alto rendimiento, los componentes de la reacción se alojan habitualmente en un transportador o plataforma de múltiples recipientes, como una placa de microtitulación de múltiples pocillos, que permite que se monitoricen una pluralidad de reacciones de ensayo que contienen diferentes muestras de prueba en el mismo ensayo. En algunos casos, se emplean ensayos altamente automatizados de alto rendimiento para aumentar la eficiencia del proceso de selección o ensayo. Muchos sistemas de selección o análisis de alto rendimiento están ahora disponibles comercialmente, al igual que las capacidades de automatización para muchos procedimientos, como el pipeteo de muestras y reactivos, dispensación de líquidos, incubaciones programadas, formateo de muestras en micromatrizes, termociclado de microplacas y lecturas de microplacas en un detector apropiado, lo que da como resultado tiempos de producción mucho más rápidos. En algunos casos, las reacciones se realizan en dispositivos microfluídicos (por ejemplo, tarjetas).

30 30 Los polinucleótidos, métodos y kits son útiles en entornos clínicos o de investigación para la detección y/o cuantificación de ácidos nucleicos de MTB. Por tanto, en estos entornos, los polinucleótidos pueden usarse en ensayos para diagnosticar la infección por MTB en un sujeto, o para monitorizar la cantidad de una secuencia de ácidos nucleicos objetivo de MTB en un sujeto infectado con MTB. La monitorización de la cantidad de bacterias en un sujeto es particularmente importante para identificar o monitorizar la respuesta a la terapia antibacteriana.

40 40 Puede realizarse un ensayo de objetivo doble usando PCR en tiempo real, combinado con la inactivación de la muestra. Aunque pueden usarse una variedad de muestras, las muestras altamente relevantes clínicamente incluyen especímenes de frotis positivo o frotis negativo de esputo (inducido o expectorado), muestras de lavado broncoalveolar (BAL), o sedimentos de esputo tratados con N-acetil-L-Cisteína (NALC) y muestras de BAL. Los desafíos presentados con estas muestras incluyen la complejidad molecular del esputo, que contiene numerosos componentes que pueden interferir con los ensayos moleculares, la lisis celular y la inactivación celular.

45 45 Se realiza un paso de inactivación de muestra para reducir el riesgo de infección asociado con los especímenes clínicos que pueden contener MTB. La reducción del riesgo de infección se logra, por ejemplo, incubando muestras clínicas con reactivo de inactivación (ver el Ejemplo 3, a continuación).

50 50 Los ensayos son susceptibles de uso con el sistema de detección de PCR en tiempo real automatizado, como el sistema Abbott m2000sp. Por tanto, antes de realizar un ensayo, las muestras se preparan para su uso con tales sistemas. Por ejemplo, la preparación del ADN objetivo se realiza usando una tecnología basada en micropartículas magnéticas (Abbott *m*Sample Evaluation SystemDNA). Esto puede realizarse usando un Abbott *m*2000sp para la preparación de muestras automatizada o usando un protocolo de preparación de muestras manual. En algunos casos, se procesan un control interno (IC), un control positivo, y un control negativo desde el comienzo de la preparación de la muestra para demostrar que el proceso se ha llevado a cabo correctamente.

55 55 Para la amplificación, en algunas realizaciones, se añaden el ADN de la muestra purificada y la mezcla maestra a una placa de PCR de 96 pocillos usando un instrumento Abbott *m*2000sp o manualmente. Después de la adición, cada placa se sella y se transfiere a un Abbott *m*200rt donde se realiza la amplificación por PCR usando ADN polimerasa.

60 60 La presencia de productos de amplificación de MTB puede detectarse durante el paso de apareamiento/extensión midiendo la señal de fluorescencia en tiempo real de las sondas de MTB. La presencia de productos de amplificación de IC se detecta midiendo la señal de fluorescencia en tiempo real de la sonda de IC. Las sondas de MTB e IC pueden ser oligonucleótidos de ADN de cadena sencilla que consisten de la secuencia de unión específica del objetivo, una fracción fluorescente enlazada covalentemente al extremo 5' de la sonda y una fracción

de neutralización enlazada covalentemente al extremo 3' de la sonda. En ausencia de las secuencias objetivo de MTB o IC, se neutraliza la fluorescencia de la sonda. En presencia de secuencias objetivo de MTB o IC, las sondas de MTB o IC se unen específicamente a sus secuencias complementarias en los objetivos durante el paso de apareamiento/extensión, permitiendo la emisión fluorescente y la detección. Las sondas de MTB se marcan con diferentes colorantes fluorescentes (FAM™ para sondas objetivo MTB, Quasar® para IC), permitiendo de este modo que se detecten simultáneamente los productos de amplificación de MTB e IC en la misma reacción.

Pueden tomarse medidas para evitar la contaminación por ácidos nucleicos. Por ejemplo, en algunos casos, la contaminación se minimiza porque: la amplificación por PCR y la hibridación de oligonucleótidos se producen en placas selladas de múltiples pocillos; la detección se lleva a cabo automáticamente sin la necesidad de abrir los recipientes de reacción (por ejemplo, pocillos de las placas); las puntas de pipeta de barrera para aerosoles se usan para todos los pipeteos; las puntas de las pipetas se descartan después de su uso; y se usan áreas dedicadas separadas para realizar el ensayo MTB.

Los reactivos anteriores se proporcionan en la forma de un kit y/o sistema (por ejemplo, sistemas que comprenden instrumentos de manipulación y ensayo de muestras automatizados descritos en la presente). Por ejemplo, en algunas realizaciones, el kit comprende, consiste esencialmente de, o consiste de:

1. Control interno de MTB (4 viales, 0,4 ml por vial) <0,01% de plásmido de ADN lineal no infeccioso en una solución tampón con ADN portador.
Conservantes: azida de sodio y 0,15% de ProClin® 950.
2. Paquete de reactivos de amplificación (4 paquetes, 24 pruebas/paquete). Cada paquete de reactivos contiene: 1 frasco (0,078 ml) de ADN polimerasa (5,4 a 5,9 unidades/μl) en solución tamponada con estabilizadores. 1 botella (0,5314 ml) de reactivo de amplificación MTB. <0,1% de oligonucleótidos sintéticos (uno o más conjuntos y sondas de cebadores objetivo; un conjunto de cebador y sonda para el control interno), y <0,6% de dNTP en una solución tamponada con un colorante de referencia. Conservantes: azida de sodio y ProClin® 950 al 0,15%. 1 botella (0,778 ml) de Reactivo de activación. Cloruro de magnesio 38 mM en una solución tamponada. Conservantes: azida de sodio y 0,15% de ProClin® 950.
3. Control negativo de MTB (8 viales, 1,6 ml por vial); Soluciones tamponadas;
Conservantes: azida de sodio y 0,15% de ProClin® 950.
4. Control positivo de MTB (8 viales, 1,6 ml por vial); <0,01% de plásmido de ADN linealizado no infeccioso en una solución tampón con ADN portador.
Conservantes: azida de sodio y 0,15% de ProClin® 950.

Pueden detectarse todas las formas de MTB (por ejemplo, los cebadores y las sondas se seleccionan para identificar todas las secuencias objetivo nucleicas de MTB que podrían estar presentes en una muestra). En algunos casos, se detectan las secuencias de MTB específicas, como cepas resistentes a los antibióticos (por ejemplo, rifampicina, isoniazida).

40 EJEMPLOS

Los ejemplos siguientes tienen únicamente propósitos ilustrativos y no debe considerarse que limitan de ninguna manera el alcance de esta invención.

45 EJEMPLO 1

Flujo de trabajo de ensayo ejemplar

Este ejemplo describe un enfoque específico y eficiente para realizar PCR en tiempo real para detectar 50 MTB en una muestra. En algunas realizaciones, los métodos de PCR en tiempo real comprenden o consisten de los pasos siguientes:

1. Inactivación de MTB en muestras (por ejemplo, esputo, lavado broncoalveolar [BAL], y sedimentos de N-acetil-L-cisteína [NALC] de esputo y BAL) usando un reactivo de inactivación (IR). En algunas realizaciones, el reactivo de inactivación comprende o consiste de isopropanol, hidróxido de sodio, Tween-20 y agua;
2. Preparación de la muestra en la que se extrae el ADN de las muestras inactivadas usando reactivos; la preparación de la muestra se realiza usando el instrumento automatizado *m2000sp* (Abbott Molecular), o manualmente;
3. Montaje de PCR en el que se añaden las muestras purificadas y los componentes de PCR de ensayo juntos en una placa de reacción óptica de 96 pocillos u otro soporte de reacción de múltiples cámaras; esto se realiza usando el *m2000sp* o manualmente;
4. Sellado manual de la placa de reacción óptica de 96 pocillos y transferencia de la placa a un instrumento *m2000rt*.
5. Amplificación y detección de productos de PCR usando el instrumento automatizado *m2000rt*; los resultados del paciente se informan automáticamente en la estación de trabajo *m2000rt*. Un resumen gráfico

de este flujo de trabajo se muestra en la Figura 1.

EJEMPLO 2

5 Selección de objetivos y diseño de cebador/sonda

En algunas realizaciones, se emplea una estrategia de objetivo doble para detectar el complejo MTB. Los dos objetivos incluyen: Secuencia de inserción (IS) 6110 y Antígeno de proteína B (PAB). Ver la Tabla 1 a continuación:

10 Tabla 1. Selección de objetivos de MTB de Abbott RealTime:	
IS6110	<ul style="list-style-type: none"> - Secuencia de inserción (IS) de la categoría IS3 - Habitualmente presente en múltiples copias por celda (por ejemplo, Dinamarca, 50% 11-15 copias por celda) - Algunas cepas de TB no tienen o tienen un número de copias bajo de IS6110
PAB	<ul style="list-style-type: none"> - Copia única del gen que codifica el antígeno b de la proteína

20 El uso de una estrategia de objetivo doble previene los resultados falsos negativos provocados por la mutación o deleción de secuencias objetivo.

Las sondas y cebadores que encuentran uso en la detección de secuencias objetivo IS6110 y PAB incluyen los de la Tabla 2.

25 Tabla 2. Secuencias de cebador/sonda de MTB en tiempo real (FP = cebador directo; RP = cebador inverso; #pdU = 5' propinil dU; * pdC = 5' propinil dC; Fam = colorante de fluoresceína; BHQ = Neutralizador Black Hole; IC = control interno):

Material	SEQ ID NO	Secuencia
IS6110 (121) FP	SEQ ID NO: 1	5' CCT GCG AGC GTA GGC GTC GGT GA 3'
IS6110 (121) RP	SEQ ID NO: 2	5' CGT CCA GCG CCG CTT CGG ACC A 3'
PAB abt2 FPb	SEQ ID NO: 3	5' GCA CCT CAA GCT GAA CGG AAA AGT CCT 3'
PAB abt2 RPx	SEQ ID NO: 4	5' CCG GGG TTG AGC GCA GCG ATC T 3'
sonda6 de IS6110	SEQ ID NO: 5	5' 6-Fam-pdU#AG GpdUG AGG pdUpdC*pdU GpdCpdU ApdCpdC pdC-BHQ1 dT 3'
Sonda 1 PAB de	SEQ ID NO: 6	5' 6-Fam-pdUApdC pdCAG GGpdC ApdCpdC ApdUpdC AAA-BHQ1 dT 3'
IC FP 196	SEQ ID NO: 7	5' CTA CAG AGT TGG CAG CTT CAC TTT C 3'
IC RP 310	SEQ ID NO: 8	5' GTC TGG CCT TTC AGC AAG TTT C 3'
Sonda de control interno:	SEQ ID NO: 9	5' Quasar-GApdC GAG pdUpdUpdC ApdUG AGG GpdCA-BHQ2 dT 3'

50 La Tabla 3 proporciona cebadores y sondas alternativas para usar en las secuencias objetivo de detección de MTB. Además de IS6110 y PAB, los objetivos adicionales incluyen rPOB (codificación del gen de copia única para la subunidad β de la ARN polimerasa, sitio de aproximadamente el 95% de las mutaciones resistentes a la rifampicina), SenX3-RegXe (codificación del gen de copia única para proteínas reguladoras), hsp65 (codificación del gen de copia única para la proteína de choque térmico) y MPB64 (codificación del gen de copia única para la proteína 23 KDA).

