

MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA DETECTAR TUBERCULOSIS ACTIVA

CAMPO TÉCNICO

[001] La presente invención se encuentra dirigida al campo de las pruebas moleculares para la detección de tuberculosis activa, tal como tuberculosis pulmonar activa, y, en particular, a métodos para el diagnóstico de infecciones por *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) por medio de la detección de un ARN pequeño no codificante en una muestra biológica, tales como muestras de esputo, o muestras biológicas diferentes de esputo, como suero, plasma u orina. Además, la presente solicitud proporciona composiciones y kits para llevar a cabo dichos métodos. Ventajosamente, los métodos y kits de la invención permiten detectar la presencia de bacilos vivos en diferentes muestras biológicas en las cuales se sospecha la presencia del patógeno.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[002] La tuberculosis (TB), causada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), es uno de los agentes infecciosos de mayor patogenicidad a nivel mundial, logrando infectar a cerca de un cuarto de la población global, y siendo, hasta el inicio de la pandemia por coronavirus, la principal causa de muerte causada por un único agente infeccioso, es decir, estando por encima de VIH/SIDA. La TB es transmitida por aire en partículas emulsionadas de un individuo con TB activa. La TB responde adecuadamente al tratamiento, alrededor del 85% de los pacientes que acceden a los tratamientos aprobados con antibióticos, logran recuperarse (<https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis>, revisado septiembre 2025).

[003] No todos los individuos infectados desarrollan síntomas, y muchos de ellos logran eliminar la infección sin ayuda de agentes terapéuticos. De hecho, la mayoría de la población contagiada desarrolla una infección latente o inactiva (ausente de síntomas de la enfermedad), que no se transmite a otros individuos.

Por otra parte, los pacientes con tuberculosis activa presentan síntomas (tos persistente, dolor en el pecho, pérdida de peso, fatiga, fiebre, entre otros), que pueden desarrollarse semanas o años después de adquirir la infección; estos pacientes pueden transmitir la infección a otras personas.

[004] Actualmente, el diagnóstico de la tuberculosis se realiza por medio de un grupo variado de técnicas. Entre otras, el diagnóstico de TB puede llevarse a cabo por medio de pruebas radiológicas, cutáneas, análisis de sangre en donde se mide la respuesta inmune contra MTB, pruebas de microscopía empleando métodos de tinción específicos, o cultivos bacterianos a partir de muestras biológicas. Sin embargo, estas técnicas usualmente requieren equipos, reactivos y personal especializado, pueden dar lugar a falsos positivos por reacción cruzada en pacientes inmunizados o resultados imprecisos en pacientes con infecciones por otros patógenos (VIH/SIDA). Otras dificultades comunes incluyen, por ejemplo, largos tiempos requeridos para obtener resultados en las pruebas basadas en cultivos bacterianos, así como los problemas relacionados con garantizar que la recolección, el almacenamiento y el transporte de las muestras de esputo se dé en las condiciones necesarias para hacer que dichas muestras sean aptas para los análisis posteriores.

[005] La dificultad en lograr un diagnóstico temprano de la enfermedad impide el acceso a un tratamiento oportuno, lo cual, a su vez, repercute en el aumento de las tasas de transmisión por parte del paciente afectado al resto de la población. Además, los retrasos en el diagnóstico de MTB resistente a antibióticos se relacionan también con la transmisión de cepas resistentes a los agentes antituberculosos comúnmente empleados, tales como rifampicina e isoniacida, dificultando aún más el control de la enfermedad.

[006] Debido a lo anterior, las investigaciones recientes se han centrado en proporcionar herramientas que permitan el diagnóstico temprano de la infección activa, que tengan una sensibilidad y especificidad adecuada, así como también a la búsqueda de alternativas que permitan realizar el diagnóstico de manera

inmediata en el punto en donde se atiende al paciente (POCT, Point-of-care-test).

[007] Ejemplos de algunos métodos de detección en el sitio de tratamiento se han descrito en documentos como *Detection and Quantification of HspX Antigenin Sputum Samples Using Plasmonic Biosensing: Toward a Real Point-of-Care (POC) for Tuberculosis Diagnosis*¹, que divulga un dispositivo que permite la detección de la proteína HspX de MTB en muestras de esputo. Para ello, el documento proporciona los resultados de un biosensor de resonancia plasmónica de superficie (SPR). Otro ejemplo es la detección del antígeno de MTB ESAT-6 utilizando un biomicrosensor².

[008] Por otra parte, también se han proporcionado diversas metodologías para lograr el diagnóstico de la enfermedad activa, basadas en la evaluación del nivel de biomarcadores en muestras diferentes a esputo, tales como orina, plasma, suero, o líquido cefalorraquídeo.

[009] Recientemente, gracias al desarrollo tecnológico de la secuenciación de ARN (RNAseq), se ha incrementado significativamente el hallazgo de sRNAs de MTB. El análisis del transcriptoma de MTB permitió encontrar que cerca del 2% (entre 1.9% y 3.3%) del transcriptoma es no codificante en fase exponencial de crecimiento *in vitro* y aumenta al 3% en la fase estacionaria, encontrando, además, que el sRNA más expresado fue el MTS2823 que se encuentra en la región intergénica entre los genes Rv3161 y Rv3262c³. Hallazgos posteriores han permitido sugerir que los sRNAs juegan un papel importante en la regulación génica e influyen en la patogénesis de MTB⁴. Estos estudios pusieron en evidencia el papel de los ARN pequeños o ARN no codificantes en el metabolismo de MTB, y orientaron la investigación hacia el uso de dichas moléculas como biomarcadores de la infección. En particular, se ha observado que ciertas cepas como el linaje 2/Beijing, altamente virulentas y resistentes a fármacos, presentan programas transcripcionales diferenciados que responden a condiciones del hospedero como la hipoxia y el estrés oxidativo⁵. Además, se ha demostrado que el entorno lipídico, predominante durante la infección y

latencia, modula la expresión de genes no codificantes, incluyendo tRNAs y sRNAs⁶, lo que sugiere su participación en la adquisición de fenotipos de tolerancia a fármacos y crecimiento lento⁷. Estos hallazgos refuerzan la hipótesis de que los sRNAs no solo son reguladores clave en la adaptación metabólica de MTB, sino también potenciales blancos terapéuticos y marcadores de estados fisiológicos específicos del bacilo durante la infección.

[010] Este enfoque ha sido utilizado en diversos documentos, como se puede observar en publicaciones científicas como *Detection of mycobacterial small RNA in the bacterial culture supernatant and plasma of patients with active tuberculosis*⁸, así como en solicitudes de patente tales como US 10526665 B2 y EP 2351857. Además, el documento *Screening of 20 Mycobacterium tuberculosis sRNAs in plasma for detection of active pulmonary tuberculosis*⁹ y la solicitud de patente CN110093432 divulgan la medición de biomarcadores de ARNs en plasma para la detección de tuberculosis activa y la diferenciación del bacilo de la tuberculosis de la vacuna de BCG (bacilo de Calmette-Guérin), respectivamente.

[011] No obstante, persiste la necesidad de desarrollar métodos y kits capaces de llevar a cabo el diagnóstico de la tuberculosis activa, tal como tuberculosis pulmonar activa, de manera rápida, que no requieran de cultivos celulares, y que puedan realizarse a partir de muestras biológicas de fácil recolección, que cuenten con una alta especificidad y sensibilidad para detectar las variantes resistentes y que sean de fácil acceso y aplicación.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

[012] La presente invención se refiere a métodos dirigidos a la detección de la tuberculosis, así como también a las composiciones y kits empleados para dichos métodos. En particular, los métodos, composiciones y kits de acuerdo con la invención se basan en la detección de un ARN pequeño o ARN no codificante (sRNA por sus siglas en inglés) denominado MTS2823 en muestras de fluidos biológicos. Este método de detección permite detectar bacilos vivos.

[013] En modalidades particulares, los métodos, composiciones y kits de acuerdo con la invención son útiles para detectar individuos infectados con tuberculosis a partir de muestras biológicas, tales como esputo, sangre, plasma, hisopado nasofaríngeo, aspirado gástrico, líquido pleural, líquido cefalorraquídeo, heces, u orina. En otras modalidades, los métodos, composiciones y kits de acuerdo con la presente invención permiten monitorear la respuesta a tratamiento en pacientes previamente diagnosticados con MTB.

[014] En una primera modalidad, la detección del ARN pequeño se hace por medio de RT-qPCR (transcripción inversa seguida de PCR en tiempo real o PCR cualitativa). En otras modalidades, la detección del ARN pequeño se hace mediante técnicas de hibridación en membranas de nitrocelulosa. En otras modalidades, la detección del ARN pequeño de interés se hace por medio de PCR convencional.

[015] En ciertas modalidades, la invención proporciona kits para detectar la presencia de MTB en una muestra clínica humana, que comprenden cebadores y sondas dirigidos a la detección de ARN pequeños seleccionados, preferiblemente MTS2823. En modalidades particulares, el kit comprende cebadores y sondas dirigidas a una región de MTS2823.

