

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 640 522**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C12Q 1/70 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.07.2011 PCT/EP2011/062959**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.02.2012 WO12013734**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.07.2011 E 11738216 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.07.2017 EP 2598656**

54 Título: **Ácidos nucleicos de control para múltiples parámetros**

30 Prioridad:

07.09.2010 EP 10175538
29.07.2010 US 368979 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.11.2017

73 Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

72 Inventor/es:

EICKHOFF, MEIKE;
HITZIGER, NICLAS;
ZIMMERMANN, DIRK;
WILL, STEPHEN, GORDON;
FISS, ELLEN, H. y
GLAUBITZ, JOACHIM

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 640 522 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

Ácidos nucleicos de control para múltiples parámetros

5 Campo de la invención

La presente invención pertenece al campo del diagnóstico *in vitro*. En este campo, se refiere particularmente a la amplificación de al menos un primer y un segundo ácido nucleico diana que pueden estar presentes en al menos una muestra fluida usando un ácido nucleico de control interno con fines cuantitativos.

10

Antecedentes de la invención

En el campo del diagnóstico molecular, la amplificación de ácidos nucleicos a partir de numerosas fuentes ha tenido una considerable importancia. Los ejemplos de aplicaciones de diagnóstico de amplificación y detección de ácidos nucleicos son la detección de virus, tales como el virus del papiloma humano (VPH), el virus del Nilo Occidental (VNO) o el cribado sistemático de donaciones de sangre para detectar la presencia del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el virus de la hepatitis B (VHB) y/o C (VHC). Además, dichas técnicas de amplificación son adecuadas para dianas bacterianas tales como micobacterias, o para el análisis de marcadores oncológicos.

15

20

La técnica de amplificación más destacada y ampliamente utilizada es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Otras reacciones de amplificación comprenden, entre otras, la reacción en cadena de la ligasa, reacción en cadena de la polimerasa ligasa, Gap-LCR, reacción en cadena de reparación, 3SR, NASBA, amplificación por desplazamiento de hebras (SDA), amplificación mediada por transcripción (TMA) y amplificación Q.

25

Los sistemas automatizados para el análisis basado en PCR a menudo hacen uso de la detección en tiempo real de la amplificación del producto durante el procedimiento de PCR en el mismo recipiente de reacción. La clave para dichos procedimientos es el uso de oligonucleótidos modificados que llevan grupos o marcadores indicadores.

30

Se ha demostrado que es posible la amplificación y detección de más de un ácido nucleico diana en el mismo recipiente. Este procedimiento se denomina comúnmente amplificación "múltiple" y requiere diferentes marcadores de diferenciación si se realiza la detección en tiempo real.

35

En el campo de los diagnósticos clínicos de ácidos nucleicos es lo más deseable o incluso obligatorio controlar la amplificación respectiva utilizando ácidos nucleicos de control con una secuencia conocida, para el control cualitativo (control del rendimiento) y/o cuantitativo (determinación de la cantidad de un ácido nucleico diana utilizando el control como referencia). Dada la diversidad especialmente de dianas diagnósticas, que comprenden ácidos nucleicos procarióticos, eucarióticos así como víricos, y dada la diversidad entre diferentes tipos de ácidos nucleicos tales como ARN y ADN, los ácidos nucleicos de control usualmente se diseñan de una manera específica. En resumen, estos controles usualmente se asemejan al ácido nucleico diana para el cual sirven como control con el fin de imitar sus propiedades durante el procedimiento. Esta circunstancia se aplica tanto para ensayos cualitativos como cuantitativos. En el caso de que se vayan a detectar múltiples parámetros en un experimento único o en experimentos paralelos, usualmente se emplean diferentes controles que se asemejan a diferentes ácidos nucleicos diana, como, por ejemplo, en Swanson et al. (J. Clin. Microbiol., (2004), 42, pp. 1863-1868). Stöcher et al. (J. Virol. Meth. (2003), 108, pp. 1-8) se describe un ácido nucleico de control en el que en la misma molécula de ADN están comprendidos múltiples controles competitivos específicos de virus.

40

45

50

El documento US 2010/0041040 describe un procedimiento para detectar y cuantificar un organismo microbiano dirigiendo dos o más porciones de secuencia del ácido nucleico respectivo. El procedimiento detallado en este documento implica un patrón de cuantificación que puede tener los mismos o diferentes sitios de unión al cebador que las secuencias diana.

La presente invención proporciona un procedimiento de amplificación controlada que utiliza un enfoque diferente que muestra diversas ventajas.

55

Descripción de la invención

La presente invención proporciona un procedimiento para la amplificación controlada de al menos un primer y un segundo ácido nucleico diana que pueden estar presentes en una muestra fluida.

60

La invención se refiere a un procedimiento para aislar y simultáneamente amplificar un primer y un segundo ácido nucleico diana que pueden estar presentes en una o más muestras fluidas, comprendiendo dicho procedimiento las etapas automatizadas de:

65

a. añadir un ácido nucleico patrón cuantitativo a cada una de dichas muestras fluidas, en el que la secuencia del ácido nucleico patrón cuantitativo se deriva de una fuente diferente del origen de las muestras fluidas, es diferente de las otras secuencias de ácido nucleico de las muestras fluidas, se deriva de un genoma vegetal y presenta mutaciones "scramble", en el que dicho ácido nucleico patrón cuantitativo tiene una concentración de entre 20 x LDD

y 5000 x LDD

- b. combinar un material de soporte sólido y dicha una o más muestras fluidas en uno o más recipientes durante un período de tiempo y en condiciones suficientes para permitir que los ácidos nucleicos que comprenden los ácidos nucleicos diana y el ácido nucleico patrón cuantitativo queden inmovilizados sobre el material de soporte sólido
- 5 c. aislar el material de soporte sólido del otro material presente en las muestras fluidas en una estación de separación
- d. purificar los ácidos nucleicos en dicha estación de separación y lavar el material de soporte sólido una o más veces con un tampón de lavado
- 10 e. poner en contacto los ácidos nucleicos diana purificados y el ácido nucleico patrón cuantitativo purificado con reactivos de amplificación que comprenden al menos un conjunto distinto de cebadores para cada uno de dichos ácidos nucleicos diana y para dicho ácido nucleico patrón cuantitativo en al menos dos recipientes de reacción para la amplificación del al menos el primer y segundo ácidos nucleicos diana y del ácido nucleico patrón cuantitativo en los al menos dos recipientes de reacción
- 15 f. incubar en dichos recipientes de reacción dichos ácidos nucleicos diana purificados y dicho ácido nucleico patrón cuantitativo purificado con dichos reactivos de amplificación durante un período de tiempo y en condiciones suficientes para que se produzca una reacción de amplificación indicativa de la presencia o ausencia de dichos ácidos nucleicos diana mientras se amplifica el primer pero no el segundo ácido nucleico diana en el primer recipiente de reacción y se amplifica el segundo pero no el primer ácido nucleico diana en el segundo recipiente de reacción
- 20 g. detectar y medir las señales generadas por los productos de amplificación de dichos ácidos nucleicos diana y que son proporcionales a la concentración de dichos ácidos nucleicos diana, y detectar y medir una señal generada por dicho ácido nucleico patrón cuantitativo
- h. determinar la cantidad de uno o más de dichos ácidos nucleicos diana usando el ácido nucleico patrón cuantitativo como referencia
- 25 en el que las condiciones para la amplificación y detección en las etapas e. a g. son idénticas para dichos primer y segundo ácidos nucleicos diana purificados y dicho ácido nucleico patrón cuantitativo.