55

60

65

Tabla 3. Otras secuencias de cebador/sonda:

	Nombre	SEQ ID NO	Secuencias
5	IS6110 (104) FP1	SEQ ID NO: 10	5' GCCGCTTCGGACCACCAGCACCTAAC
	IS6110 (104) RP1	SEQ ID NO: 11	5' GTAGGCGTCGGTGACAAAGGCCACGTAG
	Sonda de IS6110 (104)	SEQ ID NO: 12	5' TGCCAGGTCGACACATA
	IS6110 (80) FP1	SEQ ID NO: 13	5' TACGACCACATCAACCGGGAGCCCA
10	IS6110 (80) RP1	SEQ ID NO: 14	5' GCGTGGACGCGGCTGATGTGCTCCT
	IS6110 (80) pr1	SEQ ID NO: 15	5' CCGCGAGCTGCGCGATG
	PAB abtl FP	SEQ ID NO: 16	5'-GCACGCTGCTACCCGCTGTTAACCT
	PAB abtl RP	SEQ ID NO: 17	5'-GTGCCCTGAGCGGTGATCGTGACGTT
15	Sonda de PAB abtl:	SEQ ID NO: 18	5' TCCGGCCTTCACGAGA
	nhsp65 FP1	SEQ ID NO: 19	5' TCGGGGCTCGGGTAGAAGTT
	nhsp65 RP1	SEQ ID NO: 20	5' TCGTCAACTCGGGCAGCAAC
	sonda nhsp65 1	SEQ ID NO: 21	5' TACTCGGCTCACGCACG
20	vhsp65 FP1	SEQ ID NO: 22	5' GGCTCGGGTAGAAGTTGACTGG
	vhsp65 RP1	SEQ ID NO: 23	5' GTCAACTCGGGCAGCAACGAC
	vhsp65 sonda 1	SEQ ID NO: 24	5' CTCACCGCACGGCGGTATT
	senX3 FP	SEQ ID NO: 25	5' GGCAGCGGACTCGGGTT
25	senX3 RP	SEQ ID NO: 26	5' ACCGCAGTTCGGGCTCTC
	senX3 Pr	SEQ ID NO: 27	5' TCACGACGACGAGCGAC
	regX3 FP	SEQ ID NO: 28	5' CGCTGATGACCAGTGTGTTGATT
	regX3 RP	SEQ ID NO: 29	5' GCAGCATCAGATCGAGCAGGAC
30	Sonda de regX3	SEQ ID NO: 30	5' ATGGTCCGGCAGCTCTC
	MPB64 FP1	SEQ ID NO: 31	5' CAACATCAGCCTGCCAGTTACTACC
	MPB64 RP1	SEQ ID NO: 32	5' CTTCGCGTGGAGTGGACGATG
	Sonda de MPB641	SEQ ID NO: 33	5' AAGTCGCTGGAAAATTACAT
35	rPOB FPa	SEQ ID NO: 34	5' CGTGGAGGCGATCACACCGCAGACGTT
	rPOB RPb	SEQ ID NO: 35	5' CGTTGATCAACATCCGGCCGGTGGTC
	Sonda de rPOB5	SEQ ID NO: 36	5' CGGTCTGTCACGTGAGCGTGC

EJEMPLO 3**40 Inactivación de muestra**

Este ejemplo describe reactivos y métodos ejemplares para realizar un paso de inactivación de la muestra.

Preparación de reactivo de inactivación (IR)**45 Materiales empleados:**

- Recipiente de polipropileno o vidrio.
- 10MNaOH
- Isopropanol
- TWEEN-20
- Agua purificada

Preparación de IR:**60 Volumen de material requerido para 500 ml**

NaOH 10 M 20 ml
 Agua purificada 179,1 ml
 Isopropanol 300 ml
 TWEEN-20 0,9 ml

1. Añadir 179,1 ml de agua a un recipiente de polipropileno o vidrio vacío (evitar el uso de un recipiente de poliestireno).

5 2. Añadir 0,9 ml de TWEEN-20 al recipiente.

3. Añadir 20 ml de NaOH 10 M al recipiente.

4. Añadir 300 ml de isopropanol al recipiente.

5. Mezclar los componentes por inversión 20 veces.

10 Usar o almacenar a temperatura ambiente durante hasta 1 mes.

10 Procedimiento de inactivación:

1. Si está congelado, descongelar los especímenes a de 15 a 30° C.

2. Estimar el volumen del espécimen a inactivar.

15 3. Añadir IR a una proporción de 1:3 (por ejemplo, 1 ml de espécimen + 3 ml de IR) (el volumen de espécimen preferido es de 0,3 a 10 ml).

4. Invertir el recipiente para asegurar el contacto entre el IR y el espécimen.

5. Agitar la mezcla en vórtice durante de 20 a 30 segundos.

20 6. Incubar la mezcla a temperatura ambiente durante por lo menos 1 hora y preferiblemente no más de 24 horas. Agitar la mezcla en vórtice una última vez durante de 20 a 30 segundos a de 20 a 30 minutos en el período de incubación.

EJEMPLO 4

25 Método de preparación de muestra:

El ensayo de MTB del Ejemplo 1 usa un instrumento automatizado Abbott *m2000sp* o un método manual para procesar esputo, BAL y sedimento de NALC-NaOH de muestras de esputo o BAL y usa un instrumento automatizado Abbott *m2000rt* para amplificación y detección. Ambos procesos implican la extracción de ADN de las muestras, ambas purificaciones de ADN se realizan usando los reactivos de preparación de muestras GPR de ADN (Lista 6K12-24) del Abbott *mSample Preparation System_{DNA}*.

30 Los reactivos y el método de preparación de la muestra (incluido el paso de lisis, el paso de lavado, el paso de elución, la disposición de reutilización de la punta, etc.) se optimizaron para reducir el efecto inhibidor sobre las reacciones de PCR debido al esputo inhibidor o la transferencia del reactivo de inactivación de TB (IR): por tanto, no es necesaria centrifugación para eliminar el IR en la muestra tratada con IR. El procedimiento también está optimizado para reducir la transferencia de muestras positivas altas a casi negativas. La preparación de la muestra también está optimizada para garantizar la rotura de células de TB para una recuperación de ADN eficiente y PCR.

40 PCR en tiempo real:

45 Después del montaje de la reacción de PCR en una placa de reacción óptica de 96 pocillos (ya sea manualmente o mediante el *m2000sp*), la placa de 96 pocillos se sella manualmente y se transfiere a la *m2000rt* para realizar la amplificación y la reacción de detección de fluorescencia en tiempo real. Los resultados del paciente se informan automáticamente en la estación de trabajo *m2000rt*. El ensayo de MTB detecta una secuencia de ácidos nucleicos de control interna como control de validez de la muestra, extracción de la muestra y control de eficiencia de la amplificación. La Tabla 4 proporciona condiciones de ciclado por PCR ejemplares.

50 Tabla 4.

Etapa	Ciclo	Paso	Temperatura (° C)	Tiempo
1	1	1	50	10 min
2	1	1	94	10 min
3	50	1	94	35 seg
		2	64	15 seg
Lectura		3	65	40 seg

60 Para los datos mostrados en los ejemplos a continuación, se usó un corte de ensayo de 42. Es decir, las muestras con valores de Ct <42 se consideran MTB detectadas, mientras que las muestras con valores de Ct de ensayo >42 se consideran MTB no detectadas.

65 Los ensayos ejecutados en el *m2000rt* son según los protocolos recomendados por el fabricante. Un ejemplo de este tipo incluye los pasos de:

1. Se realizan 96 muestras tratadas con IR por ronda. Se incluyen un control negativo y 1 control positivo en cada ronda, lo que permite procesar un máximo de 94 muestras tratadas con IR por ronda.
- 5 2. Antes de usar, agitar en vórtice las muestras tratadas con IR durante 3 a 5 segundos. Usando una pipeta, transfiera las muestras tratadas con IR a los recipientes de reacción. Minimizar la transferencia de partículas visibles en las muestras tratadas con IR durante este paso.
- 10 3. Descongelare los controles de ensayo, IC y reactivos de amplificación a una temperatura de 2 a 8° C o de 15 a 30° C. Una vez descongelado, el IC puede almacenarse cerrado a una temperatura de 2 a 8° C hasta 14 días antes de su uso. Una vez descongelados, los controles pueden almacenarse a una temperatura de 2 a 8° C hasta 24 horas antes de su uso. Si no se usa la función de uso extendido del reactivo de amplificación opcional: descongelar los nuevos reactivos de amplificación a una temperatura de 2 a 8° C o de 15 a 30° C. Una vez descongelados, los reactivos de amplificación pueden almacenarse a una temperatura de 2 a 8° C durante un máximo de 24 horas, antes de su uso. Si se usa la función de uso extendido de reactivo de amplificación opcional: Seleccionar paquetes de reactivos de amplificación nuevos y/o parciales para su uso en la ejecución. Consultar el manual de funcionamiento del Abbott *m2000sp* (Lista Nº 9K20-06 o superior), Instrucciones de funcionamiento, para instrucciones relativas a la gestión del inventario de paquetes de reactivos de amplificación. Los paquetes de reactivos de amplificación deben tener el mismo número de lote.
- 15 4. Agitar en vórtice cada control 3 veces durante 2 a 3 segundos cada vez antes de usar. Asegurarse de que no se crean burbujas o espuma. Si se encuentran, eliminarlas con una nueva punta de pipeta estéril para cada tubo. Asegurarse de que el contenido de cada vial esté en el fondo después de agitar en vórtice golpeando los viales en el banco para llevar líquido al fondo del vial.
- 20 5. Invertir suavemente las botellas del Abbott *mSample Preparation SystemDNA* para garantizar una solución homogénea. Si se observan cristales en cualquiera de las botellas de reactivos al abrirlos, permitir que el reactivo se equilibre a temperatura ambiente hasta que desaparezcan los cristales. No usar los reactivos hasta que los cristales se hayan disuelto. Asegurarse de que no se generen burbujas o espuma; si las hay, retirarlas con una punta de pipeta estéril, usando una punta nueva para cada botella. NOTA: Antes de verter las *mMicroparticlesDNA* en el recipiente de reactivo de 200 ml, mezclar enérgicamente o agitar en vórtice hasta que las *mMicroparticlesDNA* se hayan resuspendido completamente.
- 25 6. Agitar en vórtice el vial de IC 3 veces durante 2 a 3 segundos cada vez antes de usar. Asegurarse de que no se generen burbujas o espuma; si las hay, retirarlas con una punta de pipeta estéril.
- 30 7. Usando una pipeta de precisión calibrada dedicada únicamente para uso de control interno, añadir 180 µl de IC a 1 botella de tampón *mLysisDNA*. Mezclar invirtiendo suavemente el recipiente de 5 a 10 veces para minimizar la formación de espuma. Cada botella de tampón de *mLysisDNA* soporta hasta 48 preparaciones de muestra. Añadir 180 µl de IC a una segunda botella de tampón de *mLysisDNA* para 49 a 96 muestras. Si se usa la característica de uso extendido del reactivo de amplificación opcional, pueden volverse a tapar y almacenar viales parciales de IC a una temperatura de 2 a 8° C para un segundo uso.
- 35 8. Añadir 25 ml de etanol de prueba grado USP 190 a 200 (etanol del 95 al 100%) a la botella de tampón *mLysisDNA* + reactivo IC. No usar etanol que contenga desnaturalizantes. Invertir suavemente el recipiente para garantizar una solución homogénea. Para 49 a 96 muestras, añadir 25 ml de etanol a una segunda botella de tampón *mLysisDNA* + IC. Invertir suavemente para garantizar una solución homogénea.
- 40 9. Añadir 70 ml de etanol de prueba grado USP 190 a 200 (etanol del 95 al 100%) a la botella de *mWash 2DNA*. No usar etanol que contenga desnaturalizantes. Cada botella de *mWash 2DNA* soporta hasta 48 reacciones. Invertir suavemente para garantizar una solución homogénea.
- 45 10. Colocar el control negativo y positivo y los especímenes de pacientes en el estante de muestras del Abbott *m2000sp*.
11. Colocar los recipientes de reacción de 5 ml en el transportador del subsistema Abbott *m2000sp* de 1 ml.
12. Cargar los estantes de transporte que contienen los reactivos Abbott *mSample Preparation SystemDNA* y la placa Abbott 96-Deep-Well en la mesa de trabajo Abbott *m2000sp* como se describe en el Manual de funcionamiento, instrucciones de funcionamiento del Abbott *m2000sp*.
- 50 13. En la pantalla Ejecutar Extracción de Muestras, seleccionar e iniciar el protocolo de extracción de muestra como se describe en el manual de funcionamiento del Abbott *m2000sp*, instrucciones de funcionamiento. NOTA: Cambiar los guantes antes de manipular los reactivos de amplificación.
- 55 14. Cargar el paquete de reactivos de amplificación y el vial de mezcla maestra (si es necesario) en la mesa de trabajo Abbott *m2000sp* después de que se haya completado la preparación de la muestra. Cada paquete de reactivos de amplificación soporta hasta 24 reacciones. Descongelar 1 conjunto de reactivos para de 1 a 24 muestras, 2 conjuntos para de 25 a 48 muestras, 3 conjuntos para de 49 a 72 muestras y 4 conjuntos para de 73 a 96 muestras. Asegurarse de que los reactivos de amplificación estén completamente descongelados antes de su uso. Asegurarse de que el contenido esté en el fondo de los viales golpeando los viales en posición vertical en el banco. Retirar las tapas de vial de reactivo de amplificación. Si se usa la característica de uso extendido de reactivo de amplificación opcional, puede usarse una combinación de paquetes de reactivos nuevos y parciales. Si no se usa la característica de uso extendido opcional de reactivo de amplificación, solo pueden usarse nuevos paquetes de reactivos. Asegurarse de que el contenido de los nuevos paquetes de reactivos de amplificación se encuentre en el fondo de los viales antes de abrir los reactivos de amplificación golpeando los viales en posición vertical en el banco. No golpearlos paquetes de
- 60
- 65