[016] En ciertas modalidades la invención proporciona composiciones que comprenden oligonucleótidos útiles para detectar la presencia de tuberculosis en una muestra biológica humana de fácil recolección por medio de pruebas moleculares, tales como PCR, RT-qPCR e hibridación. Específicamente, la invención proporciona composiciones que comprenden cebadores y sondas dirigidas específicamente a regiones genéticas de MTB. Preferiblemente, la invención proporciona composiciones que comprenden parejas de cebadores directos y reversos, y sondas dirigidas a MTS2823, o sus fragmentos. En modalidades preferidas, las sondas de acuerdo con la invención comprenden una etiqueta, preferiblemente un fluoróforo. De manera preferida, las sondas empleadas en el método de la invención poseen una molécula bloqueadora o

apagadora de fluorescencia (quencher). De manera preferida, las sondas de la invención poseen un resto fluorescente seleccionado del grupo que incluye, pero no se limita a, 6-FAM, JOE, TET, HEX, VIC, TxRd, ROX, Cianina 3, Cianina 5, Cianina 5.5, Quasar 670, Quasar 705, Alexa Fluor 568, CAL Fluor Red 610, BODIPY, ATTO 590^a, CAL Fluor Red 635, preferiblemente, la sondas de la presente invención incluyen FAM en uno de sus extremos. En modalidades preferidas, las sondas de la invención comprenden un resto bloqueador seleccionado del grupo que incluye, pero no se limita a, Dabcyl, Carboxitetrametillrodamina (TAMRA), Black Hole Quenchers (BHQ1 o BHQ2), BlackBerry Quencher 650, Eclipse® Dark Quencher, Deep Dark Quencher II. En modalidades preferidas de la invención, las sondas empleadas comprenden BHQ1 en uno de sus extremos.

[017] En una modalidad preferida de la invención, el método de la invención incluye un paso de tratamiento de la muestra biológica con una composición de inducción o inductor, previo a la detección del ARN no codificante. Asimismo, en modalidades preferidas, la invención se refiere a una composición de inducción o inductor, y a kits que incluyen una composición de inducción o inductor, según se describe más adelante. De manera preferente, la composición de inducción o inductor de la presente invención comprende una mezcla de sales de ácidos grasos de cadena media y larga, preferiblemente sales de ácido palmítico, esteárico y oleico, más preferiblemente, palmitato de sodio, estearato de sodio y oleato de sodio.

[018] En modalidades particularmente preferidas, los kits de la invención comprenden, además, una o más soluciones amortiguadoras (Tris-HCl). En otras modalidades preferidas, los kits de la invención comprenden, una o más enzimas, seleccionadas del grupo que consiste en Transcriptasa Reversa y TaqDNA polimerasa. En otras modalidades de la invención, los kits comprenden otros reactivos necesarios para llevar a cabo el análisis por transcripción inversa seguida por PCR, tales como dNTPs (deoxinucleosidos trifosfato) y cofactores enzimáticos (tales como cloruro de magnesio). En otras modalidades preferidas, el kit incluye, además, un control positivo y un control negativo. En modalidades

aun más preferidas, el kit de acuerdo con la invención no requiere de un control interno.

[019] En otras modalidades, los kits de la invención incluyen soportes o membranas de nitrocelulosa aptas para la detección por hibridación inversa de uno o más ARN no codificantes. En modalidades preferidas la invención proporciona una sonda de captura fijada sobre membranas de nitrocelulosa y una sonda de detección. En modalidades preferidas, la sonda de detección se encuentra comprendida en un buffer apto para su almacenamiento a bajas temperaturas, por ejemplo, a -20°C.

DEFINICIONES

[020] Como se usa en la presente solicitud, el término “oligonucleótidos” se refiere a polímeros formados por cadenas de igual o menos de 50 nucleótidos, que están formados a su vez por una molécula de azúcar (ribosa o desoxirribosa), unido a un grupo fosfato y a una base nitrogenada (que incluyen, pero no se limitan a, adenina (A), citosina (C), guanina (G) timina (T), uracilo (U)). En modalidades preferidas, los oligonucleótidos usados en la presente invención presentan una longitud de entre 10 a 30 nucleótidos. En modalidades aún más preferidas, los oligonucleótidos de la presente invención tienen una longitud de entre 14 a 25 nucleótidos. Los oligonucleótidos de la presente invención se identifican en la presente solicitud por medio del número que ocupan en el listado de secuencias adjunto a la solicitud (SEC ID NO:X). Deberá entenderse que el alcance de la presente invención cubre tanto las secuencias divulgadas como sus complementos reversos.

[021] Como se usa en la presente solicitud, el término “RT-PCR” se refiere a la técnica molecular que combina la transcripción reversa (transcripción inversa o retrotranscripción o RT) y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta técnica tiene como principal objetivo amplificar y cuantificar la cantidad de un ARN específico comprendido en una muestra, y comprende las etapas de obtención de ADN complementario a partir de un extracto de ARN (RT), y la amplificación de segmentos o regiones específicas de dicho ADN

complementario por medio de ciclos de desnaturalización, hibridación y extensión o polimerización del ADN.

[022] Tal como se usa en la presente invención, el término “qPCR” o “PCR en tiempo real” se refiere a la reacción en cadena de la polimerasa en la que se emplean fluoróforos para lograr la detección del fragmento amplificado.

[023] Como se usa en la presente solicitud, el término “cebadores”, “iniciadores” o “primers” se refiere a oligonucleótidos empleados a partir del cual se inicia un proceso de replicación de ADN. Particularmente, los cebadores de la presente invención son empleados en el proceso de PCR.

[024] Como se usa en la presente solicitud, el término “cebador directo” o “forward primer” se refiere a un cebador que es complementario a, y se hibrida con, la secuencia de la hebra en dirección 3'→5' del gen de interés. Por su parte, el término “cebador reverso” o “reverse primer” se refiere a un cebador que es complementario a, y se hibrida con, la secuencia de la hebra 5'→3' del gen de interés. Estos cebadores limitan el fragmento amplificado empleado para la detección, también conocido como “amplicón”.

[025] Como se usa en la presente solicitud, el término “sondas” se refiere a oligonucleótidos que se hibridan con una secuencia interna del amplicón, los cuales pueden comprender una etiqueta que facilite su detección. De manera preferida, las sondas empleadas comprenden un fluoróforo como etiqueta. En modalidades particulares, dichas sondas pueden también incluir una molécula bloqueadora o apagadora de fluorescencia (quencher). De manera preferida, el método de la presente invención proporciona una sonda específica para cada gen de interés. En modalidades aún más preferidas el bloqueador es BHQ1 o BHQ2. En modalidades preferidas, los fluoróforos incluidos en las sondas empleadas en los métodos, composiciones y kits de la invención se seleccionan de un grupo que incluye, pero no se limita a, 6-FAM, JOE, TET, HEX, VIC, TxRd (también llamado TexasRed o sulforodamina 101-X), ROX, Cianina 3, Cianina 5, Cianina 5.5, Quasar 670, Quasar 705, Alexa Fluor 568, CAL Fluor Red 610,

BODIPY, ATTO 590^a, CAL Fluor Red 635. En modalidades preferidas, los bloqueadores incluidos en las sondas empleadas en los métodos, composiciones y kits de la invención se seleccionan del grupo que incluye, pero no se limita a, Dabcyl, Carboxitetrametillrodamina (TAMRA), Black Hole Quenchers (BHQ1 o BHQ2), BlackBerry Quencher 650, Eclipse® Dark Quencher, Deep Dark Quencher II. En particular, la selección de las etiquetas en las sondas del método de la invención se realizará de manera que permita la detección simultánea de distintos blancos, de modo que cada sonda tendrá sus propias características, por ejemplo, cada sonda empleada comprenderá un fluoróforo diferente. Deberá entenderse que la invención no se limita a las parejas fluoróforo/apagador ejemplificadas, sino que cubre todas las posibles combinaciones de las secuencias divulgadas que permitan una detección simultánea de los genes de interés.

[026] Como se usa en la presente solicitud, el término “mezcla de reacción” o “composición de reacción” se refiere a la mezcla que comprende los reactivos necesarios para llevar a cabo la detección de acuerdo con el método de la invención. Así, de manera preferida, la mezcla de reacción incluye una solución amortiguadora (buffer), que incluye reactivos, como dNTPs (deoxinucleosidos trifosfato); cofactores enzimáticos, como magnesio; enzimas, como la transcriptasa reversa y la polimerasa; además, la mezcla de reacción incluye los cebadores directos y reversos, las sondas y la muestra a analizar.

[027] Como se usa en la presente solicitud, el término “hibridación”, “anillado” o “apareamiento”, se refiere a la etapa de la PCR en la que se da la unión entre el cebador o la sonda y la región de ADN complementario de interés.

[028] Como se usa en la presente solicitud, el término “ciclo umbral” o “Ct” se refiere al número de ciclos requeridos para que la señal de fluorescencia cruce la línea base o aumente por encima del ruido de fondo o “background”. Este valor se relaciona con la cantidad inicial del ARN en la muestra inicial.

[029] Como se usa en la presente solicitud, el término “muestra biológica” o “muestra clínica” se refiere a las muestras usadas para realizar el proceso de extracción de ARN. En modalidades preferidas de la invención, las muestras biológicas se seleccionan del grupo que consiste en muestras esputo, líquido pleural, jugo gástrico, muestras obtenidas por hisopado nasofaríngeo, muestras de orina, suero, plasma y líquido cefalorraquídeo.