La presente divulgación se refiere al desarrollo de ensayos simultáneos de una pluralidad de parámetros y/o tipos de ácidos nucleicos mientras se utiliza la misma secuencia de ácido nucleico de control interno para dichos diferentes parámetros y/o tipos de ácidos nucleicos. Por lo tanto, contribuye a reducir la complejidad global de los experimentos correspondientes a varios niveles: por ejemplo, sólo es necesario diseñar y añadir a las mezclas de amplificación respectivas una única secuencia de ácido nucleico de control interno, ahorrando así el tiempo y los costes de diseñar y sintetizar o comprar múltiples secuencias de ácido nucleico de control. El ensayo o los ensayos se pueden simplificar y se reduce el riesgo de errores de manipulación. Además, cuanto más diferentes son las secuencias de ácido nucleico de control empleadas en un ensayo o en ensayos paralelos llevados a cabo simultáneamente en las mismas condiciones, más complejo puede resultar el ajuste de las respectivas condiciones. Por otra parte, con un único control adecuado para una pluralidad de ácidos nucleicos, dicho control se puede dispensar desde una única fuente, por ejemplo, en diferentes recipientes que contienen dichos ácidos nucleicos diana diferentes. Como una ventaja adicional del procedimiento descrito anteriormente, el ensayo de una muestra biológica particular para otros ácidos nucleicos en posteriores posibles experimentos no necesita implicar otro procedimiento de preparación de la muestra con la adición de un ácido nucleico de control interno diferente, ya que el control usado en la invención se puede usar para controlar la amplificación de diferentes ácidos nucleicos. Así, una vez añadido un ácido nucleico de control interno, se pueden realizar ensayos de otros parámetros en la misma muestra en las mismas condiciones.

45 El ácido nucleico de control interno puede ser competitivo, no competitivo o parcialmente competitivo, mientras que el ácido nucleico patrón cuantitativo descrito en el presente documento es no competitivo.

50 Un ácido nucleico de control interno competitivo lleva esencialmente los mismos sitios de unión de cebador que la diana y, por tanto, compite por los mismos cebadores con la diana. Aunque este principio permite una buena mimetización del ácido nucleico diana respectivo debido a su estructura similar, puede disminuir la eficacia de amplificación con respecto al ácido o ácidos nucleicos diana y conducir así a un ensayo menos sensible.

55 Un ácido nucleico de control interno no competitivo tiene diferentes sitios de unión al cebador que la diana y, por lo tanto, se une a diferentes cebadores. Las ventajas de dicha configuración comprenden, entre otros, el hecho de que los eventos de amplificación únicos de los diferentes ácidos nucleicos en la mezcla de reacción pueden tener lugar independientemente unos de otros sin ningún efecto de competencia. Por lo tanto, no se producen efectos adversos con respecto al límite de detección del ensayo, como puede ser el caso en una configuración competitiva.

60 Finalmente, en una amplificación que utiliza una configuración parcialmente competitiva, el ácido nucleico de control respectivo y al menos uno de los ácidos nucleicos diana compiten por los mismos cebadores, mientras que al menos otro ácido nucleico diana se une a diferentes cebadores.

65 El hecho de que el procedimiento descrito anteriormente implique un conjunto distinto de cebadores para cada uno de dichos ácidos nucleicos diana y para dicho ácido nucleico de control interno hace que el procedimiento sea considerablemente flexible. En esta configuración no competitiva no es necesario introducir sitios de unión específicos para la diana en el ácido nucleico de control, como en el caso de una configuración competitiva, y se

evitan los inconvenientes de una configuración competitiva como se mencionó anteriormente. En una configuración no competitiva, el ácido nucleico de control interno tiene una secuencia diferente de cualquier secuencia diana, con el fin de no competir por sus cebadores y/o sondas. La secuencia del ácido nucleico de control interno es diferente de las otras secuencias de ácido nucleico en la muestra fluida. Como ejemplo, si la muestra fluida se deriva de un ser humano, el ácido nucleico de control interno no tiene preferentemente una secuencia que también se produce endógenamente en los seres humanos. La diferencia en la secuencia debería ser, por lo tanto, al menos suficientemente significativa como para no permitir la unión de cebadores y/o sondas al ácido o ácidos nucleicos endógenos respectivos en condiciones rigurosas haciendo, por lo tanto, que la configuración sea competitiva. Con el fin de evitar dicha interferencia, la secuencia del ácido nucleico de control interno utilizado en la invención deriva de una fuente diferente del origen de la muestra fluida. Además, se deriva de un genoma natural, a saber, un genoma vegetal, preferentemente de un genoma de uva. Además, el ácido nucleico derivado de un genoma vegetal presenta mutaciones "scramble". Como se conoce en la técnica, el sistema "scramble" introduce en una secuencia mutaciones de bases en una secuencia en cierta medida. Preferentemente, la secuencia del ácido nucleico de control interno utilizado en la invención está sustancialmente alterada con respecto al gen natural del que se deriva.

El procedimiento que comprende las etapas automatizadas mencionadas anteriormente también presenta varias ventajas adicionales:

Ha sido un desafío en la técnica anterior que el número de diferentes ácidos nucleicos diana en un ensayo múltiple realizado en un único recipiente de reacción esté limitado por el número de marcadores apropiados. En un ensayo de PCR en tiempo real, por ejemplo, la superposición potencial de los espectros de los fluorocromos tiene un gran impacto en el rendimiento del ensayo (riesgo de resultados falsos positivos, menor precisión, etc.). Por lo tanto, los fluoróforos respectivos se tienen que seleccionar cuidadosamente y tienen que estar espectralmente bien separados a fin de garantizar el rendimiento deseado de una prueba diagnóstica. Típicamente, el número de fluoróforos diferentes que se pueden utilizar corresponde a un número de un solo dígito de canales de fluorescencia de instrumentos de PCR.

Por el contrario, en el procedimiento descrito *supra*, la amplificación controlada internamente de al menos un primer y un segundo ácido nucleico diana tiene lugar en al menos dos recipientes de reacción diferentes, permitiendo la amplificación simultánea de un mayor número de ácidos nucleicos diana diferentes, ya que las señales generadas en los diferentes recipientes de reacción se pueden detectar independientemente las unas de las otras. Sin embargo, dentro del alcance de la presente invención están modos de realización en los que en uno o más de los múltiples recipientes de reacción se llevan a cabo reacciones múltiples, multiplicando así el número de dianas que se pueden amplificar simultáneamente y en las mismas condiciones. En dichos modos de realización, el ácido nucleico de control interno sirve como control para los diferentes ácidos nucleicos diana de un recipiente, así como para diferentes ácidos nucleicos diana de un recipiente diferente.

Se describe en el presente documento para amplificar el primero pero no el segundo ácido nucleico diana en el primer recipiente de reacción y para amplificar sólo el segundo pero no el primer ácido nucleico diana en el segundo recipiente de reacción, por ejemplo, dependiendo de la muestra y/o del ácido o ácidos nucleicos diana en cuestión.

Por lo tanto, en el procedimiento descrito anteriormente, el primer ácido nucleico diana está ausente del segundo recipiente de reacción.

Especialmente si se sospecha que una muestra fluida contiene ácidos nucleicos diana de diferentes organismos, o incluso los diferentes organismos en sí, o si no está claro cuáles de los diferentes ácidos nucleicos u organismos pueden estar presentes en dicha muestra, un modo de realización ventajoso y, por tanto, preferente de la invención es el procedimiento descrito anteriormente, en el que el primer ácido nucleico diana y el segundo ácido nucleico diana son de organismos diferentes.

Otro aspecto preferente de la invención es el procedimiento descrito anteriormente, en el que el primer y/o el segundo ácido nucleico diana es un ácido nucleico no vírico.

También, un aspecto preferente de la invención es el procedimiento descrito *supra*, en el que el primer y/o el segundo ácido nucleico diana es un ácido nucleico bacteriano.

Como se ha descrito anteriormente, el procedimiento descrito más arriba es útil para controlar cuantitativamente la amplificación de al menos un primer y un segundo ácido nucleico diana.