- 5 reactivos de amplificación parcial que se usan por segunda vez. El golpeteo puede dar como resultado la pérdida del volumen de la mezcla maestra en la tapa. Retirar las tapas. Si se almacena un nuevo paquete de reactivos de amplificación para un segundo uso, los viales se vuelven a tapar para su almacenamiento. Si se planea reutilizar las tapas originales para volver a tapar los viales de reactivos, las tapas originales se guardan y se usan. Si se planea usar tapas nuevas para volver a tapar los viales de reactivos, se descartan las tapas originales. Los paquetes de amplificación parciales se cargan a la izquierda de los nuevos paquetes de amplificación en la mesa de trabajo del Abbott *m2000sp*. Asegurarse de que los paquetes de reactivos de amplificación estén firmemente asentados en el instrumento.
- 10 15. Seleccionar la placa con profundidad de pocillo adecuada de la pantalla de Ejecutar Adición de Mezcla Maestra que coincida con la extracción de preparación de muestra correspondiente. Iniciar el protocolo de adición de mezcla maestra del Abbott *m2000sp*. Seguir las instrucciones que se describen en el manual de funcionamiento del Abbott *m2000sp*, sección de Instrucciones de funcionamiento. NOTA: El montaje de la mezcla maestra de amplificación y la muestra se eluye en la placa de reacción óptica Abbott de 96 pocillos (paso 15) debe iniciarse en el plazo de 1 hora después de completar la preparación de la muestra. NOTA: El protocolo del Abbott *m2000rt* (paso 20) debe iniciarse en el plazo de los 90 minutos desde el inicio del protocolo de Adición de la Mezcla Maestra. NOTA: Si la ejecución se aborta por cualquier razón posterior al paso 15, los reactivos de amplificación deben descartarse y se debe usar una nueva placa de PCR de 96 pocillos si se repite el Protocolo de Adición de Mezcla Maestra del Abbott *m2000sp* (paso 15).
- 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 16. Encender e inicializar el Abbott *m2000rt* en el Área de Amplificación. NOTA: El Abbott *m2000rt* requiere 15 minutos para calentarse. NOTA: Cambiar las batas y los guantes de laboratorio antes de regresar al área de preparación de muestras.
17. Colocar la placa de reacción óptica de 96 pocillos del Abbott en la base de soporte sin salpicaduras del Abbott después de que el instrumento Abbott *m2000sp* haya completado la adición de muestras y la mezcla maestra.
18. Sellar la placa de reacción óptica de 96 pocillos del Abbott de acuerdo con el manual de funcionamiento del Abbott *m2000sp*, sección de Instrucciones de funcionamiento. Exportar los resultados de la placa de PCR completos a un CD (o directamente a un Abbott *m2000rt* mapeado a través de una conexión de red).
- En algunas realizaciones, se emplea un método de preparación de muestra manual. Un ejemplo de tal método es el siguiente:
1. Descongelar los reactivos de amplificación a una temperatura de 15 a 30° C o de 2 a 8° C. Este paso puede iniciarse antes de completar el procedimiento de preparación de la muestra.
 2. Se procesan 12 muestras por conjunto de estantes magnéticos. Se incluyen un control negativo y un control positivo en cada ronda, permitiendo de este modo procesar un máximo de 10 especímenes. Preparar los especímenes para su procesamiento siguiendo estos pasos: NOTA: Los especímenes de pacientes deben desactivarse antes de comenzar la extracción de la muestra.
 3. Descongelar 1 tubo del control negativo de MTB, 1 tubo de control positivo de MTB y 1 vial de control interno de MTB a una temperatura de 15 a 30° C o de 2 a 8° C. Una vez descongelado, si el IC no se procesa inmediatamente, almacenarlo a una temperatura de 2 a 8° C hasta 14 días antes de su uso. Una vez descongelado, si los controles no se procesan inmediatamente, almacenarlos a una temperatura de 2 a 8° C hasta 24 horas antes de su uso. Agitar en vórtice los controles e IC 3 veces durante 2 a 3 segundos cada vez antes del uso. Asegurarse de que el contenido de cada vial esté en el fondo después de agitar en vórtice golpeando los viales en el banco para llevar el líquido al fondo del vial. Asegurarse de que no se generen burbujas o espuma; si las hay, retirar con una punta de pipeta estéril, usando una punta nueva para cada vial.
 4. Abrir el paquete(s) de reactivos del Abbott *mSample Preparation SystemDNA*. Si se observan cristales en cualquiera de las botellas de reactivos al abrir las, permitir que el reactivo se equilibre a temperatura ambiente hasta que desaparezcan los cristales. No usar los reactivos hasta que los cristales se hayan disuelto.
 5. Preparar el *mWash 2DNA* añadiendo 70 ml de etanol de prueba de grado USP 190 a 200 (etanol del 95 al 100%) a la botella de *mWash 2DNA*. No usar etanol que contenga desnaturalizantes. Invertir suavemente para garantizar una solución homogénea. NOTA: Marcar la botella de *mWash 2DNA* para indicar que ya se ha añadido etanol para un uso prolongado.
 6. Preparar el *mLysisDNA* añadiendo 25 ml de etanol de prueba grado USP 190 a 200 (del 95 al 100% de etanol) a la botella de *mLysisDNA*. No usar etanol que contenga desnaturalizantes. Invertir suavemente de 5 a 10 veces para mezclar y minimizar la formación de espuma. NOTA: Marcar la botella de *mLysisDNA* para indicar que ya se ha añadido etanol para un uso prolongado.
 7. Calcular el volumen de solución de *mLysisDNA* requerida para la ejecución manual: (1,85 ml de *mLysisDNA* x número de muestras). Pipetear el volumen requerido de solución de *mLysisDNA* en un recipiente de polipropileno lo suficientemente grande para contener todo el volumen. Calcular el volumen de IC requerido para la ejecución manual: (3,51 µl de IC x número de muestras). Usar una pipeta de precisión dedicada a uso de control interno solamente para añadir el volumen requerido de IC en el recipiente de polipropileno que contiene la solución de *mLysisDNA* requerida para la ejecución manual. Mezclar la solución de *mLysisDNA* y mezcla de CI mediante inversión suave de 10 a 15 veces para minimizar la formación de espuma. Después del uso inicial, los viales de CI parcial pueden almacenarse a una temperatura de 2 a 8° C hasta 14 días y usarse 1 vez más.

8. Invertir suavemente todas las botellas de reactivos, excepto la botella de *mMicroparticlesDNA* y la botella de *mWash 1DNA*, de 5 a 10 veces para garantizar una solución homogénea antes de su uso. La botella de *mMicroparticlesDNA* se mezclará en el paso 11.
- 5 9. Encender los bloques de calentamiento en seco con temperatura controlada. Ajustar el primer bloque a 58° C. Ajustar el segundo bloque a 80° C. NOTA: Verificar la temperatura de los bloques de calentamiento. No continuar hasta que los bloques de calentamiento estén a la temperatura correcta.
- 10 10. Etiquetar todos los tubos necesarios: un recipiente de reacción de 5 ml por muestra para los pasos de incubación de lisis y de *mWash 1DNA*. Un tubo de microcentrifuga de 1,5 ml por muestra para el primer y el segundo pasos de *mWash 2DNA* y de elución. Un tubo de microfuga de 1,5 ml por muestra o una placa de polipropileno de 96 pocillos para el eluato.
- 15 11. Colocar los recipientes de reacción de 5 ml etiquetados para cada muestra en una plataforma sin calentar. Resuspender el *mMicroparticlesDNA* agitando en vórtice o agitando vigorosamente hasta que las partículas estén en suspensión y las partículas sedimentadas ya no se vean en el fondo de la botella. Después de resuspender las partículas, usar una pipeta de precisión y una punta de pipeta de barrera para aerosoles de 200 µl estéril de para añadir 50 µl de *mMicroparticlesDNA* a cada recipiente de reacción.
- 20 12. Usando una punta de pipeta de barrera para aerosoles de 1000 µl nueva estéril para cada muestra, añadir 1,75 ml (2 X 875 µl) de *mLysisDNA* a los recipientes de reacción.
- 25 13. Añadir 0,8 ml de los controles, y los especímenes a los recipientes de reacción apropiados usando una pipeta de precisión y una punta de pipeta de barrera para aerosoles de 1000 µl nueva estéril para cada muestra. Mezclar cada muestra/mezcla de *mLysisDNA* aspirando y dispensando el volumen de 800 µl de 5 a 10 veces hasta obtener una suspensión uniforme. NOTA: Aspirar y dispensar el líquido lentamente para evitar la formación de espuma.
- 30 14. Transferir los recipientes de reacción de 5 ml al bloque de calentamiento de 58° C.
- 35 15. Iniciar el temporizador e incubar durante 15 minutos.
- 40 16. Después de la incubación usando una punta de pipeta de barrera para aerosoles de 1000 µl nueva estéril para cada muestra, mezclar la mezcla 5 veces aspirando y dispensando 800 µl.
- 45 17. Iniciar el temporizador e incubar durante 10 minutos adicionales en el bloque de calentamiento de 58° C.
- 50 18. Después de la incubación usando una punta de pipeta de barrera para aerosoles de 1000 µl nueva estéril para cada muestra, mezclar la mezcla 5 veces aspirando y distribuyendo 800 µl.
- 55 19. Iniciar el temporizador e incubar durante 10 minutos adicionales en el bloque de calentamiento de 58° C.
- 60 20. Una vez completada la incubación, colocar los recipientes de reacción en una plataforma de captura magnética durante 2 minutos para permitir que las partículas se capturen en el lado de los recipientes de reacción.
- 65 21. Con los recipientes de reacción en la plataforma de captura magnética, utilizar una punta de barrera para aerosoles de 1000 µl nueva estéril o pipeta de transferencia desechable para cada muestra para eliminar cuidadosamente el *mLysisDNA* de cada recipiente de reacción y desechar el fluido en un contenedor de residuos líquidos. Retirar el líquido lo más completamente posible. No perturbar ni aspirar las partículas magnéticas capturadas.
22. Retirar los recipientes de reacción del estante magnético y transferirlos a un estante no magnético. *mWash 1DNA* (lavado).
23. Usando una pipeta de precisión y una punta de pipeta de barrera para aerosoles de 1000 µl nueva estéril para cada muestra, añadir 800 µl de *mWash 1DNA* a las muestras y resuspender las partículas magnéticas en el fluido de lavado mezclando suavemente 10 veces por aspiración y dispensar con una punta de pipeta. Lavar las partículas del lado del recipiente de reacción, si es necesario. NOTA: Al añadir el lavado *mWash 1DNA*, dispensar el líquido lentamente para evitar salpicaduras.
24. Transferir el fluido de lavado y las partículas a un tubo de microfuga de 1,5 ml etiquetado.
25. Colocar los tubos en una plataforma de captura magnética durante 1 minuto para permitir que las partículas se capturen en el lateral de los tubos.
26. Con los tubos en la plataforma de captura magnética, usar una punta de pipeta de 1000 µl de barrera para aerosoles nueva estéril para cada muestra para eliminar cuidadosamente el *mWash 1DNA* de cada tubo y desechar el fluido en un recipiente de desechos líquidos. Retirar el líquido lo más completamente posible. NO alterar ni aspirar las partículas magnéticas capturadas.
27. Retirar los tubos del estante magnético y transferirlos a un estante no magnético. *mWash 2DNA* (primer lavado).
28. Usando una pipeta de precisión y una punta de pipeta de barrera para aerosoles de 1000 µl nueva estéril para cada muestra, añadir 800 µl de *mWash 2DNA* a las muestras y resuspender las partículas magnéticas en el fluido de lavado mezclando suavemente 5 a 10 veces por aspiración y dispensar con una punta de pipeta. Lavar las partículas del lateral del tubo, si es necesario. NOTA: Al añadir *mWash 2DNA*, dispensar el líquido lentamente para evitar salpicaduras.
29. Colocar los tubos en una plataforma de captura magnética durante 1 minuto para permitir que las partículas se capturen en el lateral de los tubos.
30. Con los tubos en la plataforma de captura magnética, usar una punta de pipeta de barrera para aerosoles de 1000 µl nueva estéril para cada muestra para retirar cuidadosamente el *mWash 2DNA* de cada tubo y desechar el fluido en un recipiente de desechos líquidos. Eliminar el fluido lo más completamente posible. NO alterar ni aspirar las partículas magnéticas capturadas.