[030] Como se usa en la presente solicitud, el término “aproximadamente” se refiere a un valor que puede variar dentro de un margen de tolerancia razonable, por ejemplo, $\pm 5\%$ respecto al valor indicado, salvo que se especifique otro rango. Siempre que esta variación no afecte sustancialmente la función, propósito o resultado técnico descrito, y se entiende como aceptable por una persona experta en la materia.

[031] Como se usa en la presente solicitud, la expresión “Temperatura ambiente” se refiere a la temperatura del entorno circundante en condiciones normales, generalmente comprendida entre aproximadamente 20 °C y 25 °C, salvo que se especifique otro rango.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[032] La figura 1 muestra la expresión de un grupo de ARNs pequeños durante el proceso de infección de ratones BALB/c con las cepas de MTB Beijing 323 y 391. El ARN se extrajo 3, 14, 28 y 60 días después de la infección con las respectivas cepas.

[033] La figura 2 muestra los resultados de la evaluación de la amplificación del fragmento del gen de interés (MTS2823 de 300pb) por electroforesis en gel de agarosa. **A.** en una muestra de ADN genómico a partir de la cepa de MTB H37Rv; **B.** en una PCR de colonias de *E. Coli* transformadas para expresar el fragmento de interés, Carril 1-12 colonias recombinantes, WM: Marcador de peso molecular, carril 13: Control negativo.

[034] La figura 3 muestra los resultados de amplificación empleando conjuntos de cebadores y sondas 1 y 3 de la invención. **A.** Curvas de amplificación; **B.** Curva de calibración.

[035] La figura 4 muestra los resultados de los ensayos de sensibilidad de detección por qPCR.

[036] La figura 5 muestra el resultado de las pruebas de especificidad de amplificación del blanco de la presente invención. **A.** Gel de agarosa que muestra la ausencia del ARN de interés (300pb) en diversos microorganismos comúnmente presentes en muestras respiratorias y de orina. De izquierda a derecha: Marcador de peso, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, Control negativo, y Control Positivo TBC H37Rv. **B.** Pruebas de especificidad realizadas mediante qPCR con los cebadores diseñados en la presente invención (amplicón de 147 pb) y su correspondiente sonda fluorescente. Además de los microorganismos previamente mencionados, se realizaron pruebas en muestras de tres Mycobacterias atípicas: *M. avium*, *M. szulgai* y *M. kansasii*. **C.** Análisis de los resultados de qRT-PCR de muestras de ADN de microorganismos seleccionados. El panel de micobacterias atípicas incluye *M. abscessus*, *M. gordonae*, *M. avium* y *M. kansasii* y las micobacterias previamente analizadas por SYBR-green, *M. kansasii*, *M. szulgai* y *M. avium*.

[037] La figura 6 muestra el resultado de las pruebas de Límite de Blanco (LoB) del método de la presente invención.

[038] La figura 7 muestra los resultados de la detección en una muestra de orina del biomarcador MTS2823 por medio del método de la invención.

[039] La figura 8 ilustra la metodología empleada para la estandarización del protocolo de manejo de muestras de orina.

[040] La figura 9 muestra los resultados de la detección de MTS2823 en muestras de orina procesadas mediante dos metodologías distintas. Curva de amplificación (número de ciclos frente a fluorescencia - Δ RN) del RNA total extraído por cada método. (1) Orina procesada con el kit Quick-cfRNA™ Serum & Plasma Kit (ZYMO); (2) metodología alternativa propia; (3) control positivo correspondiente a la cepa H37RV de *M. tuberculosis*; línea verde: Control negativo

[041] La figura 10 muestra los resultados de la evaluación de los límites de detección. **A.** En condiciones de laboratorio y **B.** En muestras de orina intervenidas. La Figura 10C muestra las curvas de amplificación del ensayo para la determinación en orina falseada.

[042] La figura 11 ilustra el sistema de detección mediante hibridación reversa tipo dotblot.

[043] La figura 12 ilustra los resultados de las pruebas de sensibilidad para la identificación del biomarcador de sRNA de MTB. A. Sonda 1 de detección. B. Controles negativos para la sonda 1. C. Sonda 2 de detección. D. Controles negativos para la sonda 2. Estos resultados permiten establecer que el sistema de la invención permite identificar menos de 1 μ M de RNA total de MTB.

[044] La figura 13 enseña la detección del biomarcador de sRNA en el sobrenadante de cultivo de MTB. 1. Control Negativo, 2. Precipitado bacteriano. 3. Sobrenadante de cultivo. Esto demuestra que el biomarcador se secreta al medio de cultivo.

[045] La figura 14 muestra los resultados de las pruebas de especificidad, empleando diversos microorganismos de comparación. 1. *Mycobacterium tuberculosis*; 2. *Pseudomonas aeruginosa*; 3. *Klebsiella pneumoniae*; 4. *Escherichia coli*; 5. *Enterococcus faecalis*; 6. *Streptococcus pneumoniae*; 7. *Enterobacter aerogenes*; 8. *Acinetobacter baumannii*. Estos resultados muestran una alta especificidad para este biomarcador.

[046] La figura 15 muestra los resultados de las pruebas de optimización de inducción para la detección del sRNA de *Mycobacterium tuberculosis*. Líneas 1-5: diferentes muestras de esputos falseados con concentraciones entre 1×10^4 a 1×10^5 . H: tiempo en horas de inducción. Control (+): RNA total de MTB; Control (-): sonda de captura, agente inductor y sonda de detección.

[047] La figura 16 muestra los resultados del ensayo de Dot Blot reverso para la identificación del biomarcador sRNA de *M. tuberculosis* en 35 esputos positivos de pacientes que habían sido previamente diagnosticados con tuberculosis pulmonar activa.

[048] La figura 17 muestra los resultados del ensayo de Dot Blot reverso para la identificación del Biomarcador sRNA de *M. tuberculosis* en 50 esputos negativos para tuberculosis activa.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[049] La presente invención hace referencia a métodos para diagnosticar la infección por Mtb en una muestra biológica por medio de la detección de un biomarcador de ARN pequeño (también llamado ARN no codificante) mediante métodos moleculares, tales como, transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-qPCR) o por hibridación inversa en membranas de nitrocelulosa. En particular, los métodos de la invención se basan en la detección del biomarcador de ARN pequeño denominado MTS2823 por medio de conjuntos de cebadores y sondas que permiten la amplificación del mismo, o de sus fragmentos, en diversos tipos de muestras.

[050] Tal como se entiende en la presente invención, el MTS2823 tiene la secuencia como se establece en la SEQ ID NO: 1, que se muestra a continuación:

TAGTACAAAGGAACACGGAAGCCCGGTGAGGCCAAGGCTCGATCCAGA
AGAGAAGGTTTCGGTCTCCCGACCCGGGCGCCAGCATGGTTCCCGGCAC

CCACGCGGAGTCATAGCCACGATAACGGCAGAAGTGTTGCGGGTCTGCG
 TAATTGCGAACAGCAGATGGCATCGACGGCCCTTTGGGTGGGGCTACAGC
 TAGAAGCGTCGCAAGATCGCCGAGGCCACCCACGCAACCCCAGGAGTGC
 ACGCTTGGTAACCGAGAACCGTGTTGGTGGGCGGCGATTTCGAGTTCTTCG
 GGTC (SEQ ID NO: 1).

[051] Los métodos de la invención permiten realizar un diagnóstico *in vitro* de tuberculosis activa, tal como tuberculosis pulmonar activa, a partir de muestras biológicas en las que el bacilo de *Mycobacterium tuberculosis* está presente, tales como muestras de esputo, líquido pleural, jugo gástrico, o muestras obtenidas por hisopado nasofaríngeo, y en muestras biológicas en las que el biomarcador de ARN pequeño está circulante, tales como muestras de orina, suero, plasma y líquido cefalorraquídeo.

[052] En modalidad preferida, el método de acuerdo con la presente invención involucra la detección de MTS2823 o un fragmento del mismo luego de realizar un paso de inducción por medio de la adición de una composición de inducción o inductor, a muestras de esputo, líquido pleural, jugo gástrico, lavado bronqueoalveolar, biopsias o hisopado nasofaríngeo. En otra modalidad la detección de MTS2823 o un fragmento de este se realiza en muestras de orina, plasma, suero o líquido cefalorraquídeo, sin requerir el paso de inducción.