La detección cualitativa de un ácido nucleico en una muestra biológica es crucial, por ejemplo, para reconocer una infección de un individuo. Por lo tanto, un requisito importante para un ensayo para la detección de una infección microbiana es que se eviten resultados falsos negativos o falsos positivos, ya que dichos resultados conducirían casi inevitablemente a consecuencias graves con respecto al tratamiento del paciente respectivo. Así, especialmente en procedimientos basados en PCR, se añade un ácido nucleico de control interno cualitativo a la mezcla de detección. Dicho control es particularmente importante para confirmar la validez de un resultado de ensayo: por lo menos en el caso de un resultado negativo con respecto al ácido nucleico diana respectivo, la reacción de control interno

5 cualitativa debe reaccionar dentro de unos límites dados, es decir, se debe detectar el control interno cualitativo; de lo contrario, se considera que el ensayo no es operativo. Sin embargo, en una configuración cualitativa, dicho control interno cualitativo no tiene necesariamente que ser detectado en caso de un resultado positivo. En los ensayos cualitativos, es especialmente importante que la sensibilidad de la reacción esté garantizada y, por lo tanto, estrictamente controlada. Como consecuencia, la concentración del control interno cualitativo debe ser relativamente baja, de modo que incluso en una situación, por ejemplo, de ligera inhibición, no se detecte el control interno cualitativo y, por lo tanto, el ensayo se invalide.

10 Por tanto, en algunos casos, la presencia de un producto de amplificación de dicho ácido nucleico de control interno es indicativa de que se produce una amplificación en la mezcla de reacción incluso en ausencia de productos de amplificación para uno o más de dichos ácidos nucleicos diana.

15 Por otra parte y además de la mera detección de la presencia o ausencia de un ácido nucleico en una muestra, a menudo es importante determinar la cantidad de dicho ácido nucleico. Como ejemplo, el estadio y la gravedad de una enfermedad vírica se pueden evaluar sobre la base de la carga vírica. Además, la monitorización de cualquier terapia requiere información sobre la cantidad de un patógeno presente en un individuo con el fin de evaluar el éxito de la terapia. En un ensayo cuantitativo, es necesario introducir un ácido nucleico patrón cuantitativo que sirva de referencia para determinar la cantidad absoluta de un ácido nucleico diana. La cuantificación se puede realizar ya sea tomando como referencia una calibración externa o implementando un patrón cuantitativo interno.

20 En el caso de una calibración externa, se crean curvas de patrones en reacciones separadas usando cantidades conocidas de ácidos nucleicos idénticos o comparables. La cantidad absoluta de un ácido nucleico diana se determina posteriormente por comparación del resultado obtenido con la muestra analizada con dicha función de patrones. Sin embargo, la calibración externa tiene la desventaja de que en el control no se refleja un posible procedimiento de extracción, la variación en su eficacia ni la posible y con frecuencia no predecible presencia de agentes que inhiben la reacción de amplificación y/o detección.

25 Esta circunstancia se aplica a cualquier efecto relacionado con la muestra. Por lo tanto, se podría dar el caso de que una muestra se considere negativa debido a un fracaso en el procedimiento de extracción o a otros factores relacionados con la muestra, a pesar de que el ácido nucleico diana que se desea detectar y cuantificar esté realmente presente en la muestra.

30 Por estas y otras razones, un ácido nucleico de control interno añadido a la propia reacción de ensayo es ventajoso. Cuando actúa como patrón cuantitativo, dicho ácido nucleico de control interno tiene al menos las dos funciones siguientes en un ensayo cuantitativo:

35 i) Controla la validez de la reacción.

40 ii) Sirve como referencia en el cálculo del título, compensando así los efectos de la inhibición y controlando los procedimientos de preparación y amplificación para permitir una cuantificación más precisa. Por lo tanto, al contrario que el ácido nucleico de control interno cualitativo en un ensayo cualitativo que debe ser positivo solamente en una reacción negativa para la diana, el ácido nucleico de control cuantitativo en un ensayo cuantitativo tiene dos funciones: control de la reacción y calibración de la reacción. Por lo tanto, debe ser positivo y válido tanto en las reacciones negativas para la diana como en las positivas para la diana.

45 Además, tiene que ser adecuado para proporcionar un valor de referencia fiable para el cálculo de altas concentraciones de ácido nucleico. Así, la concentración de un ácido nucleico de control interno cuantitativo necesita ser relativamente alta.

50 Por lo tanto, el procedimiento descrito anteriormente comprende además la siguiente etapa:
h. determinar la cantidad de uno o más de dichos ácidos nucleicos diana.

55 El procedimiento controlado internamente descrito anteriormente requiere un tiempo de manipulación considerablemente menor y las pruebas son mucho más sencillas de llevar a cabo que los procedimientos de PCR en tiempo real utilizados en la técnica anterior. El procedimiento ofrece una gran ventaja, por ejemplo, en el campo de la virología clínica, ya que permite la amplificación paralela de varios virus en experimentos paralelos. El procedimiento es particularmente útil en la gestión de pacientes post-trasplante, en los que se requiere monitorización vírica frecuente. De este modo, dicho procedimiento facilita un diagnóstico rentable y contribuye a disminuir el uso de agentes antivirales y las complicaciones y hospitalizaciones víricas. Esto también se aplica al campo de la microbiología clínica. En general, se obtendrán eficiencias en un plazo menor y con una flexibilidad de ensayo mejorada. Por lo tanto, así se reduce el número de pruebas solicitadas a un paciente para hacer un diagnóstico, y posiblemente el tiempo de ingreso en el hospital (por ejemplo, si un diagnóstico se puede proporcionar antes, los pacientes que requieren terapia antimicrobiana la recibirán más pronto y así se recuperarán antes). Además, los pacientes muestran menos morbilidad y, por lo tanto, generan menos costes relacionados con la terapia de apoyo (por ejemplo, cuidados intensivos relacionados con un retraso en el diagnóstico de sepsis). Proporcionar un resultado negativo antes puede tener importantes implicaciones para la excesiva prescripción de

antibióticos. Por ejemplo, si un resultado de ensayo obtenido mediante el procedimiento de acuerdo con la invención es capaz de descartar el patógeno más rápidamente que con un procedimiento de PCR en tiempo real estándar, entonces el médico no se verá obligado a usar antibióticos empíricos. De forma alternativa, si se utilizan antibióticos empíricos, la duración del tratamiento respectivo se puede acortar.

5 Con respecto al diseño de un ensayo específico basado en el procedimiento de acuerdo con la invención, el experto en la técnica se beneficiará en particular, pero no únicamente, de las siguientes ventajas:

- una reducción de la complejidad del software (que conduce a un menor riesgo de errores de programación)
- centrar los esfuerzos de desarrollo del ensayo en la optimización de la química en lugar de la química más los
- 10 parámetros de control del instrumento
- sistema mucho más fiable, ya que siempre se utiliza un único procedimiento y el hardware se puede diseñar óptimamente para realizar este protocolo
- el experto en la técnica que realiza el procedimiento controlado internamente descrito anteriormente tiene la flexibilidad de ejecutar múltiples ensayos diferentes en paralelo como parte del mismo procedimiento
- 15 • reducción de costes.

En el sentido de la invención, "purificación", "aislamiento" o "extracción" de ácidos nucleicos se refieren a lo siguiente: antes de que los ácidos nucleicos se puedan analizar en un ensayo diagnóstico, por ejemplo, por

20 amplificación, típicamente tienen que ser purificados, aislados o extraídos de muestras biológicas que contienen mezclas complejas de diferentes componentes. A menudo, para las primeras etapas, se utilizan procedimientos que permiten el enriquecimiento de los ácidos nucleicos. Para liberar el contenido de células o partículas víricas, se pueden tratar con enzimas o con productos químicos para disolver, degradar o desnaturalizar las paredes celulares o partículas víricas. Este procedimiento se conoce comúnmente como lisado. La solución resultante que contiene dicho material lisado se denomina lisado. Un problema frecuentemente encontrado durante la lisis es que otras

25 enzimas que degradan el componente de interés, por ejemplo, desoxirribonucleasas o ribonucleasas que degradan ácidos nucleicos, entran en contacto con el componente de interés durante el procedimiento de lisis. Estas enzimas degradantes también pueden estar presentes fuera de las células o se pueden haber separado espacialmente en diferentes compartimentos celulares antes de la lisis. A medida que tiene lugar la lisis, el componente de interés queda expuesto a dichas enzimas degradantes. Otros componentes liberados durante este procedimiento pueden ser, por ejemplo, endotoxinas pertenecientes a la familia de lipopolisacáridos que son tóxicas para las células y pueden causar problemas para productos destinados a ser utilizados en terapia humana o animal.