31. Retirar los tubos del estante magnético y transferirlos a un estante no magnético. *mWash 2DNA* (segundo lavado).
- 5 32. Usando una pipeta de precisión y una punta de pipeta de barrera para aerosoles de 1000 μ l nueva y estéril para cada muestra, añadir 800 μ l de *mWash 2DNA* a las muestras y resuspender las partículas magnéticas en el fluido de lavado mezclando suavemente 5 a 10 veces por aspiración y dispensar con una punta de pipeta. Lavar las partículas del lateral del tubo, si es necesario. NOTA: Cuando se añade el *mWash 2DNA*, dispensar el líquido lentamente para evitar salpicaduras.
- 10 33. Colocar los tubos en una plataforma de captura magnética durante 1 minuto para permitir que las partículas se capturen en el lateral de los tubos.
- 15 34. Con los tubos en la plataforma de captura magnética, utilizar una punta de pipeta de barrera para aerosoles de 1000 μ l nueva estéril para cada muestra para retirar cuidadosamente el *mWash 2DNA* de cada tubo y desechar el fluido en un recipiente de desechos líquidos. Retirar el fluido lo más completamente posible. NO alterar ni aspirar las partículas magnéticas capturadas.
- 20 35. Retirar los tubos del estante magnético y transferirlos al bloque de calentamiento a 80° C e incubar durante 15 minutos con las tapas abiertas para permitir la evaporación del etanol.
- 25 36. Usando una pipeta de precisión y una punta de pipeta de barrera para aerosoles de 1.000 μ l nueva estéril para cada muestra, añadir 250 μ l de *mElution BufferDNA* a las muestras y resuspender las partículas magnéticas en el fluido por aspiración y dispensar con la punta de la pipeta. Lavar las partículas del lateral del tubo, si es necesario.
- 30 37. Colocar los tubos en el bloque de calentamiento de 80° C, iniciar el temporizador e incubar durante 4 minutos.
- 35 38. Retirar los tubos del bloque de calentamiento de 80° C. Usando una punta de pipeta de barrera para aerosoles de 1000 μ l nueva estéril para cada muestra, mezclar la muestra y la mezcla de *mElution BufferDNA* 4 veces aspirando y dispensando 200 μ l.
- 40 39. Devolver los tubos al bloque de calentamiento de 80° C. Iniciar el temporizador e incubar durante 4 minutos.
- 45 40. Retirar los tubos del bloque de calentamiento de 80° C y colocarlos en una plataforma de captura magnética durante 1 minuto para permitir que las partículas se capturen en el lateral de los tubos.
- 50 41. Con los tubos en la plataforma de captura magnética, usar una punta de pipeta de barrera para aerosoles de 1000 μ l nueva estéril para cada muestra para retirar cuidadosamente la muestra eluída de los tubos. No alterar ni aspirar las micropartículas capturadas. La muestra(s) eluída puede colocarse en un tubo de microfuga de 1,5 ml nuevo marcado o en una placa de polipropileno de 96 pocillos. NOTA: El ensamblaje de la mezcla maestra de amplificación y la muestra se eluye en la placa de reacción óptica de 96 pocillos Abbott (paso 48) debe iniciarse en el plazo de 1 hora después de completar la preparación de la muestra.
- 55 42. Encender e inicializar el instrumento Abbott *m2000rt*. NOTA: El Abbott *m2000rt* requiere 15 minutos para calentarse.
- 60 43. Crear el orden de prueba del Abbott *m2000rt*. Consultar la sección de instrucciones de funcionamiento del manual de funcionamiento del Abbott *m2000rt*. Desde la pantalla de Protocolo, seleccionar el protocolo de aplicación de ensayo de MBT Abbott RealTime. NOTA: Quitar los guantes antes de volver al área de preparación de reactivos.
- 65 44. Preparar la mezcla maestra de amplificación. NOTA: Toda la preparación de reactivos debe tener lugar en el área de preparación de reactivos dedicada. Cambiarse los guantes antes de manipular los reactivos de amplificación. No agitar en vórtice ni invertir el paquete de reactivos de amplificación. Cada paquete de reactivos de amplificación soporta hasta 24 reacciones. Asegurarse de que los reactivos de amplificación estén completamente descongelados antes de su uso. Antes de abrir los reactivos de amplificación, asegurarse de que el contenido del paquete de reactivos de amplificación está en el fondo golpeando el paquete de reactivos de amplificación en una posición vertical en el banco para llevar el líquido al fondo de los viales. Identificar los reactivos de amplificación de la siguiente manera: Reactivo de activación (Reactivos 1); Reactivo de amplificación de MTB (Reactivos 2); ADN polimerasa (Reactivos 3); Retirar y desechar las tapas. Usando una pipeta de precisión calibrada dedicada solo para uso de reactivos, añadir 298 μ l de Reactivo de activación (Reactivos 1) y 418 μ l de Reactivo de Amplificación de MTB (Reactivos 2) a la botella de ADN Polimerasa (Reactivos 3) para hacer la mezcla maestra. Mezclar pipeteando suavemente hacia arriba y hacia abajo 5 veces. Evitar crear espuma.
- 65 45. Pipetear el contenido de la mezcla maestra de la botella de ADN Polimerasa en un tubo de microcentrifuga de 1,5 ml (Lista No. 4J71-50 o equivalente). Mezclar pipeteando suavemente hacia arriba y hacia abajo 5 veces. Evitar crear espuma.
- 65 46. Colocar una placa de reacción óptica de 96 pocillos Abbott en la base de soporte sin salpicaduras Abbott para evitar la contaminación. La contaminación del fondo de la placa de reacción óptica de 96 pocillos Abbott con materiales fluorescentes podría interferir potencialmente con el ensayo de MTB. La placa de reacción óptica de 96 pocillos Abbott debe sostenerse y transportarse con la base de soporte sin salpicaduras Abbott para minimizar la contaminación.
- 65 47. Usando una pipeta de precisión dedicada solamente para el uso con reactivos, dispensar alícuotas de 25 μ l de la mezcla maestra de amplificación en cada pocillo de la placa de reacción óptica de 96 pocillos Abbott que se usará para procesar las muestras y los controles. Puede usarse una pipeta de repetición calibrada. Añadir la mezcla maestra en un orden que comienza con la columna 1 (de arriba a abajo) y se mueve a cada

- columna consecutiva de izquierda a derecha. Verificar visualmente que se hayan dispensado 25 μ l en cada pocillo. Transferir la placa de reacción óptica de 96 pocillos Abbott en la base de soporte sin salpicaduras Abbott al área de preparación de muestras.
- 5 48. Usando una pipeta de precisión y una punta de pipeta de barrera para aerosoles de 200 μ l nueva estéril para cada muestra, transferir 25 μ l de cada muestra eluida a la Placa de reacción óptica de 96 pocillos Abbott. Durante la transferencia de cada muestra, mezclar la reacción final pipeteando hacia arriba y hacia abajo de 3 a 5 veces. Verificar visualmente que se haya dispensado un total de 50 μ l en cada pocillo.
- 10 49. Sellar la placa de reacción óptica de 96 pocillos Abbott de acuerdo con las instrucciones del manual de instrucciones del Abbott *m2000rt*, sección de instrucciones de funcionamiento.
- 10 50. Centrifugar la placa de reacción óptica de 96 pocillos Abbott en la base de soporte sin salpicaduras Abbott a 5000 g durante 5 minutos.
- 15 51. Transferir la placa de reacción óptica de 96 pocillos Abbott en la base de soporte sin salpicaduras Abbott al área de amplificación. NOTA: El protocolo del Abbott *m2000rt* (paso 52) debe iniciarse en el plazo de 90 minutos después del inicio de la adición de la mezcla maestra y la preparación de la placa de PCR (paso 44).
- 15 52. Colocar la placa de reacción óptica de 96 pocillos Abbott en el instrumento Abbott *m2000rt*, seleccionar el orden de prueba creado (paso 43) e iniciar el protocolo de aplicación de ensayo de MBT Abbott RealTime, como se describe en el manual de funcionamiento del Abbott *m2000rt*, sección de instrucciones de funcionamiento. Al finalizar la ejecución, los resultados del ensayo se informan en el Abbott *m2000rt*.

20 EJEMPLO 5

Datos experimentales - Inactivación

25 Se evaluó la efectividad de la muerte de TB de IR. En este experimento, las muestras que contienen MTB (MTB cultivada que se diluyó a concentraciones de MTB conocidas antes de la inactivación, así como los sedimentos de NALC-NaOH que contienen MTB) se sometieron al procedimiento de inactivación del Ejemplo 3. Despues de la inactivación, se eliminó el reactivo de inactivación en exceso mediante centrifugación/lavado y las células supervivientes se colocaron en cultivo MGIT durante hasta 42 días o seis semanas. Esta duración es el tiempo más largo recomendado para el cultivo de MTB; la mayoría de los especímenes positivos para MTB darán 30 como resultado un crecimiento de cultivo detectable en el plazo de 20 días desde el inicio del cultivo). La Tabla 5 siguiente ilustra los resultados obtenidos cuando se prueban las muestras cultivadas después de la inactivación. El Control Positivo (PC), que consiste de MTB no inactivada, demostró crecimiento en el plazo esperado de 20 días, mientras que el control negativo (NC), no mostró crecimiento.

35 Tabla 5. Inactivación de células de MTB a alta concentración cultivadas.

Resumen del estudio de reducción del riesgo de infección por MTB

Estudio	Número de muestras aisladas	UFC/ml	Muestras positivas sin tratamiento		Muestras positivas con tratamiento	
			IR	IR	IR	IR
40	1	3 ^a	1 x 10 ⁸	3 x 1	3 de 3	3 x 3
			1 x 10 ⁷	3 x 1	3 de 3	3 x 3
			1 x 10 ⁶	3 x 1	3 de 3	3x3
45	2	20 ^b	N/A	20 x 1	20 de 20	20 x 1
						0 de 20
	3	31 ^b	N/A	31 x 1	31 de 31	31 x 1
						0 de 31

^a Muestras de aislados cultivados

^b Muestras de aislados clínicos

50 Estos datos demuestran la efectividad del procedimiento de inactivación para la inactivación de MTB.

EJEMPLO 6

Inclusividad analítica

55 Se obtuvieron ocho subespecies y 20 muestras de complejo de MTB (*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. canettii*, *M. microti*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*.) de la ATCC (*M. canettii* se recibió del Public Health Research Institute) y se analizaron de 10 a 100 copias/reacción de ADN genómico (ver Tabla 6). Las 8 subespecies se detectaron en ambos niveles.