Inducción de la expresión de MTS en muestras en donde el bacilo está presente (Esputo, líquido pleural, lavado bronqueoalveolar, biopsias, jugo gástrico o hisopado nasofaríngeo)

[053] De acuerdo con la primera modalidad de la invención, el método comprende la incubación de la muestra (o sus derivados) con una composición de inducción o inductor. En particular, el proceso de inducción de acuerdo con la invención comprende las siguientes etapas:

- a) Tratar las muestras con una solución que comprende NaOH y N-acetil-L-cisteína (NaLC), por entre aproximadamente 12 a 18 minutos, preferiblemente 15 minutos, a temperatura ambiente;
- b) Centrifugar las muestras obtenidas en el paso a) entre aproximadamente 3500 a aproximadamente 4200 rpm, preferiblemente, 4000 rpm, por entre 8 y 15 minutos, preferiblemente 10 minutos, a temperatura ambiente;
- c) Descartar el sobrenadante y re-suspender el precipitado en un volumen adecuado de la composición de inducción para disolver el precipitado, el volumen adecuado preferiblemente se encuentra entre aproximadamente 10 y aproximadamente 50 μ l, más preferiblemente, el volumen adecuado es 30 μ l;
- d) Incubar la suspensión obtenida en el paso c) a temperatura ambiente por entre aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 4 horas, preferiblemente 1 hora;
- e) Centrifugar a entre aproximadamente 10.000 rpm a aproximadamente 15.000 rpm, preferiblemente 13.000 rpm por 10 minutos;
- f) Recuperar el sobrenadante para los posteriores pasos de detección.
- g) Opcionalmente, almacenar el sobrenadante remanente a -80°C.

[054] En donde la composición de inducción comprende soluciones de sales de ácidos grasos de cadena mediana y larga y un vehículo adecuado. En una modalidad preferida, la composición de inducción comprende una mezcla de soluciones de sales de ácido palmítico, ácido esteárico y ácido oleico, en donde preferiblemente las sales son sales de sodio. En modalidades preferidas, el vehículo adecuado comprende un alcohol de cadena corta y un buffer. Como alcohol de cadena corta se entiende un alcohol C₁-C₁₀. En modalidades preferidas el buffer es buffer citrato, fosfato, acetato, carbonato/bicarbonato, Tris-HCl, HEPES o similares. El pH del Buffer se encuentra preferiblemente entre 4.0 y 5.0, más preferiblemente el pH será 4.5.

[055] En modalidades aún más preferidas, las sales están disueltas de manera independiente en etanol y buffer citrato, preferiblemente, etanol al 50% (v/v) y buffer citrato 25mM, pH 4.5. En modalidades aún más preferidas, cada una de

las sales se encuentran en una concentración de entre aproximadamente 0,0005% (p/v) y aproximadamente 0,002% (p/v), preferiblemente, 0,001% (p/v) en la composición de inducción. Preferiblemente, el vehículo de la composición de inducción comprende buffer citrato 25mM pH 4.5 y etanol 0.1 % (v/v).

[056] Ventajosamente, la composición de inducción de acuerdo con la invención es estéril. En particular, la composición de inducción se prepara bajo condiciones estériles y/o se esteriliza por métodos conocidos en el campo técnico, tales como filtración o por irradiación UV. Preferiblemente, la composición de inducción es esterilizada por filtración a través de membranas de 0.22 μm o 0.45 μm .

[057] En una modalidad preferida, el paso a) anteriormente mencionado sigue el procedimiento recomendado por el Centro para Control de Enfermedades CDC¹⁰.

[058] En algunas modalidades, la solución que comprende NaOH, y N-acetil-L-cisteína (NaLC), puede, además, comprender citrato de sodio u otras soluciones amortiguadoras.

Preparación de las muestras que no requieren inducción (Plasma, suero, orina o líquido cefalorraquídeo)

[059] De acuerdo con la segunda modalidad de la invención, el método comprende un tratamiento para la extracción del ARN presente.

[060] Preferiblemente, el tratamiento de las muestras se realiza por medio de un kit disponible en el mercado que tiene como fundamento el paso de la muestra por dos columnas, la primera remueve los ARNs largos mientras que la segunda concentra los ARNs pequeños. Más preferiblemente, el tratamiento se hace empleando el kit Quick-cfRNA Serum & Plasma Kit de Zymo ResearchTM, siguiendo las indicaciones del fabricante. Sin embargo, se deberá entender que

el método de la invención no se limita al uso de dicho kit, sino que comprende las alternativas conocidas en el estado de la técnica que lleguen a resultados similares a los logrados por este.

[061] Mas preferiblemente, cuando se trata de una muestra de orina, el tratamiento de la muestra comprende:

- centrifugar la muestra de orina (primera del día) a 12.000 g por 15 minutos,
- reservar el sobrenadante para ensayos posteriores.

Detección del biomarcador de ARN pequeño mediante RT-PCR

[062] Una vez obtenido el ARN (encontrado en el sobrenadante de la inducción, en el producto de la purificación o en el sobrenadante del pretratamiento de la muestra de orina) se procede a realizar la transcripción reversa (RT) para obtener ADN complementario (ADNc) y la qPCR.

[063] En una modalidad preferida, la síntesis de ADNc comprende los siguientes pasos:

- a. El ARN extraído se incuba a una temperatura de aproximadamente 70°C a aproximadamente 80°C, preferiblemente 75°C, por entre aproximadamente 2 minutos a aproximadamente 5 minutos, preferiblemente 2 minutos, terminado el proceso de incubación, colocar las muestras inmediatamente en un baño de hielo,
- b. Preparar una mezcla de Transcriptasa Reversa,
- c. Mezclar las soluciones preparadas en los pasos anteriores e incubar a aproximadamente 25°C por aproximadamente 2 min, y, en seguida, incubar a aproximadamente 55°C por entre aproximadamente 10 min a aproximadamente 15 minutos,
- d. Finalmente, terminar la reacción a aproximadamente 95°C entre aproximadamente 1 min a aproximadamente 2 minutos.

- e. Opcionalmente, mantener en el termociclador a entre aproximadamente 10°C a aproximadamente 12°C.

[064] En una modalidad aun más preferida, la síntesis de ADNc comprende los siguientes pasos:

- a. Incubar el ARN extraído a una temperatura de 72°C por 2 minutos, terminado el proceso de incubación, colocar las muestras inmediatamente en un baño de hielo,
- b. Preparar una mezcla de Transcriptasa Reversa,
- c. Mezclar las soluciones preparadas en los pasos anteriores e incubar a 25°C por 2 min, y, en seguida, incubar a 55°C por 15 minutos,
- d. Finalmente, terminar la reacción a 95°C por 2 minutos.

[065] En una modalidad preferida, la síntesis de ADNc puede llevarse a cabo mediante la aplicación de un kit comercial, que incluyen, pero no se limitan a, New England Biolabs: LunaScript® RT SuperMix Kit (E3010).

[066] En algunas modalidades, la mezcla del paso b, contiene una solución amortiguadora, iniciadores aleatorios, dNTPs y cofactores necesarios para la reacción.

[067] En una modalidad, los pasos c) a d) antes mencionados se llevan a cabo en un termociclador.

[068] En otra modalidad, el ADNc se almacena a una temperatura entre -15°C y aproximadamente -20°C.

[069] En otra modalidad las reacciones de retrotranscripción (RT) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevan a cabo en un único paso.

Cebadores y sondas

[070] El método de la invención se basa en un conjunto de cebadores y sondas específicamente diseñados por los inventores y dirigidos a MTS2823 (SEQ ID NO: 1), los cuales permiten detectar, con alta sensibilidad y especificidad, la tuberculosis en muestras de diversas naturalezas.

[071] Tal como puede observarse en la Tabla 1, la invención divulga tres conjuntos de cebadores y dos sondas dirigidos al ARN denominado MTS2823 (SEQ ID NO: 1).

Tabla 1 Características de los cebadores y sondas empleados en los métodos de la invención

Cebador o Sonda*	Secuencia	SEQ ID NO:	Tamaño del Fragmento (pb)	TM (°C)
Directo 1	TGAGGCCAAGGCTCGAT	2	147	63
Reverso 1	GTCGATGCCATCTGCTGTTC	3		63
Directo 2	CACCCACGCGGAGTCATAG	4	131	64
Reverso 2	GTGGCCTCGGCGATCTT	5		64
Directo 3	TTGCGGGTCTGCGTAAT	6	143	61
Reverso 3	CCCACCAACACGGTTCT	7		61
Directo 4	TAGTACAAAGGAACCAC	8	300	52
Reverso 4	GAAGAACTCGAATCGC	9		54
Sonda 1	FamAGAAGTGTTGCGGGTCTGCGTAAT BHQ1	10	---	68
Sonda 3	FamACAGCTAGAAGCGTCGCAAGATC GBHQ1	11	---	68

bp: pares de bases

[072] De esta forma, el primer conjunto de cebadores permite la amplificación de un segmento de 147 pb (SEQ ID NO: 12), el segundo conjunto de cebadores permite la amplificación de un segmento de 131 pb (SEQ ID NO: 13) y el tercer conjunto de cebadores permite la amplificación de un segmento de 143 pb (SEQ ID NO: 14), mientras que el cuarto conjunto de cebadores permite la amplificación de un fragmento de 300 pb.