Hay una variedad de medios para abordar el problema antes mencionado. Es común el uso de agentes caotrópicos tales como tiocianato de guanidinio o detergentes aniónicos, catiónicos, zwitteriónicos o no iónicos cuando se pretende liberar ácidos nucleicos. También es ventajoso utilizar proteasas que degradan rápidamente las enzimas previamente descritas o las proteínas no deseadas. Sin embargo, esto puede provocar otro problema, ya que dichas sustancias o enzimas pueden interferir con reactivos o componentes en etapas subsiguientes.

Las enzimas que se pueden utilizar ventajosamente en dichos procedimientos de lisis o preparación de muestras mencionados anteriormente son enzimas que escinden los enlaces amida en sustratos proteicos y que se clasifican como proteasas o (indistintamente) peptidasas (véase Walsh, 1979, *Enzymatic Reaction Mechanisms*. W. H. Freeman and Company, San Francisco, capítulo 3). Las proteasas usadas en la técnica anterior comprenden proteasas alcalinas (WO 98/04730) o proteasas ácidas (US 5.386.024). Una proteasa que ha sido ampliamente utilizada para la preparación de muestras en el aislamiento de ácidos nucleicos en la técnica anterior es la

45 proteinasa K de *Tritirachium album* (véase, por ejemplo, Sambrook J. et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989), que es activa alrededor de pH neutro y pertenece a una familia de proteasas conocida por el experto en la técnica como subtilisinas. Especialmente ventajoso para el uso en procedimientos de lisis o preparación de muestras mencionados anteriormente es la enzima esperasa, una proteasa robusta que mantiene su actividad tanto a alta alcalinidad como a altas temperaturas (EP 1 201 753).

En las etapas de preparación de la muestra que siguen a la etapa de lisis, el componente de interés se enriquece adicionalmente. Si los componentes no proteínicos de interés son, por ejemplo, ácidos nucleicos, normalmente se extraen de las mezclas de lisis complejas antes de ser utilizados en un ensayo basado en sondas.

55 Existen varios procedimientos para la purificación de ácidos nucleicos:

- procedimientos dependientes de la secuencia o bioespecíficos, como por ejemplo:
 - cromatografía de afinidad
 - hibridación con sondas inmovilizadas
- 60 - procedimientos independientes de la secuencia o fisicoquímicos, como por ejemplo:
 - extracción líquido-líquido con, por ejemplo, fenol-cloroformo
 - precipitación con, por ejemplo, etanol puro
 - extracción con papel filtro
 - extracción con agentes formadores de micelas como bromuro de cetil-trimetil-amonio
 - 65 • unión a tintes inmovilizados e intercalantes, por ejemplo, derivados de acridina
 - adsorción en gel de sílice o tierra de diatomeas

- adsorción en partículas de vidrio magnéticas (MGP) o partículas de organosilanos en condiciones caotrópicas.

Particularmente interesante para propósitos de purificación es la adsorción de ácidos nucleicos en una superficie de vidrio aunque son posibles otras superficies. En los últimos años se han propuesto muchos procedimientos para aislar los ácidos nucleicos de su entorno natural mediante el uso de su comportamiento de unión a superficies de vidrio. Si la diana son ácidos nucleicos no modificados, es preferente una unión directa de los ácidos nucleicos a un material con una superficie de sílice porque, entre otras razones, no es necesario modificar los ácidos nucleicos, e incluso se pueden unir ácidos nucleicos nativos. Estos procedimientos se describen en detalle en varios documentos. En Vogelstein B. et al., Proc. Natl. Acad. USA 76 (1979) 615-9, por ejemplo, se propone un procedimiento para la unión de ácidos nucleicos de geles de agarosa en presencia de yoduro de sodio a vidrio de sílex molido. La purificación de ADN plasmídico de bacterias sobre polvo de vidrio en presencia de perclorato de sodio se describe en Marko MA et al., Anal. Biochem. 121 (1982) 382-387. En el documento DE-A 37 34 442 se describe el aislamiento de ADN de fago M13 monocatenario en filtros de fibra de vidrio mediante precipitación de las partículas de fago usando ácido acético y lisis de las partículas de fago con perclorato. Los ácidos nucleicos unidos a los filtros de fibra de vidrio se lavan y luego se eluyen con un tampón Tris/EDTA que contiene metanol. Un procedimiento similar para purificar ADN a partir de fagos lambda se describe en Jakobi R. et al., Anal. Biochem. 175 (1988) 196-201. El procedimiento implica la unión selectiva de ácidos nucleicos a superficies de vidrio en soluciones de sales caotrópicas y la separación de los ácidos nucleicos de contaminantes tales como agarosa, proteínas o residuo celular. Para separar las partículas de vidrio de los contaminantes, se pueden centrifugar las partículas o se pueden extraer los fluidos a través de filtros de fibra de vidrio. Este es, sin embargo, un paso limitante que impide que el procedimiento se utilice para procesar grandes cantidades de muestras. El uso de partículas magnéticas para inmovilizar ácidos nucleicos después de la precipitación mediante la adición de sal y etanol es más ventajoso y se describe, por ejemplo, en Alderton R.P. et al., S., Anal. Biochem. 201 (1992) 166-169 y WO9112079. En este procedimiento, los ácidos nucleicos se aglutinan junto con las partículas magnéticas. El aglutinado se separa del disolvente original aplicando un campo magnético y realizando una etapa de lavado. Después de una etapa de lavado, los ácidos nucleicos se disuelven en un tampón Tris. Sin embargo, este procedimiento tiene la desventaja de que la precipitación no es selectiva para los ácidos nucleicos. En su lugar, también se aglutinan una variedad de sustancias sólidas y disueltas. Como resultado, este procedimiento no se puede usar para eliminar cantidades significativas de cualquier inhibidor de reacciones enzimáticas específicas que pueda estar presente. También está disponible en el mercado un vidrio magnético poroso que contiene partículas magnéticas en una matriz de vidrio porosa particular y que está cubierto con una capa que contiene estreptavidina. Este producto se puede utilizar para aislar materiales biológicos, por ejemplo, proteínas o ácidos nucleicos, si se modifican en una etapa de preparación compleja para que se unan covalentemente a biotina. Adsorbentes particulados magnetizables resultaron ser muy eficaces y adecuados para la preparación automática de muestras. Para este fin se utilizan pigmentos ferrimagnéticos y ferromagnéticos, así como superparamagnéticos. Las partículas de vidrio magnéticas y los procedimientos que las utilizan más preferentes son los descritos en el documento WO 01/37291. Particularmente útil para el aislamiento de ácidos nucleicos en el contexto de la invención es el procedimiento de acuerdo con R. Boom et al. (J Clin Microbiol. 28 (1990), 495-503).

El término "material de soporte sólido" comprende cualquiera de los materiales sólidos mencionados anteriormente en relación con la inmovilización de ácidos nucleicos, por ejemplo, partículas de vidrio magnéticas, fibras de vidrio, filtros de fibra de vidrio, papel de filtro, etc., aunque el material de soporte sólido no se limita a estos materiales.

Por lo tanto, un aspecto preferente de la invención es el procedimiento descrito anteriormente, en el que el material de soporte sólido comprende uno o más de los materiales seleccionados entre sílice, metal, óxidos metálicos, plástico, polímeros y ácidos nucleicos. En un modo de realización muy preferente de la invención, el material de soporte sólido son partículas de vidrio magnéticas.

"Inmovilizar", en el contexto de la invención, significa capturar objetos tales como, por ejemplo, ácidos nucleicos de una manera reversible o irreversible. Particularmente, "inmovilizado sobre el material de soporte sólido" significa que el objeto u objetos se asocian al material de soporte sólido con el fin de conseguir su separación de cualquier medio circundante, y se pueden recuperar, por ejemplo, separándolos del material de soporte sólido posteriormente. En este contexto, "inmovilización" puede comprender, por ejemplo, la adsorción de ácidos nucleicos en vidrio u otras superficies adecuadas de materiales sólidos como se ha descrito *supra*. Además, los ácidos nucleicos se pueden "inmovilizar" específicamente uniéndose a sondas de captura, en las que los ácidos nucleicos están unidos a ácidos nucleicos esencialmente complementarios unidos a un soporte sólido mediante apareamiento de bases. En este último caso, dicha inmovilización específica conduce a la unión predominante de los ácidos nucleicos diana.