60

65

Tabla 6. Subespecies de complejos de MTB probadas

Nombre	Nombre
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> 25177D-5 (H37Ra)	<i>M pinnipedii</i> BAA-688D
<i>M tuberculosis</i> 25618D-5 (H37Rv)	<i>M bovis</i> BCG 35747D
<i>M microti</i> 11152	<i>M caprae</i> BAA-824D
<i>M microti</i> 19422	<i>M tuberculosis</i> BAA-2236D
<i>M africanum</i> 25420	<i>M tuberculosis</i> BAA-2237D
<i>M africanum</i> 35711	<i>M tuberculosis</i> 27294D
<i>M bovis</i> 35735	<i>M tuberculosis</i> BAA-2234D
<i>M bovis</i> 19274	<i>M tuberculosis</i> 35822D
<i>M bovis</i> BCG 35746	<i>M tuberculosis</i> 35838D
<i>M canettii</i>	<i>M tuberculosis</i> BAA-2235D

5 Se probaron cuarenta y seis ADN aislados de MTB filogenéticamente y geográficamente diversos (> 50% con MDR) obtenidos del Public Health Research Institute de 25 a 100 copias/reacción de ADN genómico (Figura 2). Se 20 detectaron todas las subespecies probadas.

EJEMPLO 7

Especificidad analítica

25 Se añadió ácido nucleico purificado de diferentes micobacterias, virus y otros microorganismos (n=80) a concentraciones objetivo de 1e5 a 1e7 genomas/ml y microorganismos cultivados a 1×10^6 ufc/ml al control negativo de MTB para evaluar el efecto de los potenciales reactivos cruzados en los resultados del ensayo de MTB para 30 especímenes negativos de MTB. Se añadió ácido nucleico purificado de diferentes micobacterias, virus y otros microorganismos a concentraciones específicas de 1×10^6 a 1×10^7 genomas por mililitro y microorganismos 35 cultivados a 1e6 ufc/ml a muestras positivas para MTB para evaluar el efecto de los potenciales reactivos cruzados en los resultados del ensayo de MTB para muestras positivas para MTB. Las muestras positivas para MTB se prepararon diluyendo el stock de células de MTB inactivado por calor en control negativo a una concentración objetivo de 1000 copias/ml (cuantificada usando una curva de ADN genómico). No se detectó ninguna de las muestras negativas de MTB probadas con los potenciales reactivos cruzados. Se detectaron las 80 muestras positivas para MTB analizadas con potenciales reactivos cruzados.

40

45

50

55

60

65

Tabla 7
Microorganismos probados para determinar la especificidad analítica

Especies		
5	<i>Mycobacterium abscessus</i>	<i>Mycobacterium sphagni</i>
	<i>Mycobacterium austroafricanum</i>	<i>Escherichia coli</i>
	<i>Mycobacterium avium</i>	Virus del herpes simple 1
	<i>Mycobacterium avium ssp. avium</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	<i>Mycobacterium avium ssp.</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
10	<i>Mycobacterium celatum</i>	<i>Legionella pneumophila</i>
	<i>Mycobacterium chelonae</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
	<i>Mycobacterium chitae</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>
	<i>Mycobacterium fallax</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
15	<i>Mycobacterium flavescens</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
	<i>Mycobacterium fortuitum</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	<i>Mycobacterium gastri</i>	<i>Salmonella choleraesuis</i>
	<i>Mycobacterium gordoneae</i>	<i>Serratia marcescens</i>
	<i>Mycobacterium intracellulare</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
20	<i>Mycobacterium kansasii</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
	<i>Mycobacterium lentiflavum</i>	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
	<i>Mycobacterium marinum</i>	<i>Staphylococcus hominis</i>
	<i>Mycobacterium neoaurum</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
25	<i>Mycobacterium</i>	<i>Streptococcus gordoneae</i>
	<i>Mycobacterium phlei</i>	<i>Streptococcus mitis</i>
	<i>Mycobacterium pneumoniae</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
	<i>Mycobacterium pulvuris</i>	<i>steotococos neumonia</i>
30	<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
	<i>Mycobacterium shimoidei</i>	<i>Streptomyces griseinus</i>
	<i>Mycobacterium simiae</i>	Virus de la varicela zoster
	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	<i>Veillonella parvula</i>

35

EJEMPLO 8

Sensibilidad analítica

40

Se diluyó en serie un panel de MTB, cepa H37Rv a 40 ufc/ml en esputo negativo para MTB agrupado para generar un panel de sensibilidad. Se probaron 16 réplicas de cada dilución. Se observó una tasa de detección del 100% en todas las diluciones de 160 veces y menos. Los resultados se muestran en la Tabla 8.

45 Tabla 8. Sensibilidad analítica determinada probando diluciones en serie de un panel de MTB

		AM MTB en tiempo real	
		Ct cortado 42	Ct cortado 39
		Dilución en serie	de 40 ufc/ml
50	1	0	16/16
	2	2	16/16
	3	4	16/16
	4	8	16/16
55	5	20	16/16
	6	40	16/16
	7	80	16/16
	8	160	13/16
60	9	320	15/16
	10	640	8/16
	11	1278	4/16
	12	2564	3/16
65	13	5128	1/16
			0/16

EJEMPLO 9

Especificidad clínica

5 Se probaron muestras de NALC con cultivo negativo (n=155), muestras de esputo (n=23) y BAL (n=28) (las muestras de NALC eran de población sospechosa de tener MTB. Las muestras de esputo y BAL eran de pacientes sin síntomas de TB) para determinar especificidad clínica (ver datos resumidos en la tabla 10 siguiente). La especificidad para las muestras de esputo y BAL fue del 100%. La especificidad para las muestras de NALC fue del 98,7% con una especificidad general del 99%.

10

Tabla 9. Especificidad clínica determinada al analizar muestras negativas de TB.

Tipo de muestra	Definición de especificidad	Números probados	Resultados negativos	Resultados positivos	Especificidad
NALC	cultivo sospechoso de TB negativo	155	153	2	98,7%
Esputo	Sin síntomas de TB	23	23	0	100%
BAL	Sin síntomas de TB	28	28	0	100%
Total		206	204	2	99%

20

Tabla 10. Se probaron muestras positivas de cultivo de TB (incluyendo frotis tanto positivos como negativos) mediante ensayo de MBT (AM) frente a otro ensayo comparador (Comparador)

TUBO Nº	TIPO DE ESPECIMEN	RESULTADOS DEL CULTIVO	FAM Ct	MR	CY5 Ct	MR	AM	Comparador
39	ESPUTO	TB	15,91	0,218	34,50	0,166	Detectedo	alto
38	ESPUTO	TB	16,76	0,225	34,55	0,176	Detectedo	alto
35	ESPUTO	TB	19,88	0,238	33,34	0,175	Detectedo	alto
23	ESPUTO	TB	20,77	0,233	33,21	0,169	Detectedo	medio
30	BAL	TB	21,79	0,226	33,18	0,177	Detectedo	alto
25	ESPUTO	TB	22,28	0,222	33,54	0,171	Detectedo	error
61	ESPUTO	TB	22,84	0,227	33,96	0,179	Detectedo	medio
45	ESPUTO	TB	23,67	0,227	33,13	0,177	Detectedo	alto
44	ASPIRADO	TB	25,06	0,243	33,25	0,181	Detectedo	alto
34	ESPUTO	TB	25,50	0,230	33,08	0,184	Detectedo	medio
63	ESPUTO	TB	27,55	0,245	32,99	0,141	Detectedo	bajo
21	ESPUTO	TB	27,61	0,229	33,54	0,187	Detectedo	medio
33	ASPIRADO	TB	27,63	0,247	33,31	0,182	Detectedo	medio
26	BAL	TB	28,05	0,248	33,70	0,187	Detectedo	medio
58	ESPUTO	TB	28,26	0,215	33,88	0,177	Detectedo	medio
32	ESPUTO	TB	29,26	0,225	36,49	0,177	Detectedo	bajo
28	ESPUTO	TB	29,43	0,241	33,15	0,197	Detectedo	bajo
42	ESPUTO	TB	29,82	0,228	35,19	0,184	Detectedo	medio
60	ESPUTO	TB	30,14	0,222	34,24	0,179	Detectedo	bajo
59	ESPUTO	TB	30,21	0,229	34,70	0,185	Detectedo	bajo
29	ESPUTO	TB	30,68	0,229	34,19	0,188	Detectedo	bajo
57	ESPUTO	TB	31,31	0,231	34,40	0,192	Detectedo	bajo
24	ESPUTO	TB	31,70	0,239	35,37	0,191	Detectedo	bajo
31	ESPUTO	TB	32,73	0,189	-1	0,008	Detectedo	bajo
62	ESPUTO	TB	33,12	0,237	34,52	0,185	Detectedo	bajo
27	LAVADO DE BRONQUIOS	TB	35,00	0,232	34,55	0,185	Detectedo	No detectado
55	TEJIDO PULMONAR	TB	36,67	0,212	34,76	0,176	Detectedo	no probado*
53	TEJIDO PULMONAR	TB	37,71	0,277	35,94	0,177	Detectedo	No detectado

65

(continuación)

TUBO Nº	TIPO DE ESPECIMEN	RESULTADOS DEL CULTIVO	FAM Ct	MR	CY5 Ct	MR	AM	Comparador
5	51	ESPUTO	TB	38,19	0,142	-1	0,003	Detectedo no probado*
	46	ESPUTO	TB	38,58	0,161	34,58	0,185	Detectedo No detectado
10	22	BAL	TB	-1	0,003	34,05	0,174	No detectado No detectado
	36	ESPUTO	TB	-1	0,006	34,60	0,191	No detectado No detectado
15	37	ESPUTO	TB	-1	0,004	35,90	0,178	No detectado No detectado
	40	ESPUTO	TB	-1	0,004	34,42	0,178	No detectado No detectado
20	41	ESPUTO	TB	-1	0,002	34,79	0,182	No detectado No detectado
	43	ESPUTO	TB	-1	0,004	34,97	0,165	No detectado No detectado
25	48	BAL	TB	-1	0,005	34,97	0,165	No detectado No detectado
	49	ESPUTO	TB	-1	0,001	34,58	0,168	No detectado No detectado
30	50	ESPUTO	TB	-1	0,005	35,14	0,184	No detectado No detectado
	54	ESPUTO	TB	-1	0,006	34,64	0,173	No detectado No detectado

* muestra "no probada" debido a volumen insuficiente

El MTB en tiempo real mostró una mejor sensibilidad en muestras de baja resolución en comparación con el ensayo del comparador.

35 EJEMPLO 10

Rendimiento analítico y clínico del ensayo de MTB

Este ejemplo describe el rendimiento analítico del ensayo de detección de MTB en tiempo real.

40 Materiales y métodos

El flujo de trabajo para el ensayo MTB en tiempo real se describe en la Figura 1.

45 Inactivación de muestra

Se prepararon 500 ml de reactivo de inactivación (IR) combinando los siguientes componentes: 20 ml de NaOH 10 M, 300 ml de isopropanol, 0,9 ml de Tween-20 y 179,1 ml de agua purificada. Una vez preparado, el IR fue estable durante hasta un mes a temperatura ambiente. Si se congelaron, los especímenes se descongelaron (especímenes no procesados o procesados con sedimentos de NALC) a de 15º C a 30º C. Se añadieron aproximadamente tres volúmenes de IR a cada volumen de muestra (el volumen de espécimen mínimo permitido es 0,3 ml). Se mantuvo la misma proporción de volumen de muestra: IR independientemente del tipo de muestra (no procesada o sedimento de NALC). La mezcla se agitó en vórtice dos veces durante de 20 a 30 segundos cada durante la primera hora de incubación a temperatura ambiente. El tiempo de incubación validado fue de una a 24 horas. El proceso de inactivación tuvo lugar bajo una biocampana. Una vez completado, las muestras inactivadas se retiraron de debajo de una biocampana y luego se sometieron a la preparación de muestras fuera de la biocampana. Se demostró que el proceso de inactivación reducía efectivamente la viabilidad de MTB en tres laboratorios diferentes usando MTB cultivado añadido a sedimentos de NALC de esputo, sedimentos de NALC clínicos positivos para MTB y muestras de esputo positivas para cultivo/frotis de MTB (Qi C., et al., Effectiveness of the sample inactivation procedure employed by the new Abbott RealTime assay for the detection of *Mycobacterium tuberculosis*, 24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID) 2014).