[073] En una primera modalidad, el método de la invención emplea los cebadores Directo 1 (SEQ ID NO: 2) y Reverso 1 (SEQ ID NO: 3), en combinación con la sonda 1 (SEQ ID NO: 10) o con la sonda 3 (SEQ ID NO: 11) para el diagnóstico de la tuberculosis activa. En una segunda modalidad, el método de la invención emplea los cebadores Directo 2 (SEQ ID NO: 4) y Reverso 2 (SEQ ID NO: 5), en combinación con la sonda 1 (SEQ ID NO: 10) o con la sonda 3 (SEQ ID NO: 11) para el diagnóstico de la tuberculosis activa. En otra modalidad, el método de la invención emplea los cebadores Directo 3 (SEQ ID NO: 6) y Reverso 3 (SEQ ID NO: 7), en combinación con la sonda 1 (SEQ ID NO: 10) o con la sonda 3 (SEQ ID NO: 11) para el diagnóstico de la tuberculosis activa. En modalidades particularmente preferidas, el método de la invención emplea los cebadores Directo 1 (SEQ ID NO: 2) y Reverso 1 (SEQ ID NO: 3), en combinación con la sonda 1 (SEQ ID NO: 10) para el diagnóstico de la tuberculosis activa, tal como, tuberculosis pulmonar activa.

[074] En general, las soluciones que comprenden cada uno de los cebadores y la sonda, se mezclan con una enzima polimerasa termorresistente, un buffer adecuado y una solución que comprende la mezcla de ADNc obtenida previamente a partir de las muestras a analizar, para obtener una mezcla de reacción que se someterá a la etapa de amplificación.

AMPLIFICACIÓN POR PCR DEL sRNA de *Mycobacterium tuberculosis* PARA DETECCIÓN DE TUBERCULOSIS PULMONAR ACTIVA

[075] En particular, la etapa de amplificación del método de la presente invención se lleva a cabo en un termociclador y, comprende, de manera preferida:

- un ciclo inicial de denaturación entre aproximadamente 90°C y aproximadamente 96°C por entre aproximadamente 1 y 5 minutos, preferiblemente, a aproximadamente 95°C por aproximadamente 3 minutos,
- entre 38 y 46 ciclos compuestos por:

- denaturación a aproximadamente 90 a 96°C por entre aproximadamente 10 y aproximadamente 20 segundos,
- anillaje entre aproximadamente 60°C a 70°C por entre aproximadamente 40 segundos a aproximadamente 1 minuto,
- extensión entre aproximadamente 70°C a 75°C por entre aproximadamente 10 segundos a aproximadamente 20 segundos y
- almacenamiento a aproximadamente 12°C por el tiempo necesario.

[076] En modalidades preferidas, las condiciones son:

- un ciclo inicial de denaturación a 95°C por 3 minutos,
- 45 ciclos compuestos por:
 - denaturación a 95°C por 15 segundos,
 - anillaje a 64°C por entre 40 segundos y
 - extensión a 72°C por 15 segundos
- almacenamiento a 12°C por el tiempo necesario.

[077] Sin embargo, se deberá entender que los parámetros de funcionamiento específicos para la amplificación podrán ser sujetos a ajustes según sea necesario.

[078] De acuerdo con la invención, los resultados se interpretan como sigue:

- MTB detectado se reporta cuando el Cq este por debajo de los 40 ciclos de amplificación y los controles hayan funcionado adecuadamente
- MTB no detectado se reporta cuando el Cq este por encima de los 40 ciclos de amplificación y los controles hayan funcionado adecuadamente

Kits

[079] Además, la presente invención hace referencia a kits para detectar la presencia de Mtb en una muestra biológica, por medio de cebadores y sondas que permiten la amplificación de un ARN pequeño MTS2823 o sus fragmentos. De esta forma, la invención proporciona kits que permiten realizar un diagnóstico

in vitro de MTB a partir de muestras biológicas, tales como muestras de suero, plasma, orina, o también de muestras de esputo, hisopado nasofaríngeo, líquido gástrico o líquido pleural, después de que estas han sido sometidas a un proceso de inducción como se describió previamente.

[080] Particularmente, el kit de acuerdo con la invención comprende composiciones que incluyen los cebadores y sondas identificadas en la tabla 1, ya sea solos o en combinación, y, opcionalmente, otras composiciones que comprendan los reactivos necesarios para llevar a cabo la detección por medio de RT-qPCR. En modalidades preferidas, los kits de la invención comprenden un control positivo.

[081] En modalidades preferidas, el kit de la invención comprende un control positivo (CP). En modalidades aun más preferidas, el CP comprende o consiste en DNA de MTB purificado, por ejemplo, MTB H37Rv ATCC 27294 purificado, a una concentración que permite que se amplifique en un ciclo de amplificación (Cq) entre 12 y 15 cuando se emplean entre 3 y 10 µl, preferiblemente 5 µl en el ensayo. El control positivo asegura que el equipo de PCR en tiempo real funcionó correctamente, que la mezcla y sus reactivos están en condiciones óptimas y que el protocolo fue seguido adecuadamente.

[082] En modalidades preferidas, el kit comprende un control negativo (CN) que se emplea para detectar cualquier contaminación que pueda ocurrir durante la ejecución del ensayo. En modalidades aún más preferidas, el CN consiste en agua tipo 3, libre de DNAsas y RNAsas. Se espera que el CN no muestre señal de amplificación o que de ocurrir sea por encima del ciclo 40 (Cq>40).

[083] En modalidades preferidas, el kit no requiere un control interno. Dado que la muestra clínica ha sido previamente descontaminada y tratada con NaLC-NaOH, el DNA humano y microorganismos no relacionados son eliminados durante el tratamiento. Por otra parte, como no hay lisis celular de MTB, sino que el sRNA es liberado al medio inductor, no existe la presencia de inhibidores de PCR.

[084] En otra modalidad, la detección del sRNA se realiza mediante la técnica de Dot Blot, ilustrada en la Figura 11. En una modalidad preferida, las sondas para la detección de mediante dot blot tienen las secuencias que se detallan en la tabla 2 a continuación:

Tabla 2 Características de las sondas empleados en el sistema de detección por hibridación reversa.

Sonda	Secuencia	SEQ ID NO:	TM
Sonda de captura (Sonda C 1-Riot)	CCAAGGCTCGATCCAGAAGA	15	56°C
Sonda de detección (Sonda D1-Riot)	GTTGCGGGTCTGCGTAATTG	16	57°C

[085] En modalidades particularmente preferidas, el kit de acuerdo con la invención está compuesto por recipientes individuales que contienen los siguientes componentes:

- Solución de inducción o inductor: Solución química para estimular la producción del sRNA,
- Solución de polimerasa: mezcla que consiste en estabilizadores, soluciones amortiguadoras y Tac DNA polimerasa,
- Solución de cebador directo,
- Solución de cebador reverso,
- Solución que contiene una o más sonda(s),
- Control Positivo,
- Control Negativo,

[086] En modalidades preferidas, uno o más de los componentes pueden encontrarse en el mismo recipiente. En una modalidad preferida los recipientes son tubos plásticos, tales como microtubos o similares.

[087] De acuerdo con un aspecto de la invención, la solución de polimerasa comprende una mezcla de uno o más componentes estabilizadores, tales como azúcares, proteínas, alcoholes, aminoácidos y péptidos.

[088] En modalidades preferidas, el componente estabilizador comprende una o más proteína(s). En modalidades preferidas, las proteína(s) estabilizadora(s) se seleccionan de proteínas de origen animal o vegetal. En una modalidad aún más preferida, la o las proteína(s) estabilizadora(s) se seleccionan del grupo que incluye, pero no se limita a, albúmina sérica bovina, caseína, gelatina, albúmina humana, albúmina sérica humana recombinante, proteínas vegetales hidrolizadas, tales como proteína hidrolizada de soja, proteína hidrolizada de trigo (gluten), proteína hidrolizada de guisantes, proteína hidrolizada de arroz y/o proteína hidrolizada de maíz, y sus mezclas. En modalidades particularmente preferidas la proteína estabilizadora es albúmina sérica bovina. En modalidades particularmente preferidas la proteína estabilizadora es caseína. En modalidades particularmente preferidas la proteína estabilizadora es gelatina. En modalidades particularmente preferidas la proteína estabilizadora es albúmina humana. En modalidades particularmente preferidas la proteína estabilizadora es albúmina sérica humana recombinante. En modalidades particularmente preferidas la proteína estabilizadora es proteína hidrolizada de soja. En modalidades particularmente preferidas la proteína estabilizadora es proteína hidrolizada de trigo (gluten). En modalidades particularmente preferidas la proteína estabilizadora es proteína hidrolizada de guisantes. En modalidades particularmente preferidas la proteína estabilizadora es proteína hidrolizada de arroz. En modalidades particularmente preferidas la proteína estabilizadora es proteína hidrolizada de maíz.

[089] En modalidades preferidas, el componente estabilizador comprende uno o más azúcares. En una modalidad preferida, el azúcar estabilizador es uno o más disacáridos. En modalidades preferidas el o los disacárido(s) estabilizador(es) se seleccionan del grupo que incluye, pero no se limita a, sacarosa, trehalosa, lactosa, maltosa, y mezclas de los mismos. En modalidades preferidas el disacárido estabilizador es sacarosa. En modalidades preferidas el

disacárido estabilizador es trehalosa. En modalidades preferidas el disacárido estabilizador es lactosa. En modalidades preferidas el disacárido estabilizador es maltosa.