Después de la purificación o aislamiento de los ácidos nucleicos que incluyen los ácidos nucleicos diana de su entorno natural, el análisis se puede realizar, por ejemplo, mediante la amplificación simultánea descrita *supra*.

"Simultáneamente", en el sentido de la invención, significa que dos acciones, tales como la amplificación de un primer y un segundo o más ácidos nucleicos, se realizan al mismo tiempo y en las mismas condiciones físicas. En un modo de realización, la amplificación simultánea de al menos el primer y el segundo ácidos nucleicos diana se realiza en un recipiente. En otro modo de realización, la amplificación simultánea se lleva a cabo con al menos un ácido nucleico en un recipiente y al menos un segundo ácido nucleico en un segundo recipiente, al mismo tiempo y

en las mismas condiciones físicas, particularmente con respecto a la temperatura y el tiempo de incubación, en el que el ácido nucleico de control interno mencionado anteriormente está presente en cada uno de dichos recipientes.

El "primer ácido nucleico diana" y el "segundo ácido nucleico diana" son ácidos nucleicos diferentes.

5 Una "muestra fluida" es cualquier material fluido que se puede someter a un ensayo de diagnóstico dirigido a ácidos nucleicos y se deriva preferentemente de una fuente biológica. También preferentemente, dicha muestra fluida se deriva de un humano y es un líquido corporal. En un modo de realización preferente de la invención, la muestra fluida es sangre, orina, esputo, sudor, frotis, heces pipeteables o líquido cefalorraquídeo humanos. Más
10 preferentemente, la muestra fluida es sangre humana.

El término "recipiente de reacción" comprende, pero no se limita a, tubos o a los pocillos de placas tales como placas de micropocillos, pocillos profundos u otros tipos de placas multipocillo, en los que tiene lugar una reacción para el análisis de la muestra fluida tal como p.ej. transcripción inversa o una reacción en cadena de la polimerasa. Los
15 límites o paredes exteriores de dichos recipientes son químicamente inertes de modo que no interfieren en la reacción analítica que tiene lugar dentro de ellos. Preferentemente, el aislamiento de los ácidos nucleicos como se ha descrito anteriormente también se lleva a cabo en una placa multipocillo.

En este contexto, las placas multipocillo de sistemas analíticos permiten la separación y el análisis en paralelo o el almacenamiento de múltiples muestras. Las placas multipocillo se pueden optimizar para maximizar la captación de líquido o la transferencia de calor. Una placa multipocillo preferente para su uso en el contexto de la presente
20 invención se optimiza para incubar o separar un analito en un analizador automatizado. Preferentemente, la placa multipocillo está construida y dispuesta para entrar en contacto con un dispositivo magnético y/o un dispositivo de calentamiento.

Dicha placa multipocillo preferente, que se denomina indistintamente "placa de procesamiento" en el contexto de la invención, comprende:

- una superficie superior que comprende múltiples recipientes con aberturas en la parte superior dispuestos en filas. Los recipientes comprenden una parte superior, una parte central y una parte inferior. La parte superior está unida a
30 la superficie superior de la placa multipocillo y comprende dos lados más largos y dos más cortos. La parte central tiene una sección transversal sustancialmente rectangular con dos lados más largos y dos lados más cortos;
- dos paredes laterales más cortas opuestas y dos paredes laterales más largas opuestas y
- una base, en la que dicha base comprende una abertura construida y dispuesta para colocar la placa multipocillo en contacto con dicho dispositivo magnético y/o dispositivo de calentamiento.
35

En un modo de realización preferente de la placa multipocillo, los recipientes adyacentes de una misma fila están unidos en el lado más largo de dicha forma casi rectangular.

Preferentemente, la placa multipocillo comprende un espacio continuo que está situado entre filas adyacentes de recipientes. Dicho espacio continuo está construido y dispuesto para alojar un dispositivo magnético en forma de placa. En un modo de realización preferente, la parte inferior de los recipientes comprende un fondo esférico. En un modo de realización más preferente, la parte inferior de dichos recipientes comprende una parte cónica situada entre dicha parte central y dicho fondo esférico.
40

En un modo de realización preferente, la superficie superior comprende nervios, en los que dichos nervios rodean las aberturas de los recipientes. Preferentemente, un lado más corto de dicha parte superior de los recipientes comprende un rebaje, comprendiendo dicho rebaje una superficie doblada que se extiende desde el nervio hacia el interior del recipiente.
45

Además, en un modo de realización preferente, los recipientes comprenden una forma interior redondeada.

Para la fijación a las estaciones de procesamiento o de incubación, la base comprende preferentemente un reborde que comprende rebajes. Los clips de retención de una estación de un analizador se pueden acoplar a dichos rebajes para fijar la placa a una estación.
55

En un modo de realización preferente, los recipientes comprenden un espesor de pared esencialmente constante.

La placa de procesamiento preferente (101) en el contexto de la presente invención es una placa de 1 componente. Su superficie superior (110) comprende recipientes múltiples (103) (Fig. 5, Fig. 6). Cada recipiente tiene una abertura (108) en la parte superior y está cerrada en el extremo inferior (112). La superficie superior (110) comprende nervios (104) que están preferentemente elevados con respecto a la superficie superior (110) y rodean las aberturas (108) de los recipientes (103). Esto evita la contaminación del contenido de los recipientes (103) con gotitas de líquido que pueden caer sobre la superficie superior (110) de la placa (101). Las vistas de una placa de procesamiento preferente se muestran en las Figs. 3 a 8.
60

La huella de la placa de procesamiento (101) comprende preferentemente una longitud y anchura de la base
65

correspondientes al formato de huella de la norma ANSI SBS. Más preferentemente, la longitud es de 127,76 mm +/- 0,25 mm, y la anchura es de 85,48 mm +/- 0,25 mm. De este modo, la placa (101) tiene dos paredes laterales más cortas opuestas (109) y dos paredes laterales más largas opuestas (118). La placa de procesamiento (101) comprende elementos de bloqueo de forma (106) para interactuar con un manipulador (500, Fig. 12). La placa de procesamiento (101) se puede sujetar, transportar y posicionar de forma rápida y segura a alta velocidad manteniendo la orientación y posición correctas. Preferentemente, los elementos de bloqueo de forma (106) para el agarre están situados dentro de la parte central superior, preferentemente en el tercio central superior de la placa de procesamiento (101). Esto tiene la ventaja de que una distorsión potencial de la placa de procesamiento (101) tiene sólo un efecto menor sobre los elementos de bloqueo de forma (106) y que la manipulación de la placa (101) es más robusta.

La placa de procesamiento (101) comprende preferentemente identificadores de hardware (102) y (115). Los identificadores de hardware (102) y (115) son únicos para la placa de procesamiento (101) y diferentes de los identificadores de hardware de otros consumibles utilizados en el mismo sistema. Los identificadores de hardware (102, 115) comprenden preferentemente crestas (119) y/o rebajes (125) en las paredes laterales de los consumibles, en el que dicho patrón de crestas (119) y/o rebajes (125) es único para un tipo específico de consumible, preferentemente la placa de procesamiento (101). Este patrón único también se denomina en el presente documento una "geometría de superficie" única. Los identificadores de hardware (102, 115) garantizan que el usuario sólo pueda cargar la placa de procesamiento (101) en la posición de apilador apropiada de un instrumento analítico en la orientación apropiada. En los lados de la placa de procesamiento (101) están comprendidos elementos de guiado (116) y (117) (Fig. 3, Fig. 4). Evitan la inclinación de la placa de procesamiento (101). Los elementos de guiado (116, 117) permiten al usuario cargar las placas de procesamiento (101) con elementos de guiado (116, 117) en forma de pila en un instrumento analítico que se transfiere entonces verticalmente al interior del instrumento en un apilador sin inclinación de las placas.