Preparación de la muestra

65 Los especímenes tratados con IR y los controles del ensayo se cargaron en un instrumento *m2000sp* donde

5 se aisló el ADN usando tecnología de tiocianato de guanidinio-micropartículas magnéticas para capturar ácidos nucleicos seguido de lavados para eliminar los componentes no unidos. Se añadió un control interno (IC) al inicio de la preparación de la muestra. Los ácidos nucleicos unidos se eluyeron y se transfirieron a una placa de 96 pocillos profundos. Al finalizar la preparación de la muestra, se usó el *m2000sp* para crear una mezcla maestra de 10 amplificación que consiste de AmpliTaq Gold Polymerase, un reactivo de activación de cloruro de magnesio y un reactivo de oligonucleótidos que contiene cebadores, sondas y dNTP. El *m2000sp* se usó para dispensar aliquotas de 25 μ l de la mezcla maestra seguido de aliquotas de 25 μ l de los eluidos extraídos a una placa de reacción óptica de 96 pocillos. La placa se selló manualmente y se transfirió al *m2000rt* para PCR en tiempo real. Como alternativa al *m2000sp*, la preparación de la muestra, la preparación de la mezcla maestra, y la configuración de la placa de PCR pueden realizarse manualmente.

Amplificación y detección

15 Se usó el instrumento *m2000rt* para amplificación y detección de fluorescencia en tiempo real. La detección de miembros del complejo MTB (Warren RM, et al., *Int J Tuberc Lung Dis* 2006;10:818-822) se logró mediante el uso de dos conjuntos de cebadores; uno dirigido al elemento de inserción IS6110 (Thierry D, et al., *Nucleic Acids Res* 1990;18:188) y uno al gen PAB (Anderson AB, Hansen EB *Infect Immun* 1989;57:2481-2488). La señal para la 20 detección del complejo de MTB se generó con el uso de sondas marcadas con fluorescencia. Las sondas de objetivo doble de MTB están marcadas cada una con el fluoróforo FAM en el extremo 5' y el Black Hole Quencher (BHQ1) en el extremo 3'. Por tanto, las señales de MTB de tanto IS6110 como PAB se detectan en el mismo canal FAM. El ciclo 25 de amplificación en el que se detecta la señal fluorescente FAM es proporcional al registro de la concentración de ADN de MTB presente en la muestra original. La sonda para control interno (IC) está marcada con Quasar en el extremo 5' y el Black Hole Quencher BHQ2 en el extremo 3' para permitir que las señales de IC y objetivo sean distinguibles en un solo pocillo de PCR.

Controles de ensayo

30 Se usó un mínimo de una réplica del Control Negativo y una réplica del Control Positivo para determinar la validez de la ejecución. El Control Negativo consistió de tampón TE y conservantes. El Control Positivo consistió de ADN plasmídico que contenía las secuencias objetivo IS6110 y PAB diluidas en tampón TE con 1,5 g/ml de poli dA:dT y conservantes. El IC consistió de ADN plasmídico que contenía un inserto de secuencia de hidroxipiruvato 35 reductasa de calabaza (HPR) diluido en tampón TE con 1,5 g/ml de poli dA:dT y conservantes. Se añadió IC al inicio de la preparación de la muestra, que sirve como control para la recuperación de la preparación de la muestra, la inhibición de la muestra y la eficiencia de amplificación. El IC no controló el procedimiento de inactivación. Se usó la diferencia del valor del ciclo de umbral de IC (Ct) entre cada muestra y los controles de ejecución para evaluar la validez de cada resultado de la muestra.

Paneles y especímenes clínicos

40 Subespecies de complejos de MTB: Se obtuvieron diecinueve muestras de ADN de subespecies de complejos de MTB de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) y una (*M. canetti*) fue proporcionada amablemente por Ibis Biosciences (Carlsbad, CA). Se probaron un total de 20 cepas de complejos de MTB, incluyendo *M. africanum* 25420, *M. africanum* 35711, *M. bovis* 35735, *M. bovis* 19274, *M. bovis* BCG 35746, *M. bovis* BCG 35747D, *M. canetti*, *M. caprae* BAA-824D, *M. microti* 11152, *M. microti* 19422, *M. pinnipedii* BAA-45 688D, MTB 25177D-5 (H37Ra), MTB 25618D-5 (H37Rv), MTB BAA-2236D, MTB BAA-2237D, MTB 27294D, MTB BAA-2234D, MTB 35822D, MTB 35838D, MTB BAA-2235D. Adicionalmente, se obtuvieron 46 cepas de las subespecies de MTB, que incluían los tres grupos genéticos principales y nueve grupos genéticos del Dr. Barry Kreiswirth de la University of Medicine and Dentistry New Jersey (Newark, NJ) (Mathema B, et al., *Current Insights, Clinical Microbiology Reviews* 2006;19:658-685)) El ADN de las 20 subespecies del complejo de MTB obtenido de la 50 ATCC e Ibis se probó directamente usando las concentraciones de ADN informadas según lo determinado por el método PicoGreen® NanoDrop. Las otras 46 concentraciones de ADN se determinaron usando mediciones PicoGreen® NanoDrop en Abbott Molecular con la excepción de tres muestras en las que no se pudieron obtener tales mediciones debido al bajo volumen e impurezas. Estas tres muestras se diluyeron en una proporción de muestra a agua de 1:600 y se probaron directamente.

55 Límite de detección [LOD]: se preparó un panel H37Rv de MTB dirigido a 1×10^5 unidades formadoras de colonias (ufc/ml) por Zeptometrix (Buffalo, NY). Se combinaron tres aliquotas de un ml del panel Zeptometrix y se centrifugaron a 3.000 x g durante 15 minutos para eliminar el ADN de MTB libre en el sobrenadante. El sedimento celular se resuspendió en tres ml de tampón TE para mantener la concentración de 1×10^5 ufc/ml. Luego, las células 60 se añadieron a un grupo de esputo, que se homogeneizó usando un batido de perlas, para obtener los siguientes paneles de dilución que contienen MTB: 80 ufc/ml, 50 ufc/ml, 25 ufc/ml, 10 ufc/ml, 5 ufc/ml, 1 ufc/ml, 0,50 ufc/ml, 0,10 ufc/ml y 0,05 ufc/ml.

65 Especificidad analítica: los miembros del panel de especificidad analítica se obtuvieron de la siguiente manera: se obtuvieron citomegalovirus, virus del herpes simple 1 y virus varicela-zoster de Advanced Biotechnology

Inc. (Columbia, MD), se obtuvieron 69 especies micobacterianas y otros microorganismos de ATCC, y ocho aislados bacterianos se cultivaron en Abbott Molecular.

Sustancias potencialmente interferentes: Se obtuvieron los siguientes materiales para esta prueba: sangre,

5 ADN de células humanas, ácido gástrico, solución salina hipertónica, solución salina fisiológica, medio de cultivo, material de sedimento de NALC, cinco medicamentos anti-TB (isoniazida, rifampicina, estreptomicina, pirazinamida, Etambutol) y moco bovino.

10 **Transferencia:** se prepararon dos muestras: una muestra de MTB altamente positiva que contenía 1×10^7 copias/ml de un plásmido que contenía las secuencias objetivo del ensayo y una muestra negativa.

15 **Reproducibilidad:** se prepararon dos muestras: una muestra positiva que contenía una concentración de MTB de ~ tres veces la LOD de ensayo reivindicada y una muestra negativa.

20 **Especímenes clínicos:** Se recogieron por Discovery Life Sciences (Los Osos, CA) 198 especímenes de esputo de pacientes sospechosos de tener TB en Rusia, Sudáfrica, Uganda y Vietnam. Se obtuvieron 150 especímenes de esputo de Vietnam del banco de especímenes operado por la Foundation for Innovative New Diagnostics (FIND) (Ginebra, Suiza). Se obtuvieron 234 especímenes de NALC del Northwestern University Memorial Hospital (Chicago, IL). Todos los especímenes de pacientes se recogieron bajo pautas éticas. No se determinó el estado del VIH de los pacientes. Para todos los especímenes, se realizaron pruebas de frotis (cuando estaban disponibles) y de cultivo cerca del sitio de recogida, mientras que las pruebas de ensayo de MTB de Abbott RealTime se realizaron en Abbott Molecular.

Resultados

25 *Detección de subespecies complejas de MTB*

Este estudio se realizó para determinar si los cebadores y sondas específicos usados en los ensayos de MTB detectarían las siguientes ocho subespecies de complejos de MTB: *M. africanum*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. canettii*, *M. caprae*, *M. microti*, *M. pinnipedii* y *M. tuberculosis*. Se probaron dos conjuntos de ADN de complejos de MTB purificados. El primer conjunto de 20 ADN purificados contenía representantes de las subespecies de MTB mencionadas anteriormente. Cada ADN purificado se probó a dos concentraciones (100 y 10 genomas/reacción) probándose cuatro replicados por concentración. A 100 genomas de MTB por nivel de reacción, se detectaron los cuatro replicados de cada una de las 20 cepas de MTB. A 10 genomas de MTB por nivel de reacción, se detectaron los cuatro replicados de 17 de las cepas. Para tres cepas (dos *M. bovis* y una *M. bovis* BCG) se detectaron dos de los cuatro replicados (Figura 4) El segundo conjunto de 46 cepas de MTB de la subespecie de MTB se probó a dos concentraciones: 100 genomas/reacción y 25 genomas/reacción. Se probaron cuatro replicados de cada ADN a cada concentración. Todas los replicados probados fueron positivos a ambas concentraciones (Figura 2)

40 *Límite de detección (LOD)*

Se hizo una serie de dilución de nueve niveles a partir de células H37Rv de la cepa de MTB diluidas en un grupo de esputo homogeneizado con perlas de vidrio. Los miembros del panel en la serie de dilución se dirigieron a las siguientes concentraciones: 80 ufc/ml, 50 ufc/ml, 25 ufc/ml, 10 ufc/ml, 5 ufc/ml, 1 ufc/ml, 0,50 ufc/ml, 0,10 ufc/ml y 0,05 ufc/ml. Se probaron veinte replicados de cada miembro del panel en cuatro rondas usando el ensayo de MTB de Abbott RealTime. El estudio se realizó usando un lote de reactivos de ensayo de MTB y control. El nivel de significancia para este estudio fue de 0,05. La tasa de detección se calculó para cada concentración objetivo (Tabla 11). Se ajustó un modelo de regresión Probit, basado en las concentraciones objetivo y la tasa de detección utilizando PROC PROBIT en SAS, con la concentración objetivo (X) como la variable independiente y la tasa de detección P (Y = 1) como la variable de respuesta. El análisis Probit de los datos determinó que la concentración de MTB detectada con un 95% de probabilidad fue de 2,45 ufc/ml (IC del 95%: 1,44 a 6,10 ufc/ml). La sensibilidad analítica reivindicada del ensayo de MTB de Abbott RealTime es de 17 ufc/ml en esputo homogeneizado agrupado usando la cepa H37Rv de MTB.

55 *Especificidad analítica*

Cada uno de los 80 reactivos cruzados potenciales se probó tanto en una muestra positiva para MTB como en una muestra negativa para MTB. Se añadió ácido nucleico de cada micobacteria, virus u otro microorganismo con reacción cruzada potencial a una concentración objetivo de 1×10^5 a 1×10^7 copias o genomas por ml a las muestras positivas para MTB (que contienen 1.000 genomas de MTB/ml) y las muestras negativas para MTB. Se añadieron microorganismos cultivados a una concentración objetivo de 1×10^6 ufc/ml a las muestras positivas para MTB y las muestras negativas para MTB. Los resultados del ensayo para las 80 muestras negativas se informaron como "MTB no detectado". Los resultados del ensayo para las 80 muestras que contienen MTB se informaron como "MTB detectado" (Tabla 7).