[090] En modalidades preferidas, el componente estabilizador comprende uno o más alcoholes. En una modalidad preferida, el o los alcohol(es) estabilizador(es) son alcoholes polihídricos o polioles. En modalidades preferidas el o los alcohol(es) estabilizador(es) se seleccionan del grupo que incluye, pero no se limita a, glicerol, sorbitol, manitol, y mezclas de los mismos. En modalidades preferidas el alcohol estabilizador es glicerol. En modalidades preferidas el alcohol estabilizador es sorbitol. En modalidades preferidas el alcohol estabilizador es manitol.

[091] En modalidades preferidas, el componente estabilizador comprende uno o más aminoácidos o péptidos. En una modalidad preferida, el o los aminoácido(s) o péptido(s) estabilizador(es) se seleccionan del grupo que incluye, pero no se limita a, Glicina, Prolina, Arginina, Histidina, Lisina, Glutamina, Tripéptidos como glutatión, y mezclas de los mismos. En modalidades preferidas el aminoácidos estabilizador es Glicina. En modalidades preferidas el aminoácidos estabilizador es Prolina, En modalidades preferidas el aminoácidos estabilizador es Arginina, En modalidades preferidas el aminoácidos estabilizador es Histidina, En modalidades preferidas el aminoácidos estabilizador es Lisina, En modalidades preferidas el aminoácidos estabilizador es Glutamina. En modalidades preferidas el peptido estabilizador es glutatión.

[092] En modalidades preferidas de la invención la o las proteínas estabilizadoras se encuentran en el rango de 0.1% – 10% (p/v) con respecto a la solución de polimerasa. En modalidades preferidas de la invención el o los disacáridos estabilizadores se encuentran en el rango de 1% – 10% (p/v) con respecto a la solución de polimerasa. En modalidades preferidas de la invención el o los alcoholes estabilizadores se encuentran en el rango de 2% – 50% (p/v) con respecto a la solución de polimerasa. En modalidades preferidas de la

invención el alcohol estabilizador es glicerol y se encuentra en el rango de 10% – 50% (p/v) con respecto a la solución de polimerasa. En modalidades preferidas de la invención el alcohol estabilizador es sorbitol y se encuentran en el rango de 3% – 15% (p/v) con respecto a la solución de polimerasa. En modalidades preferidas de la invención el alcohol estabilizador es glicerol y se encuentra en el rango de 2% – 4% (p/v) con respecto a la solución de polimerasa. En modalidades preferidas de la invención el o los aminoácidos o péptidos estabilizadores se encuentran en el rango de 0.1% – 1% (p/v) con respecto a la solución de polimerasa.

[093] En algunas modalidades preferidas, la solución de polimerasa comprende una mezcla de albúmina sérica bovina, trehalosa y glicerol. En otras modalidades preferidas, la solución de polimerasa comprende una mezcla de caseína, sacarosa y sorbitol. En modalidades preferidas, la solución de polimerasa comprende una mezcla de albúmina humana recombinante, maltosa y glicina.

[094] En modalidades preferidas de la invención, el kit comprende la cantidad suficiente de componentes para analizar entre 20 y 30 muestras, por ejemplo, 24 muestras. En modalidades particularmente preferidas, las siguientes cantidades se emplean por cada muestra a analizar:

Tabla 3: Ejemplos de volúmenes típicos de trabajo

	μl
H ₂ O tipo III	5
Solución de polimerasa	12.5
Solución de cebador directo	1
Solución de cebador reverso	1
Solución que contiene una o más sonda (s)	0.5
cDNA	5

Vol. Final	25
------------	----

EJEMPLOS

[095] Los ejemplos descritos a continuación cumplen con la función de ilustrar la mejor manera conocida por los inventores para poner en práctica la invención, por lo que no deben ser entendidos como limitaciones de la invención. De hecho, tal como podría entender el experto en la técnica, el estado de la materia proporciona información que permitiría realizar diversos cambios o modificaciones en las condiciones particulares de los métodos aquí descritos, y, que, por lo tanto, deben incluirse dentro del concepto de la presente solicitud y el alcance de las reivindicaciones adjuntas a la misma. Salvo que se indique lo contrario, las condiciones de ensayo de PCR en tiempo real son las establecidas en el párrafo [76], empleando los cebadores y sondas descritos en la Tabla 1 y los componentes establecidos en el párrafo [86].

[096] Asimismo, todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patente citadas aquí, se incorporan como referencia en su totalidad para todos los propósitos. Además, salvo que se indique lo contrario, debe entenderse que las técnicas de biología molecular empleadas en los ejemplos se llevan a cabo según los protocolos estándar.

A. Selección de biomarcador de interés

[097] Con el fin de desarrollar un método que permita el diagnóstico de la tuberculosis activa, tal como tuberculosis pulmonar activa, los inventores comenzaron la búsqueda de un biomarcador adecuado. Para ello, los inventores llevaron a cabo estudios previos de expresión de MTS2823 en un modelo *in vitro* de crecimiento de Mtb en ácidos grasos, encontrando que dicho biomarcador se expresa desde el comienzo del crecimiento bacteriano y se incrementa a medida que progresa la misma. Además, como se observa en la Figura 1, los inventores encontraron que MTS2823 es el ARN pequeño de mayor expresión *in vivo*.

Exclusividad del sRNA en micobacterias pertenecientes al MTB-Complex

[098] Además, los inventores realizaron un análisis bioinformático con genomas del denominado *Mycobacterium tuberculosis Complex* MTB-C que es un grupo de micobacterias genéticamente relacionadas que pueden causar tuberculosis en humanos y animales, El MTB-C incluyen los siguientes microorganismos:

- *Mycobacterium tuberculosis*
- *Mycobacterium africanum*
- *Mycobacterium orygis*
- *Mycobacterium bovis* y la cepa de *Bacillus Calmette–Guérin*
- *Mycobacterium microti*
- *Mycobacterium canettii*
- *Mycobacterium caprae*
- *Mycobacterium pinnipedii*
- *Mycobacterium suricattae*
- *Mycobacterium mungi*

[099] Un análisis mediante bioinformática llevado a cabo por los inventores demuestra que el biomarcador sRNA, blanco de la invención está presente en todo el MTB-C. De estas, *M. africanum* y *M. bovis* pueden causar enfermedad en humanos, las restantes causan tuberculosis en otras especies animales. *M. bovis* BCG (Bacilo de Calmette y Guérin) es empleado como la vacuna contra la tuberculosis alrededor del mundo. No se ha observado un resultado positivo con individuos vacunados durante la evaluación clínica.

[100] Asimismo, los inventores demostraron la presencia del MTS2823 en 35 muestras de esputo de pacientes que fueron diagnosticados con tuberculosis activa mediante cultivo celular, demostrando un 100% de sensibilidad y un 92% de especificidad. Estudios adicionales permitieron el desarrollo de un sistema de hibridación reversa (ilustrado en la Figura 10) que demuestra la factibilidad de su utilización para la detección de este biomarcador en el diagnóstico de la infección. Los resultados de estos ensayos se muestran en las Figuras 11 a 16.

[101] Los resultados de los ensayos de los experimentos de sensibilidad se muestran en la Figura 12, en donde es posible establecer que es posible identificar menos de 1µM de RNA total de MTB.

[102] Además, se realizaron ensayos de sensibilidad, mostrados en la Figura 13, que demuestran que el biomarcador se expresaba al medio de cultivo. Para ello, se tomó 1 ml de un cultivo líquido de MTB y se centrifugó a 13.000 rpm, posteriormente se tomaron 50 µl del sobrenadante y el precipitado se lisó empleando un bead-beater en presencia de perlas de zirconio. Como se puede apreciar, este biomarcador se secreta al medio de cultivo y por lo tanto puede ser útil en el desarrollo de una prueba POC para TBC.

[103] También se realizaron pruebas de especificidad empleando diversos microorganismos. Los resultados de estos ensayos se muestran en la Figura 14. Este biomarcador mostró ser altamente específico de MTB.

[104] Posteriormente se realizaron ensayos que demuestran que el biomarcador es detectado directamente en esputos falseados y se realizaron las pruebas para determinar el tiempo requerido de inducción. Para ello, se trabajaron 5 esputos falseados con concentraciones variables de MTB y como se puede apreciar en la Figura 15, se demostró que 4 horas de inducción son suficientes para poder detectar muestras ZN positivas. Aparte, los ensayos mostraron que este biomarcador es altamente estable, puesto que luego de 24 horas sigue siendo detectable en los esputos inducidos.

[105] En vista de lo anterior, se realizó una prueba en 85 esputos (35 positivos que tenían microorganismos viables determinados por un segundo cultivo y 50 negativos). El resultado de este ensayo se muestra en la Figura 16, en donde se evidencia que todos los esputos que habían sido identificados como positivos previamente, dieron un resultado positivo. Esto demuestra que el biomarcador es un candidato apropiado para el desarrollo de una prueba tipo POC para detección de tuberculosis activa.

[106] Posteriormente se llevó a cabo la prueba en 50 esputos ZN (-), cultivo negativo y GenExpert negativos. Como se puede apreciar en la figura 17, esta prueba también arrojó resultados muy alentadores, solo 4 esputos dieron una prueba positiva débil, indicando una baja inespecificidad en el sistema.