La parte central (120) de los recipientes (103) tiene una sección transversal casi rectangular (Fig. 6, Fig. 7). Están separadas a lo largo del lado más largo (118) de la forma casi rectangular por una pared común (113) (Fig. 3). La fila de recipientes (103) formada de este modo tiene la ventaja de que, a pesar del limitado espacio disponible, tienen un gran volumen, preferentemente de 4 ml. Otra ventaja es que, debido al espesor de pared esencialmente constante, la producción es muy económica. Una ventaja adicional es que los recipientes (103) se refuerzan entre sí y, de este modo, se puede obtener una alta estabilidad de la forma.

Entre las hileras de recipientes (103) se encuentra un espacio continuo (121) (Fig. 6, Fig. 7). El espacio (121) puede acomodar imanes (202, 203) o dispositivos de calentamiento (128) (Fig. 11). Estos imanes (202, 203) y dispositivos de calentamiento (128) son, preferentemente, dispositivos sólidos. Así, las partículas magnéticas (216) comprendidas en líquidos (215) que pueden ser retenidas en los recipientes (103) se pueden separar del líquido (215) ejerciendo un campo magnético sobre los recipientes (103) cuando los imanes (202, 203) son llevados a las proximidades de los recipientes (103). O el contenido de los recipientes (103) se puede incubar a una temperatura elevada y controlada cuando la placa de procesamiento (101) se coloca sobre el dispositivo de calentamiento (128). Puesto que los imanes (202, 203) o dispositivos de calentamiento (128) pueden ser sólidos, se puede conseguir una alta densidad de energía. La forma casi rectangular de la parte central (120) de los recipientes (103) (figura 10) también optimiza el contacto entre la pared del recipiente (109) y un imán de forma plana (202) o dispositivo de calentamiento (128) optimizando la superficie de contacto entre el recipiente (103) y el imán (202) o dispositivo de calentamiento (128) y, por lo tanto, aumentando la transferencia de energía dentro del recipiente (103).

En la zona del fondo cónico (111) de los recipientes, el espacio (121) es aún más pronunciado y puede acomodar otros imanes (203). La combinación de los imanes grandes (202) en el área superior y los imanes más pequeños (203) en el área cónica de los recipientes permite la separación de partículas magnéticas (216) en volúmenes más grandes o pequeños de líquido (215). Los imanes pequeños (203), por lo tanto, facilitan el secuestro de las partículas magnéticas (216) durante el pipeteado de eluato. Esto hace posible pipetear el eluato con una pérdida mínima reduciendo el volumen muerto del pellet de partículas magnéticas (216). Además, la presencia de partículas magnéticas (216) en el eluato transferido se minimiza.

En el extremo superior de los recipientes (103), una de las paredes laterales más cortas (109) del recipiente (103) comprende un canal de entrada de reactivos (105) que se extiende hasta el nervio circunferencial (104) (Figs. 3, 4, 7). Los reactivos se pipetean sobre el canal de entrada de reactivos (105) y drenan el canal (105) dentro del recipiente (103). De este modo, se evita el contacto entre la aguja o punta de la pipeta (3, 4) y el líquido contenido en el recipiente. Además, se evitan las salpicaduras resultantes de la dispensación directa del líquido en otro líquido (215) contenido en los recipientes (103), que puede causar la contaminación de la aguja o punta de la pipeta (3, 4) o de los recipientes vecinos (103). El pipeteado secuencial en el canal de entrada de reactivos (105) de pequeños volúmenes de reactivos seguido por el volumen más grande de otro reactivo garantiza que los reactivos que se añaden solo en pequeñas cantidades se drenen completamente al recipiente (103). Por lo tanto, el pipeteado de pequeños volúmenes de reactivos es posible sin pérdida de precisión del ensayo que se va a realizar.

En el interior, en el fondo de los recipientes (111, 112), la forma se vuelve cónica (111) y termina con un fondo esférico (112) (Fig. 6, Fig. 7). La forma interior del recipiente (114), incluyendo la parte central rectangular (120), es

redondeada. La combinación de fondo esférico (112), forma interior redondeada (114), parte cónica (111) y superficie refinada de los recipientes (103) conduce a una mecánica de fluidos favorable que facilita una separación y purificación efectivas de analitos en la placa de procesamiento (101). El fondo esférico (112) permite un uso esencialmente completo del eluato separado y una reducción del volumen muerto que reduce la transferencia de reactivos o la contaminación cruzada de la muestra.

El reborde en la base (129) de la placa de procesamiento (101) comprende rebajes (107) para acoplamiento con clips de retención (124) en la estación de procesamiento (201) o dispositivo de calentamiento (128) o instrumento analítico (126) (Fig. 5, Fig. 9). El acoplamiento de los clips de retención (124) con los rebajes (107) permite posicionar y fijar la placa de procesamiento (101) en la estación de procesamiento (201). La presencia de los rebajes (107) permite que la fuerza de retención actúe sobre la placa de procesamiento (101) casi verticalmente a la base (129). Por lo tanto, sólo pueden existir pequeñas fuerzas que actúan lateralmente. Esto reduce la aparición de tensiones y, por tanto, la deformación de la placa de procesamiento (101). Las fuerzas de retención verticales también pueden neutralizar cualquier deformación de la placa de procesamiento (101) conduciendo a un posicionamiento más preciso de los fondos esféricos (111) en la estación de procesamiento (201). En general, la interfaz precisa entre la placa de procesamiento (101) y la estación de procesamiento (201) o dispositivo de calentamiento (128) dentro de un analizador reduce los volúmenes muertos y también reduce el riesgo de contaminación cruzada de la muestra.

Una "estación de separación" es un dispositivo o un componente de un sistema analítico que permite el aislamiento del material de soporte sólido del otro material presente en la muestra fluida. Dicha estación de separación puede comprender, por ejemplo, pero sin limitación, una centrífuga, una gradilla con tubos de filtro, un imán u otros componentes adecuados. En un modo de realización preferente de la invención, la estación de separación comprende uno o más imanes. Preferentemente, se utilizan uno o más imanes para la separación de partículas magnéticas, preferentemente partículas de vidrio magnéticas, como soporte sólido. Si, por ejemplo, la muestra fluida y el material de soporte sólido se combinan entre sí en los pocillos de una placa multipocillo, entonces uno o más imanes comprendidos por la estación de separación pueden, por ejemplo, entrar en contacto con la propia muestra fluida introduciendo los imanes en los pocillos, o dichos uno o más imanes pueden ser llevados cerca de las paredes exteriores de los pocillos con el fin de atraer las partículas magnéticas y posteriormente separarlas del líquido circundante.

En un modo de realización preferente, la estación de separación es un dispositivo que comprende una placa multipocillo que comprende recipientes con una abertura en la superficie superior de la placa multipocillo y un fondo cerrado. Los recipientes comprenden una parte superior, una parte central y una parte inferior, en el que la parte superior está unida a la superficie superior de la placa multipocillo y preferentemente comprende dos lados más largos y dos más cortos. La parte central tiene una sección transversal sustancialmente rectangular con dos lados más largos, en el que dichos recipientes están alineados en filas. Un espacio continuo está situado entre dos filas adyacentes para poner en contacto selectivamente al menos un imán montado en un accesorio con las paredes laterales en al menos dos posiciones Z. El dispositivo comprende además una estación de separación magnética que comprende al menos un accesorio. El accesorio comprende al menos un imán que genera un campo magnético. Está presente un mecanismo móvil que mueve verticalmente dicho al menos un accesorio que comprende al menos un imán al menos entre una primera y una segunda posición con respecto a los recipientes de la placa multipocillo. Preferentemente, dichas al menos dos posiciones Z de los recipientes comprenden las paredes laterales y la parte inferior de dichos recipientes. El campo magnético de dicho al menos un imán atrae preferentemente las partículas magnéticas hacia una superficie interna del recipiente adyacente a dicho al menos un imán cuando dicho al menos un imán está en dicha primera posición. El efecto de dicho campo magnético es menor cuando dicho al menos un imán está en dicha segunda posición que cuando dicho al menos un imán está en dicha primera posición. Preferentemente, el accesorio que comprende dicho al menos un imán comprende un bastidor. Los recipientes tienen características preferentes como se ha descrito anteriormente en el contexto de la placa multipocillo / placa de procesamiento. Una de dichas características preferentes es que al menos una parte de dichos recipientes tiene una sección transversal sustancialmente rectangular ortogonal al eje de dichos recipientes.