65

Sustancias potencialmente interferentes

El potencial de interferencia en los resultados de prueba se evaluó con sustancias que pueden estar presentes en el sistema respiratorio. Las muestras negativas para y positivas para MTB (500 copias/ml) se analizaron en ausencia o en presencia de cada sustancia potencialmente interferente con niveles elevados de moco bovino, sangre, ADN de células humanas, ácido gástrico, solución salina hipertónica, solución salina fisiológica, medio de cultivo, material de sedimento de NALC y cinco medicamentos anti-TB (isoniazida, rifampicina, estreptomicina, pirazinamida, etambutol) (Tabla 12). Los resultados no mostraron interferencia en el rendimiento del ensayo de MTB en presencia de altos niveles de sangre, ADN de células humanas, ácido gástrico, solución salina hipertónica, solución salina fisiológica, medio de cultivo, material de sedimento de NALC y cinco medicamentos anti-TB (isoniazida, rifampicina, estreptomicina, pirazinamida, etambutol). Se observó interferencia del ensayo de MTB de Abbott RealTime en presencia de moco bovino al 8,3% (los cinco replicados fueron falsos negativos o inhibidos) y al 5,0% (uno de los cinco replicados fue falso negativo). No se encontraron interferencias a concentraciones de moco bovino del 2,5% o menos.

Transferencia

Para evaluar el potencial de transferencia de muestras de MTB positivas altas a muestras negativas cuando se usa el ensayo de MTB de Abbott RealTime, se ejecutan cinco rondas del sistema m2000 que consistían de 96 muestras (Control positivo, Control negativo, 46 muestras positivas altas a 1×10^7 copias/ml y 46 muestras negativas) en las que las muestras positivas altas se intercalaron entre muestras negativas. La concentración de MTB en la muestra positiva alta de 1×10^7 copias/ml dio como resultado un valor de Ct que era anterior al 95% o más de los resultados obtenidos de los especímenes de la población positiva para MTB probadas con el ensayo de MTB. El ensayo no mostró ninguna transferencia de muestras positivas altas a las 230 muestras negativas en las cinco rondas. Se completó una ronda de 96 muestras en menos de 8 horas.

Reproducibilidad

Se realizó una prueba de reproducibilidad para evaluar la repetibilidad del ensayo de MTB de Abbott RealTime en el sistema m2000 y la compatibilidad entre el instrumento Abbott m2000sp y el método de preparación de muestras manual. El estudio se realizó con un panel positivo a tres veces el nivel de LOD reivindicado y un panel negativo. El estudio se realizó por cuatro operadores usando dos lotes de reactivos de amplificación MTB: dos operadores realizando rondas con un instrumento Abbott m2000sp y dos operadores realizando rondas usando preparación de muestras manual. Para cada método de preparación de muestras, los dos operadores usaron un lote único de Abbott RealTi me los reactivos de amplificación de MTB de Abbott RealTime y probaron cada miembro del panel en replicados de ocho, una vez al día, durante cinco días, para un total de 40 replicados por miembro del panel (80 replicados totales por miembro del panel por método; 160 en total probados con preparación de muestra de instrumento m2000sp y 160 en total probados con preparación de muestra manual). La concordancia general con los resultados esperados fue del 100% (159/159, una muestra no fue válida debido a un error del instrumento) con un IC inferior al 95% del 98,1% para las muestras preparadas con el instrumento Abbott m2000sp o con preparación de muestra manual. El ensayo MTB es compatible tanto con el instrumento Abbott m2000sp como con el método de preparación de muestras manual de Abbott.

Sensibilidad y especificidad clínica.

Se analizó un esputo o un sedimento de NALC de cada uno de los 582 pacientes sospechosos de TB. Se recogieron muestras de Rusia, Sudáfrica, Uganda, Estados Unidos y Vietnam. Cada espécimen se dividió para permitir la prueba de MTB en una aliquota y frotis y cultivo en la segunda aliquota. Las muestras de prueba fueron cegadas y la decodificación del resultado final se realizó mediante el grupo estadístico AM. Para las pruebas de MTB, dos muestras generaron un resultado de IC no válido, y cuatro resultados de especímenes adicionales dieron códigos de error del m2000. La frecuencia de los especímenes clínicos con resultados no válidos medidos por inhibición fue del 0,3% (2/582), mientras que la tasa no válida, incluyendo tanto los errores de inhibición como los de los instrumentos, fue del 1,0% (6/582). Se excluyeron del análisis cinco especímenes negativos de cultivo que fueron positivos tanto por el ensayo de MTB descrito en la presente como por un NAAT de MTB disponible comercialmente. Se incluyeron un total de 571 muestras válidas para el análisis de datos. La sensibilidad global de MTB frente al cultivo fue del 93% (198/212). La sensibilidad del ensayo fue del 99% (147/149) en especímenes de frotis positivo, cultivo positivo, y del 81% (51/63) en muestras frotis negativo, cultivo positivo. La especificidad fue del 97% (348/359) (Tabla 13). 76 de las muestras negativas para MTB contenían micobacterias no tuberculosas (NTM). De estas, 38 eran MAC (complejo *M. avium*), siete eran *M. gordonaiae*, cinco eran *M. chelonae/abcessus*, tres eran *M. xenopi* y 18 contenían otras especies micobacterianas. Con el ensayo de MTB descrito en la presente, todos los resultados de la muestra NTM fueron "MTB no detectado", con la excepción de dos muestras que produjeron resultados de "MTB detectado" con valores tardíos de CN (>38) en comparación con el corte del ensayo de 40. El valor de especificidad del 97% resultante de la prueba de la población de NTM es similar a la especificidad observada cuando se prueba la población no NTM. Además, 500 muestras de esputo de pacientes no sospechosos de TB recogidas de la población de los Estados Unidos mostraron resultados de prueba negativos para

TB al 100%.

Tabla 11

Límite de detección					
	Concentración objetivo (ufc/ml)	Número probado	Número detectado	Tasa de detección	Porcentaje detectado
5	80	20	20	1,00	100
	50	20	20	1,00	100
10	25	20	20	1,00	100
	10	20	20	1,00	100
	5	20	20	1,00	100
	1	20	18	0,90	90
15	0,50	20	7	0,35	35
	0,10	20	2	0,10	10
	0,05	20	1	0,05	5

Un análisis probit de los datos de MTB de Abbott RealTime determinó que la concentración de MTB detectada con un 95% de probabilidad fue de 2,45 ufc/ml en el punto de corte CN 40 (intervalo de confianza del 95% de 1,44 a 6,10 ufc/ml).

Tabla 12

Potenciales sustancias interferentes y sus concentraciones/porcentajes probados para determinar la susceptibilidad a las sustancias interferentes

	Sustancia potencialmente interferente	Fuente de muestra	Concentración/Porcentaje
	Moco	Esputo	Mucina 5% (p/v)
	Sangre	Esputo o BAL	5% (v/v)
30	ADN de células humanas	Esputo, BAL, NALC	10 ⁶ células/ml
		Sedimentos de esputo/BAL	
	Ácido gástrico	Esputo/BAL	pH 3 a 4 HCl en agua, neutralizado a pH 6 a 8 con bicarbonato de sodio
35	Solución salina hipertónica usada para inducir esputo	Esputo	NaCl (5% p/v)
	Solución salina fisiológica usada para recoger BAL	BAL	NaCl (0.9% p/v)
40	Medio de cultivo	Cultivo de MTB	100%
	Material usado para resuspender sedimentos de NALC	Sedimentos de NALC	fosfato 0.067 M, pH 6.8
	Isoniazida (medicamento anti-TB)	Esputo o BAL	90 mg/ml
45	Rifampicina/Rifampicina (medicamento anti-TB)	Esputo o BAL	120 ug/ml
	Estreptomicina (medicamento anti-TB)	Esputo o BAL	400 ug/ml
	Pirazinamida (medicamento anti-TB)	Esputo o BAL	500 ug/ml
50	Etambutol (medicamento anti-TB)	Esputo o BAL	60 ug/ml

Tabla 13

Sensibilidad y especificidad obtenidas cuando se prueban especímenes clínicos
Resultados de cultivo/frotis

	C +/S +	Sensibilidad C +/S -	C +	Especificidad C-
	99%	81%	93%	97%
60	MTB en tiempo real (147/149)	(51/63)	(198/212)	(348/359)

EJEMPLO 11**Reactivos de inactivación**

65

Este ejemplo describe los reactivos de inactivación para su uso en ensayos de detección de MTB. El ensayo es un NAAT para la detección de ADN de complejo de MTB en especímenes respiratorios (esputo, lavado alveolar bronquial (BAL) y sedimentos de N-acetil-L-cisteína (NALC) de esputo y lavado alveolar bronquial (BAL). Se desarrollaron un reactivo de inactivación de muestra y procedimiento para licuar muestras viscosas y reducir la viabilidad de MTB para permitir la realización de pruebas seguras de muestras fuera de vitrinas de bioseguridad. El estudio fue evaluar la efectividad del procedimiento de inactivación de muestras y determinar la estabilidad del Reactivo de Inactivación (IR).

Para el estudio de reducción de la viscosidad, se mezclaron 150 muestras de esputo con IR (hidróxido de sodio al 0,6% [p/v], isopropanol al 60% [v/v] y Tween-20 al 1,8% [v/v]) a una proporción de 1:2 o 1:3. Las mezclas se agitaron en vórtice vigorosamente y se incubaron a temperatura ambiente. La mezcla se agitó en vórtice de nuevo después de 20 a 30 minutos de incubación. La reducción de la viscosidad se evaluó mediante examen visual después de 30 minutos, 60 minutos y 24 horas de incubación.

Para el estudio de inactivación, se usaron dos aislados clínicos de MTB y el aislado de MTB ATCC 27294 para preparar muestras respiratorias positivas para MTB simuladas mezclando un ml de suspensión celular de MTB en las concentraciones de 1×10^6 , 1×10^7 o 1×10^8 ufc/ml con cuatro ml de muestra respiratoria MTB negativa tratada con NALC agrupada. Cada muestra de NALC de MTB simulada se mezcló luego con IR a proporciones de 1:2 o 1:3. Se usó una muestra simulada tratada con tampón de PBS estéril a una proporción de muestra a PBS de 1:2 como control positivo. Los controles negativos se prepararon añadiendo PBS estéril a la muestra de NALC negativa para MTB agrupada a una proporción de PBS a NALC de 1:2. Todas las muestras/controles se agitaron en vórtice vigorosamente y se incubaron durante 60 minutos a temperatura ambiente. La agitación en vórtice se repitió 30 minutos en la incubación. Al final de la incubación, las muestras tratadas con IR se transfirieron a tubos nuevos de 50 ml, se agitaron en vórtice y se centrifugaron durante 15 minutos a 3000 x g. El sedimento se resuspendió en 10 ml de PBS estéril y se centrifugó durante 15 minutos adicionales a 3000 x g. Los sedimentos se resuspendieron cada uno en 10 ml de PBS estéril. Se usó un ml de la suspensión para inocular un tubo indicador de crecimiento micobacteriano (MGIT). La MTB final añadida a cada cultivo de MGIT varió de $1-2 \times 10^4$ a $1-2 \times 10^6$ ufc. Además, se probaron un total de 51 sedimentos de NALC clínicos positivos para MTB de esputo, 20 del hospital Northwestern Memorial y 31 de Lancet Laboratories, para el crecimiento después del tratamiento con IR a una proporción de muestra a IR de 1:3 con el mismo procedimiento. Diez de las 20 muestras del Northwestern Memorial Hospital se trataron a una proporción de muestra a IR de 1:2. Las 41 muestras restantes se trataron con una muestra de proporción de IR de 1:3. El cultivo se realizó con el sistema BACTEC MGIT 960 (Becton Dickinson, Sparks, MD) durante 42 días. El crecimiento positivo se identificó con el sistema Gen-Probe Accuprobe® (Gen-Probe Inc, San Diego, CA). Los estudios iniciales para demostrar la eficiencia de la inactivación de las muestras respiratorias directas (frotis de MTB y muestras de esputo positivas para cultivo) también se realizaron en combinación con un estudio de estabilidad de IR como se describe en el párrafo siguiente.