B. Diseño de cebadores y sondas

[107] Se diseñaron iniciadores específicos sobre la secuencia del ARN pequeño de *Mycobacterium tuberculosis* reportada en tuberculist (<https://mycobrowser.epfl.ch/>). Teniendo en cuenta parámetros como: longitud de los cebadores (18-20 pb), temperatura de anillaje y condiciones específicas de la PCR utilizando la herramienta OligoAnalyzer v3.1. La especificidad fue evaluada realizando un análisis con la herramienta básica de alineamientos BLAST (Basic Alignment Search Tool), finalmente se descartó que los iniciadores formaran estructuras secundarias entre ellos. Los cebadores (directo y reverso) diseñados en esta primera etapa se muestran en la Tabla 1, y corresponden a las secuencias SEQ ID NO: 8 y 9, respectivamente.

[108] Como puede observarse en la Figura 2, se logró amplificar el fragmento de interés (correspondiente a las 300pb del ARN MTS2823) en muestras de MTB H37Rv (Carril 1 Figura 2A). Una vez se corroboró la integridad del producto amplificado y se confirmó el tamaño esperado, el producto fue purificado y analizado (Carril 1, Figura 2B), y posteriormente clonado en células TOP 10 *E. coli*. El análisis por PCR de colonias permitió verificar la presencia del fragmento de interés (Figura 2C).

[109] A continuación, se diseñaron y sintetizaron dos sondas marcadas en su extremo 5' con FAM y en su extremo 3' con BHQ1, y tres pares de cebadores directos y reversos. Estos cebadores se muestran en la Tabla 1, y corresponden a las secuencias SEQ ID NO: 2 a 7, mientras que las sondas corresponden a las SEQ ID NO: 10 y 11.

[110] Se verificó entonces la amplificación de los fragmentos respectivos empleando las sondas y los cebadores diseñados, se utilizaron 4 diluciones de plásmidos obtenidos de las colonias previamente obtenidas (19 ng/μl, 1.9 ng/μl, 0,19 ng/μl y 0,019 ng/μl) y como control positivo de la reacción se utilizó ADN total de Mtb H37Rv. Los resultados de la amplificación empleando los cebadores directo 1 y reverso 1 en combinación con la sonda 1 se muestran en la Figura 3. Los datos obtenidos demuestran que las dos sondas diseñadas funcionan adecuadamente para detectar el ARN de interés. De este modo, se seleccionaron los cebadores directo e inverso 1 (SEQ ID NO: 2 y 3, respectivamente), y la sonda 1 (SEQ ID NO: 10) para continuar con los análisis posteriores.

C. Sensibilidad y especificidad del método de la invención

[111] A continuación, se procedió al diseño de un control positivo específico para el kit de la invención, mediante el diseño de un conjunto adicional de cebadores y la clonación del fragmento en un plásmido de expresión araBADGIII. A partir del ARN total purificado del clon pBADIII-sRNA inducido con arabinosa, se realizaron los primeros estudios de sensibilidad del método de acuerdo con la invención, se detectaron 3,5 pg/ul del ARN pequeño.

[112] Con el fin de determinar la especificidad de los cebadores y sondas diseñados para el método de la invención, se realizaron dos pruebas:

- a. Se evaluó la amplificación de MTS2823 haciendo uso de los cebadores de SEQ ID NO: 8 y 9, verificando la presencia del fragmento de 300 pb mediante geles de agarosa. En este ensayo se incluyeron microorganismos que están presentes comúnmente en muestras respiratorias y de orina. El control positivo para esta reacción es DNA de Mtb. Como puede observarse en la Figura 5A, este ensayo demostró que el biomarcador no está presente en los microorganismos estudiados.
- b. Se evaluó la amplificación del fragmento de 147pb haciendo uso de los cebadores de SEQ ID NO: 2 y 3 y su correspondiente sonda fluorescente (SEQ ID NO: 10). Se emplearon los mismos microorganismos y se

incluyeron tres ADNs correspondientes a *Mycobacterias* atípicas: *M. avium*, *M. szulgai* y *M. kansasii*. Como se observa en las Figuras 5B y 5C, la amplificación realizada por el método de la invención es específica para *Mtb*.

[113] A pesar de que la muestra 3, correspondiente a *Enterococcus faecalis* presenta una amplificación en el ciclo 38, al analizar la curva melting, se observa que esta no corresponde al fragmento amplificado. Estas reacciones fueron realizadas con un ciclo de anillaje de 64°C. Por lo tanto, el método de la presente invención es altamente específico.

[114] Tal como se observa en la Figura 5C, se usó un panel mayor de micobacterias atípicas, es decir, micobacterias no tuberculosas (MNT) aisladas de pacientes y recolectadas por el laboratorio de micobacterias de la Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB), que incluyen *M. abscessus* (dos aislados), *M. gordonae* (dos aislados), *M. avium* (dos aislados) y *M. kansasii*. Adicionalmente si incluyeron las micobacterias previamente analizadas por SYBR-green, *M. kansasii*, *M. szulgai* y *M. avium*. Los resultados demuestran que el método de la invención solo detecta *M. tuberculosis* mostrando una alta especificidad.

D. Límite de Blanco (LoB)

[115] El LoB es el valor más alto que se espera ver en una serie de resultados en una muestra que no contiene analito, en el caso del método de la invención, una muestra no contiene el sRNA. Para esta prueba se remplazó la muestra biológica por 5 µl de H₂O y la prueba se repitió 10 veces. Valores con un Cq superiores a 40 no se consideran positivos, ya que exceden la sensibilidad analítica del ensayo. El control positivo empleado fue DNA de MTB H37Rv.

[116] Los resultados se muestran en la Figura 6.

E. Procesamiento de muestra de orina para la detección de MTS2823

[117] De manera preliminar, se realizó la evaluación de una muestra de orina de un paciente diagnosticado con MTB. La muestra fue centrifugada a 14.000 rpm y luego 300 μ l del sobrenadante fueron empleados para la extracción de RNA total. El RNA precipitado fue resuspendido en agua DEPC y empleado para la qRT-PCR, se empleó un control negativo, un primer control positivo a una concentración de 3 ng/ μ l y un segundo control positivo a una concentración de 0.3 ng/ μ l. Como se observa en la figura 7, el biomarcador fue efectivamente identificado en la muestra.

[118] Con este resultado en mente, los inventores continuaron con el establecimiento de un protocolo de trabajo con muestras de orina. Como se ilustra en la Figura 8, para el establecimiento de un protocolo de trabajo, la orina recolectada fue inoculada con una concentración final de 1,6 ng/ml a 1,6 pg/ μ l del ARN total expresado por el plásmido pBADIII-sRNA. Se centrifugó a 14.000 rpm por 10 minutos, y el sobrenadante se empleó para la extracción, de acuerdo con dos metodologías:

1. Se empleó el kit Quick-cfRNA™ Serum & Plasma Kit (ZYMO) siguiendo el procedimiento indicado por el fabricante, el cual consiste en: Digestión de proteínas, precipitación del RNA, unión del RNA a la columna, lavados y finalmente elución, siguiendo las recomendaciones del fabricante.
2. La extracción de ARN por medio de un proceso que comprende las etapas de:
 - Adicionar de 50 μ l de buffer de lisis (de preparación propia) a 450 μ l de sobrenadante de orina,
 - incubar a 95°C por 10 min,
 - centrifugar a 12.000 rpm por aproximadamente 3 min, y
 - reservar el sobrenadante,
 - extraer el ARN con perlas magnéticas, y, finalmente,
 - eluir en 20 μ l de H₂O DEPC.

[119] Una vez extraído el ARN de cada una de las muestras por ambos métodos de extracción, se prosiguió con la detección del biomarcador mediante la técnica RT- qPCR de acuerdo con las condiciones previamente mencionadas (Ver Figura 9). Aun cuando no se obtienen resultados comparables a las muestras tratadas con el kit comercial, se observa amplificación del fragmento, demostrando la efectividad del método de amplificación divulgado por la presente invención.

F. Límite de detección (LoD) del fragmento de MTS2823 de *Mycobacterium tuberculosis* en condiciones de laboratorio

[120] El LoD es la concentración real a la que es muy probable que un resultado de prueba observado supere el LoB y, por lo tanto, pueda declararse como "detectado". Con el fin de determinar el límite de detección del fragmento de MTS2823 de *Mycobacterium tuberculosis*, se llevaron a cabo experimentos de transcripción "*in vitro*" que aseguran la expresión y purificación exclusivamente de dicho fragmento. Para ello se empleó el kit megascript t7 transcription kit (Thermo Fisher Scientific).

[121] Inicialmente, el fragmento de 300 pb correspondiente a la totalidad del MTS2823 fue subclonado en el vector pGEMT Easy Vector (Thermo Fisher Scientific). Este vector se caracteriza porque el fragmento insertado queda bajo el control del promotor T7 de la RNA polimerasa del virus T7.

[122] Una vez obtenido el fragmento de interés, se procedió a determinar el LoD realizando diluciones seriadas en H₂O. La concentración inicial fue de 10 ng y se realizaron 11 diluciones en base 10 por triplicado.

[123] Así, se obtuvo una curva de calibración del transcrito sRNA-TBC generada del constructo PGEM/sRNA-TBC. Los datos de la curva corresponden al CT vs Concentración inicial (expresada en escala logarítmica) de cada dilución. Mediante regresión lineal se obtuvo el coeficiente de regresión y la pendiente que describe la línea recta (Ver Figura 10A).