En dicha primera posición, dicho al menos un imán está adyacente a dicha parte de dichos recipientes. Se entiende que adyacente significa en estrecha proximidad, tal como para ejercer un campo magnético sobre el contenido del recipiente, o en contacto físico con el recipiente.

La estación de separación comprende un bastidor para recibir la placa multipocillo, y clips de retención para fijar la placa multipocillo. Preferentemente, la estación de separación comprende dos tipos de imanes. Este modo de realización preferente se describe adicionalmente a continuación.

Un segundo modo de realización preferente se describe a continuación, que comprende un muelle que ejerce una presión sobre el bastidor que comprende los imanes de modo que los imanes son presionados contra los recipientes de la placa multipocillo.

Preferentemente, los primeros imanes están contruidos y dispuestos para interactuar con recipientes de una placa multipocillo para ejercer un campo magnético sobre un gran volumen de líquido que comprende partículas

magnéticas retenidas en dichos recipientes. Dichos segundos imanes están contruidos y dispuestos preferentemente para interactuar con recipientes de una placa multipocillo para ejercer un campo magnético sobre un pequeño volumen de líquido que comprende partículas magnéticas retenidas en dichos recipientes. Dichos primeros y segundos imanes se pueden mover a diferentes posiciones Z.

5 Útil en el contexto de la presente invención y de dicha estación de separación es además un procedimiento de aislamiento y purificación de un ácido nucleico. El procedimiento comprende las etapas de unir un ácido nucleico a partículas magnéticas en un recipiente de una placa multipocillo. El recipiente comprende una abertura superior, una parte central y una parte inferior. El material unido se separa entonces del material no unido contenido en un líquido cuando la mayor parte del líquido está situada por encima de la sección en la que la parte cónica del recipiente da paso a la parte central con forma rectangular, moviendo un imán desde una segunda posición hasta una primera posición y, en dicha primera posición, aplicando un campo magnético a la parte central y, opcionalmente, aplicando adicionalmente un campo magnético a la parte inferior de dicho recipiente. Las partículas magnéticas se pueden lavar opcionalmente con una solución de lavado. Un pequeño volumen de líquido, en el que la mayor parte del líquido está situado por debajo de la sección donde la parte cónica del recipiente da paso a la parte central con forma rectangular, se separa de dichas partículas magnéticas aplicando selectivamente un campo magnético a la parte inferior de dicho recipiente.

20 Útil en el contexto de la presente invención es también una estación de separación magnética para separar un ácido nucleico unido a partículas magnéticas, comprendiendo dicha estación de separación unos primeros imanes que están contruidos y dispuestos para interactuar con recipientes de una placa multipocillo para ejercer un campo magnético sobre un gran volumen de líquido que comprende partículas magnéticas retenidas en dichos recipientes, y unos segundos imanes contruidos y dispuestos para interactuar con recipientes de una placa multipocillo para ejercer un campo magnético sobre un pequeño volumen de líquido que comprende partículas magnéticas retenidas en dichos recipientes, y en el que dichos primeros y segundos imanes se pueden mover a diferentes posiciones Z. En el presente documento se describen modos de realización preferentes de la estación de separación magnética.

A continuación se describe un primer modo de realización preferente de una estación de separación (201) útil para la presente invención. El primer modo de realización preferente de dicha estación de separación (201) comprende al menos dos tipos de imanes (202, 203). El primer tipo de imán largo (202) está contruido y dispuesto para encajar en el espacio (121) de la placa de procesamiento (101). De este modo, el imán (202) ejerce un campo magnético sobre el líquido (215) del recipiente (103) para secuestrar partículas magnéticas (216) en el interior de la pared del recipiente. Esto permite separar las partículas magnéticas (216) y cualquier material unido a ellas y el líquido (215) del interior del recipiente (103) cuando está presente un gran volumen de líquido (215). El imán (202) tiene una estructura alargada y está contruido y dispuesto para interactuar con la parte central esencialmente rectangular (120) del recipiente. Por lo tanto, el imán (202) se usa cuando la mayor parte del líquido (215) está situada por encima de la sección donde la parte cónica (111) del recipiente (103) da paso a la parte central (120) con forma rectangular. Como se muestra en la Fig. 40, la construcción preferente de los imanes (202) comprende accesorios (204, 204a) que comprenden imanes (202) que encajan en el espacio (121) entre las filas de recipientes (103) en la placa de procesamiento (101). Otro modo de realización preferente de imanes (202) comprende imanes (202) dispuestos en accesorios (204, 204a). Los imanes (203) de la estación de separación preferente (201) son más pequeños y pueden interactuar con la parte cónica (111) del recipiente (103). Esto se muestra en la Fig. 10. Los imanes (203) están dispuestos preferentemente sobre una base (205) que se puede mover dentro del espacio (121) de la placa de procesamiento (101). Cada imán (202, 203) está contruido preferentemente para interactuar con dos recipientes (103) en dos filas adyacentes. En un modo de realización preferente, la placa de procesamiento (101) tiene 6 filas de 8 recipientes (103). Una estación de separación (201) que puede interactuar con la placa de procesamiento preferente (101) tiene tres accesorios (204, 204a) que comprenden imanes (202) y cuatro bases (205) que comprenden imanes (203). También se incluye un modo de realización en el que la estación de separación tiene cuatro accesorios magnéticos (204, 204a) que comprenden imanes (202) y tres bases magnéticas (205) que comprenden imanes (203).

Los imanes (202, 203) son móviles. La estación de separación (201) comprende un mecanismo para mover los accesorios (204, 204a) y las bases (205). Todos los accesorios (204, 204a) están interconectados por una base (217) y, por lo tanto, se mueven de forma coordinada. Todos los imanes (203) están unidos a una base (218) y, de este modo, se mueven de forma coordinada. El mecanismo para mover las placas magnéticas (202) y (203) está contruido y dispuesto para mover los dos tipos de placas magnéticas (202, 203) a un total de cuatro posiciones finales:

60 en la Fig. 40 a-c, los imanes (203) están situados próximos a la parte cónica de los recipientes (103) de la placa de procesamiento (101). Esta es la posición más alta de los imanes (203), y es la posición de separación. En esta figura, los imanes (202) están situados en la posición más baja. No participan en la separación cuando están en esta posición.

65 En el modo de realización preferente mostrado en la Fig. 10, la base (217) de imanes (202) está conectada a una rueda de posicionamiento (206). La base (217) comprende un extremo inferior (207) que está flexiblemente en contacto con un elemento de conexión (208) mediante un elemento móvil (209). Dicho elemento móvil está

construido y dispuesto para mover el elemento de conexión (208) a lo largo de un carril (212) de un lado al otro. Dicho elemento móvil (209) está fijado al elemento de conexión (208) con un pasador (220). Dicho elemento de conexión (208) está fijado a la rueda de posicionamiento (206) mediante un tornillo (210). El elemento de conexión (208) está también conectado al eje (211). Dicho elemento de conexión (208) es preferentemente una placa rectangular. Cuando la rueda de posicionamiento (206) se desplaza excéntricamente, alrededor de un eje (211), de tal manera que el tornillo (210) se desplaza desde un punto situado por encima del eje excéntrico hasta un punto situado por debajo del eje excéntrico, el elemento móvil (209) y el extremo inferior (207) de la base (204) con los imanes (202) fijados a la misma se mueven desde la posición más alta hasta la posición más baja. La base (218) está montada sobre una parte inferior (219) y está conectada, en su extremo inferior, con el pasador (213) a un elemento móvil (214), que es preferentemente una rueda, que interactúa con la rueda de posicionamiento (206). Cuando la rueda de posicionamiento (206) gira alrededor del eje (211), la rueda (214) se desplaza a lo largo de la rueda de posicionamiento (206). Si la rueda (214) está situada en una sección de la rueda de posicionamiento (206) donde la distancia desde el eje (211) es corta, los imanes (203) están en su posición más baja. Cuando la rueda (214) está situada en una sección de la rueda de posicionamiento (206) donde la distancia desde el eje (211) es máxima, los imanes (203) están en su posición más alta. Así, en el modo de realización preferente del primer modo de realización de la estación de separación, la posición de los imanes (203) está controlada por la forma de la rueda de posicionamiento (206). Cuando el elemento móvil (209) se mueve a lo largo de la parte central, superior redondeada o inferior (212a) del carril (212), el tipo pequeño de imanes (203) se mueve hacia arriba y hacia abajo. Cuando el elemento móvil (209) está situado en el lado (212b) del extremo inferior (207) y se mueve hacia arriba o hacia abajo, los imanes (202) se mueven hacia arriba o hacia abajo. La rueda de posicionamiento puede ser girada por cualquier motor (224).