Para determinar la condición de almacenamiento óptima para el IR, se almacenaron tres alícuotas de IR durante 39 días en condiciones de almacenamiento de 15-30° C y 33-37° C en botellas de vidrio o polipropileno. Cada alícuota de IR en cada condición de almacenamiento se examinó para cambios en la apariencia y el volumen y se probó la eficacia de inactivación de MTB después de 39 días de almacenamiento con 12 muestras de esputo positivas de frotis y de cultivo de MTB obtenidas de SAGE Bio Networks (Dhaka, Bangladesh) y el banco de especímenes de MTB de la Foundation for Innovative New Diagnostics (FIND) usando una proporción de 1:3 de muestra a IR. Se usó un panel celular de la cepa de MTB H37Rv obtenido de Zeptometrix Corporation (Buffalo, Nueva York) como control positivo.

El estudio de reducción de la viscosidad mostró que 60 minutos de incubación fueron suficientes para reducir la viscosidad de las muestras. Para el estudio de inactivación, ninguna de las muestras de MTB simuladas preparadas con los tres aislados de MTB a 1×10^8 , 1×10^7 y 1×10^6 ufc/ml mostraron crecimiento de MTB después de ser tratadas con IR a una proporción de muestra a IR de 1:3. Una muestra tratada con IR, preparada con MTB a 1×10^7 ufc/ml y se trataron con IR a una proporción de muestra a IR de 1:2, mostró crecimiento después de 27 días de incubación, aunque dos repeticiones a la misma concentración bacteriana dieron negativo para crecimiento. Ninguno de los 20 sedimentos de esputo de NALC positivos para MTB mostró crecimiento de MTB después del tratamiento con IR a una proporción de muestra a IR de 1:2 o 1:3. Además, 31 sedimentos de esputo de NALC clínicos que habían resultado positivos anteriormente para MTB por cultivo fueron negativos para el crecimiento de MTB después de recibir tratamiento con IR a una proporción de muestra a IR de 1:3.

No se observaron cambios en la apariencia después del almacenamiento después de 39 días. Se observó una pérdida de volumen del 0 al 6% después de 39 días de almacenamiento. La mayor pérdida de volumen del 6% se observó cuando el IR se almacenó en recipientes de polipropileno a 33-37° C. Sin embargo, la eficacia de la solución de IR para inactivar MTB no se vio afectada después del almacenamiento. Las 12 muestras de esputo positivas para MTB no mostraron crecimiento después de ser tratadas con el IR almacenado bajo las varias condiciones descritas anteriormente.

Se observó que algunas MTB en muestras clínicas sobrevivieron al proceso de inactivación de muestras

5 Cepheid GeneXpert MTB/RIF recomendado (período de incubación de 15 minutos y una proporción de 1:2 de muestra a reactivo de muestra) (Banada, P.P., et al., 2010. *J. Clin Microbiol.* 48:3551-3557). Los autores sugirieron que la inactivación completa de MTB puede requerir un tiempo de incubación más largo. Los datos experimentales generados por el estudio descrito en la presente demostraron que la inactivación de la muestra realizada durante 60 minutos usando los pasos de agitación en vórtice recomendados fue suficiente para completar la inactivación de MTB.

10 15 Cuando se usó una proporción de 1:2 de muestra a IR, una réplica de un cultivo de 1×10^7 MTB ufc/ml (2 x 10^5 ufc/ml en el cultivo de MGIT) mostró crecimiento después de 27 días de incubación del cultivo de MGIT. Un estudio anterior mostró que los cultivos de MGIT que contenían 10 ufc/ml de MTB se volvieron positivos después de 16 días de incubación, el resultado sugirió que un número muy bajo de MTB sobrevivió al proceso de inactivación cuando se usó una proporción de muestra a IR de 1:2 (Tortoli, E., P. et al., *J. Clin. Microbiol.* 37(11): 3578-3582; Wallis, et al., 1999. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43:2600-2606). Para lograr la eficiencia de inactivación óptima, se usó la proporción de muestra a IR de 1:3 para el resto de los experimentos de inactivación.

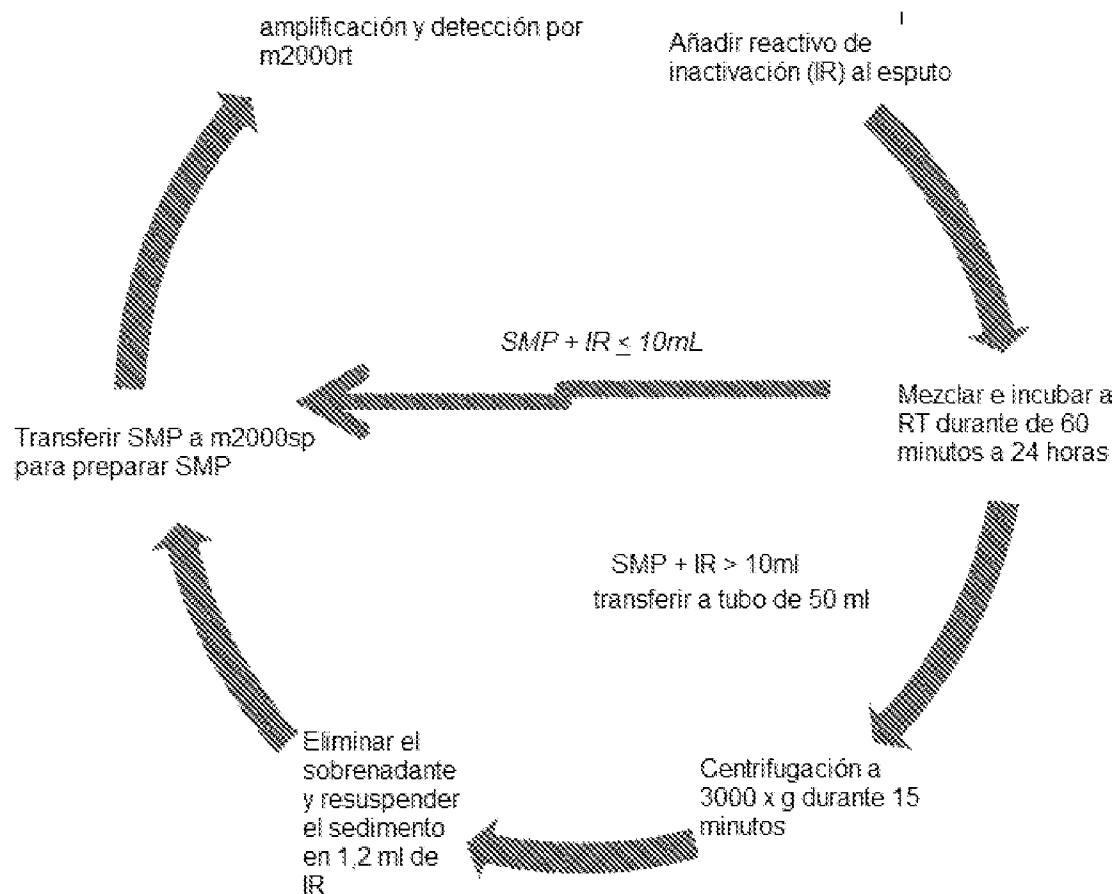
20 En conclusión, el IR evaluado en este estudio fue capaz de licuar las muestras de esputo y lograr la inactivación efectiva de MTB en muestras clínicas cuando se trató con IR a una proporción de muestra a IR de 1:3 durante 60 minutos. Este procedimiento de inactivación permite que estas muestras se manejen de manera segura fuera de una vitrina de bioseguridad después del procedimiento de inactivación apropiado.

REIVINDICACIONES

1. Un kit que comprende:
 - 5 a) los pares de cebadores de ácidos nucleicos de las SEQ ID NO: 1 y 2 y las SEQ ID NO: 3 y 4, y las sondas de las SEQ ID NO: 5 y 6; y
b) por lo menos un reactivo para realizar una reacción de amplificación de ácidos nucleicos.
 - 10 2. El kit de la reivindicación 1, en donde dicho reactivo se selecciona entre una polimerasa de ácido nucleico, una pluralidad de dNTPS, un tampón y un reactivo de inactivación.
 - 15 3. El kit de la reivindicación 2, en donde dicho reactivo de inactivación comprende agua, un detergente, un alcohol y NaOH.
 - 15 4. El kit de la reivindicación 3, en donde dicho reactivo de inactivación comprende isopropanol y sorbitán monolaurato de polioxietileno (20).
 - 20 5. El kit de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde uno o más de dichos cebadores o sondas comprende un marcador.
 - 20 6. El kit de la reivindicación 5, en donde dicho marcador comprende un fluoróforo.
 - 25 7. El kit de la reivindicación 6, en donde dicho marcador comprende un par fluoróforo/inactivador.
 - 25 8. El kit de la reivindicación 1, que comprende además una o más secuencias de ácidos nucleicos seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 10-36.
 - 30 9. El kit de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además una micropartícula magnética.
 - 30 10. El kit de la reivindicación 9, que comprende además tiocianato de guanidinio.
 - 30 11. El kit de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además el par de cebadores de ácidos nucleicos de las SEQ ID NO: 7 y 8 y la sonda de la SEQ ID NO: 9.

FIG. 1

FLUJO DE TRABAJO DEL ENSAYO:



ES 2 962 636 T3

FIG. 2

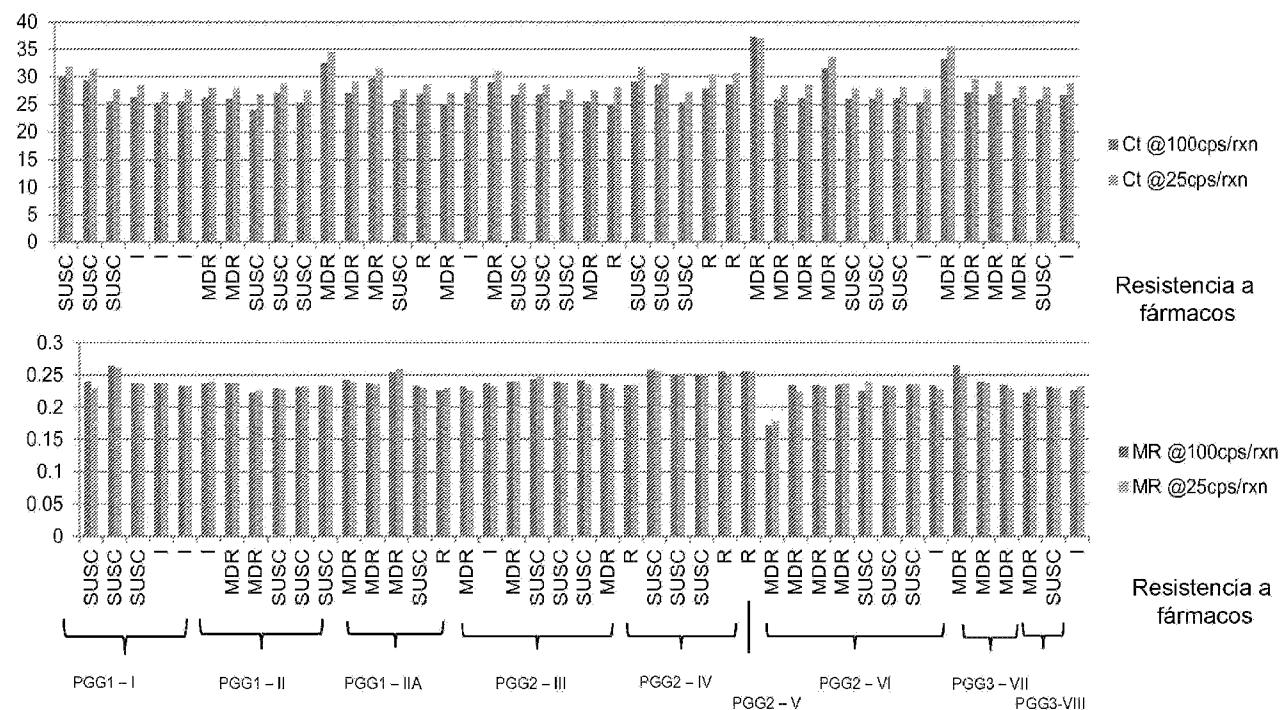


FIG. 3

Añadir Reactivo de Inactivación (IR) a una proporción de 3:1 al espécimen

Incubar la mezcla durante por lo menos 1 hora y un máximo de 24 horas (con 2 agitaciones en vórtice)

Proceder a la Preparación de la muestra y la Amplificación

FIG. 4