Tabla 3: Datos para la construcción de la curva de calibración.

Concentración ng/μl	Log [ARN]	Promedio CT
1	0	8,76333333
0,1	-1	10,2233333
0,01	-2	14,6466667
0,001	-3	18,9566667
0,0001	-4	22,3733333
0,00001	-5	25,8333333
0,000001	-6	27,9266667
0,0000001	-7	31,1633333
0,00000001	-8	35,03
0,000000001	-9	37,6233333

[124] Como se puede observar, la prueba de qPCR bajo condiciones de laboratorio es altamente sensible, con un límite de detección de 0.001 fg/μl.

G. Límite de detección (LoD) del fragmento de MTS2823 de *Mycobacterium tuberculosis* en muestras de orina intervenidas

[125] Para determinar el límite de detección en muestras clínicas reales, se utilizó una muestra de orina proveniente de un individuo sano. Se dispensó 1 mL de orina en tubos individuales y cada tubo fue inoculado con las mismas diluciones del transcrito primario del sRNA empleado para el estudio del LoD analítico. Posteriormente se realizó un protocolo de extracción de RNA empleando el kit Quick-cfRNA™ Serum & Plasma Kit (Zymo Research) y se prosiguió con la síntesis de cDNA empleando el kit New England Biolabs: LunaScript® RT SuperMix Kit -E3010 y las mismas condiciones descritas en el párrafo [76]. Como resultado, se obtuvo la curva de calibración mostrada en la Figura 10B y las curvas de amplificación mostradas en la Figura 10C.

[126] El LoD en muestras clínicas disminuye de 0.001 fg a 10 fg. Este límite de detección es altamente adecuado para pruebas moleculares.

[127] Al comparar las dos curvas: a) a nivel de laboratorio y b) en la muestra biológica intervenida podemos ver como el procesamiento de la muestra disminuye en 100X el límite de detección. El LoD de la prueba de qPCR bajo condiciones reales es altamente sensible, con un límite de detección de 0.01 fg del ARN pequeño. Esta sensibilidad es muy alta para el desarrollo de un kit diagnóstico.

H. Estudios clínicos externos

[128] El objetivo del estudio es determinar la sensibilidad diagnóstica y la especificidad clínica del método y kit de detección de la presente invención en población con sospecha clínica de tuberculosis. Se realizó un estudio retrospectivo con muestras recolectadas y tratadas con NaLC-NaOH entre el 08-05-2024 y el 31-12-2024. El estudio fue realizado por la Corporación para Investigaciones Biológicas, CIB, Medellín, laboratorio de referencia en el diagnóstico clínico y molecular de TBC. Se incluyeron 97 individuos con sospecha de TBC. A cada paciente se le realizó cultivo microbiológico empleando MGIT (gold standard) y la prueba molecular de Xpert/RIF (Xpert® MTB/RIF, Cepheid).

[129] Criterios de inclusión:

- Sospecha clínica de tuberculosis (por ejemplo, tos crónica, pérdida de peso)
- Confirmación clínica por cultivo microbiológico (prueba de oro)
- Individuos adultos, hombres y mujeres fueron incluidos en el estudio.
- No se solicitó consentimiento informado porque las muestras son el remanente de otras pruebas diagnósticas moleculares como el Expert/RIF
- Las muestras de esputo fueron recolectadas y almacenadas por la CIB

[130] Criterios de exclusión

- Muestras con un volumen insuficiente

- Pacientes con inmunodeficiencia severa o HIV

[131] Sensibilidad: capacidad de una prueba para identificar correctamente a las personas que tienen la enfermedad, es decir, la proporción de verdaderos positivos.

- El método y kit de la invención, de acuerdo con en el estudio clínico externo, mostró una sensibilidad del 64% con respecto al cultivo de MTB empleado como prueba de oro,
- El Xpert® MTB/RIF tiene una sensibilidad de 94.6% comparado con el cultivo microbiológico,

[132] Especificidad: capacidad para identificar correctamente a las personas que no tienen la enfermedad o condición que se está evaluando.

- El método y kit de la invención, en el estudio clínico externo, mostró una especificidad de 97% comparada con el cultivo microbiológico de MTB empleado como prueba de oro,
- El Xpert® MTB/RIF tiene una especificidad de 56% comparado con el cultivo microbiológico de MTB empleado como prueba de oro,

[133] Valor Predictivo Positivo (VPP): es la probabilidad de que una persona con un resultado positivo en la prueba realmente tenga la enfermedad o condición.

- EL VPP del método y kit de la invención es de 97%
- El VPP del Xpert® MTB/RIF es de 74%

[134] Valor Predictivo Negativo: es la probabilidad de que una persona con un resultado negativo en la prueba realmente no tenga la enfermedad o condición.

- El VPN del método y kit de la invención es de 66%
- El VPN del Xpert® MTB/RIF es de 88%

ALIVE-TB Resultado de la prueba		Cultivo Microbiológico		
		Positivo	Negativo	Total
ALIVE-TB	Positivo	36	1	37
	Negativo	20	40	60
	Total	56	41	97
Xpert Ultra	Positivo	53	18	71
	Negativo	3	23	26
	Total	56	41	97
Sensibilidad ALIVE-TB	64%	Sensibilidad Expert		94.6%
Especificidad ALIVE-TB	97%	Especificidad Expert		56%
VPP ALIVE-TB	97%	VPP Expert		74%
VPN ALIVE-TB	66%	VPN Expert		88%

Tabla con los resultados del ensayo clínico externo

[135] Conclusiones: Como se puede apreciar, el método y kit de la presente invención, tiene la sensibilidad y especificidad adecuada incluso con muestras que llevan almacenadas entre 8 meses y más de un año. Por lo tanto, se espera que al realizar un estudio con algunas muestras frescas para ver si la sensibilidad se incrementa.

REFERENCIAS

- ¹ Peláez, E. C., Estevez, M. C., Mongui, A., Menéndez, M. C., Toro, C., Herrera-Sandoval, O. L., ... & Lechuga, L. M. (2020). Detection and quantification of HspX antigen in sputum samples using plasmonic biosensing: toward a real point-of-care (POC) for tuberculosis diagnosis. *ACS Infectious Diseases*, 6(5), 1110-1120.
- ² Sepulveda D, Aroca MA, Varela A, Del Portillo P and Osma JF. Bioelectrochemical detection of *Mycobacterium tuberculosis* ESAT-6 in an antibody-based biomicrosystem. *Sensors* 2017: 17(10): pii: E2178: doi: 10.3390/s17102178.

-
- ³Arnvig, K. B., & Young, D. B. (2009). Identification of small RNAs in *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular microbiology*, 73(3), 397-408.
- ⁴Ostrik, A. A., Azhikina, T. L., & Salina, E. G. (2021). Small noncoding RNAs and their role in the pathogenesis of *mycobacterium tuberculosis* infection. *Biochemistry (Moscow)*, 86, S109-S119.
- ⁵Cerezo-Cortés MI, Rodríguez-Castillo JG, Mata-Espinosa DA, Bini EI, Barrios-Payan J, Zatarain-Barrón ZL, Anzola JM, Cornejo-Granados F, Ochoa-Leyva A, Del Portillo P, Murcia MI, Hernández-Pando R. Close Related Drug-Resistance Beijing Isolates of *Mycobacterium tuberculosis* Reveal a Different Transcriptomic Signature in a Murine Disease Progression Model. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022; 23(9):5157. <https://doi.org/10.3390/ijms23095157>.
- ⁶Del Portillo P, García-Morales L, Menendez MC, Anzola JM, Rodríguez JG, Helguera-Repetto AC, Ares MA, Prados-Rosales R, González-y-Merchand JA and García MJ. (2019). Hypoxia is not a main stress when *Mycobacterium tuberculosis* is in a dormancy-like long-chain-fatty acid environment. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 8:449 doi: 10.3389/fcimb.2018.00449
- ⁷Rodríguez JG, Hernández AC, Helguera-Repetto C, Aguilar Ayala D, Guadarrama-Medina R, Anzola JM, Bustos JR, Zambrano MM, González-y-Merchand J, García MJ, Del Portillo P. 2014. Global adaptation to a lipid environment triggers the dormancy-related phenotype of *Mycobacterium tuberculosis*. *mBio* 5(3):e01125-14. doi:10.1128/mBio.01125-14.
- ⁸Fu, Y., Li, W., Wu, Z., Tao, Y., Wang, X., Wei, J., & Zhang, F. (2018). Detection of mycobacterial small RNA in the bacterial culture supernatant and plasma of patients with active tuberculosis. *Biochemical and biophysical research communications*, 503(2), 490-494.
- ⁹Han, X., Li, T., Fan, Y., Wang, X., Gu, W., Lu, W., & Fu, Y. (2021). Screening of 20 *Mycobacterium tuberculosis* sRNAs in plasma for detection of active pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis*, 129, 102086.
- ¹⁰U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service Centers for Disease Control and Prevention, National Institutes of Health. 2009. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 5th Edition HHS Publication No. (CDC) 21-1112. Available from: <http://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmbl5/BMBL.pdf>