En un modo de realización preferente, un muelle (225) está unido a la base (222) de la estación de separación y a la base (218) de imanes (203) para garantizar que los imanes (203) se muevan hasta la posición más baja cuando se mueven hacia abajo.

El término "pasador", tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier elemento de fijación, incluyendo tornillos o clavijas.

En un segundo modo de realización preferente, la estación de separación (230) comprende al menos un accesorio (231) que comprende al menos un imán (232), preferentemente un número de imanes igual a un número de recipientes (103) de una fila (123). Preferentemente, la estación de separación (230) comprende un número de accesorios (231) igual al número de filas (123) de la placa multipocillo (101) descrita anteriormente en el presente documento. Más preferentemente, seis accesorios (231) están montados en la estación de separación (230). Al menos un imán (232) está montado en un accesorio (231). Preferentemente, el número de imanes (232) es igual al número de recipientes (103) de una fila (123). Lo más preferentemente, ocho imanes (232) están montados en un accesorio (231). Preferentemente, un tipo de imán (232) está comprendido en dicho accesorio (231). Más preferentemente, el imán (232) está montado en un lado orientado hacia los recipientes con los que interactúa el imán.

El accesorio (231) está montado sobre una base (233). Preferentemente, dicho montaje es flexible. La base (233) comprende muelles (234) montados sobre la misma. El número de muelles (234) es al menos un muelle por accesorio (231) montado sobre dicha base (233). La base comprende además un chaflán (236) que limita el movimiento del muelle y, en consecuencia, del accesorio (231) que comprende los imanes (232). Preferentemente, uno cualquiera de dichos muelles (234) está construido y dispuesto para interactuar con un accesorio (231). Más preferentemente, dicho muelle (234) es un muelle de báscula. Dicha interacción controla el movimiento horizontal de los accesorios (231). Además, la estación de separación (230) comprende un bastidor (235). La base (233) con accesorios (231) está conectada al bastidor (235) mediante un mecanismo móvil como se ha descrito anteriormente para los imanes (232) del primer modo de realización.

Preferentemente, dicha base (233) y accesorio (231) están contruidos y dispuestos para moverse verticalmente (en la dirección Z).

La placa multipocillo (101) descrita anteriormente en el presente documento se inserta en la estación de separación (230). El accesorio (231) que comprende los imanes (232) se mueve verticalmente. Por lo tanto, cualquier accesorio (232) se mueve dentro de un espacio (121) entre dos filas (123) de recipientes (103). El movimiento vertical hace que los imanes (232) montados sobre un accesorio (231) entren en contacto con los recipientes (103). La posición Z se elige dependiendo del volumen de líquido (215) dentro de los recipientes (103). Para grandes volúmenes, los imanes (232) entran en contacto con los recipientes (103) en una posición central (120) donde los recipientes (103) tienen una forma casi rectangular. Para pequeños volúmenes de líquido (215) donde la mayor parte del líquido (215) está situada por debajo de la parte central (120) de los recipientes (103), los imanes (232) entran preferentemente en contacto con la parte cónica (111) de los recipientes (103).

Un muelle está unido a la base (233) de cualquier marco (231) (Fig. 9a, b)). El muelle presiona los imanes (232) contra los recipientes (103). Esto garantiza un contacto entre los imanes (232) y los recipientes (103) durante la separación magnética. Preferentemente, el imán (232) entra en contacto con el recipiente (103) en la pared lateral

(109) situada por debajo de la entrada (105). Esto tiene la ventaja de que el líquido que se añade mediante pipeteado fluye sobre las partículas magnéticas secuestradas y garantiza que las partículas se resuspenden y que todas las muestras de todos los recipientes se tratan de forma idéntica.

- 5 Este modo de realización es particularmente adecuado para separar un líquido (215) comprendido en una placa multipocillo (101) como se ha descrito anteriormente en el presente documento, de partículas magnéticas (216) cuando los recipientes (103) de dicha placa multipocillo (101) contienen diferentes niveles de líquido (215).

10 Un "tampón de lavado" es un fluido que está diseñado para eliminar componentes no deseados, especialmente en un procedimiento de purificación. Dichos tampones se conocen bien en la técnica. En el contexto de la purificación de ácidos nucleicos, el tampón de lavado es adecuado para lavar el material de soporte sólido con el fin de separar el ácido nucleico inmovilizado de cualquier componente no deseado. El tampón de lavado puede contener, por ejemplo, etanol y/o agentes caotrópicos en una solución tamponada o soluciones con un pH ácido sin etanol y/o agentes caotrópicos como se ha descrito anteriormente. A menudo, la solución de lavado u otras soluciones se proporcionan como soluciones madre que tienen que ser diluidas antes de su uso.

15 El lavado en el procedimiento de acuerdo con la invención requiere un contacto más o menos intensivo del material de soporte sólido y los ácidos nucleicos inmovilizados sobre el mismo con el tampón de lavado. Diferentes procedimientos son posibles para conseguir esto, por ejemplo, agitando el tampón de lavado con el material de soporte sólido en o junto con el recipiente o recipientes respectivos. Otro procedimiento ventajoso es aspirar y dispensar la suspensión que comprende tampón de lavado y material de soporte sólido una o más veces. Este procedimiento se lleva a cabo preferentemente usando una pipeta, en el que dicha pipeta preferentemente comprende una punta de pipeta desechable en la que se aspira dicha suspensión y a partir de la cual se dispensa de nuevo. Dicha punta de pipeta se puede usar varias veces antes de ser desechada y reemplazada. Las puntas de pipeta desechables útiles para la invención tienen preferentemente un volumen de al menos 10 µl, más preferentemente de al menos 15 µl, más preferentemente de al menos 100 µl, más preferentemente de al menos 500 µl, más preferentemente de al menos 1 ml, incluso más preferentemente de aproximadamente 1 ml. Las pipetas utilizadas en el contexto de la invención también pueden ser agujas de pipeteado.

30 Así, un aspecto preferente de la invención es el procedimiento descrito anteriormente, en el que dicho lavado en la etapa d. comprende aspirar y dispensar el tampón de lavado que comprende el material de soporte sólido.

35 Para el tratamiento posterior de los ácidos nucleicos aislados, puede ser ventajoso separarlos del material de soporte sólido antes de someterlos a amplificación.

Por lo tanto, un aspecto preferente de la invención es el procedimiento descrito anteriormente, en el que dicho procedimiento comprende además en la etapa d. la etapa de elución de los ácidos nucleicos purificados del material de soporte sólido con un tampón de elución después del lavado de dicho material de soporte sólido.

40 Un "tampón de elución" en el contexto de la invención es un líquido adecuado para separar los ácidos nucleicos del soporte sólido. Dicho líquido puede ser, por ejemplo, agua destilada o soluciones salinas acuosas, tales como, por ejemplo, tampones Tris como Tris HCl, o HEPES, u otros tampones adecuados conocidos por el experto en la técnica. El valor de pH de dicho tampón de elución es preferentemente alcalino o neutro. Dicho tampón de elución puede contener componentes adicionales tales como, por ejemplo, quelantes como EDTA, que estabiliza los ácidos nucleicos aislados por inactivación de enzimas degradantes.

45 La elución se lleva a cabo preferentemente a temperaturas elevadas, de modo que un modo de realización preferente de la invención es el procedimiento descrito anteriormente, en donde la etapa d. se lleva a cabo a una temperatura entre 70 °C y 90 °C, más preferentemente a una temperatura de 80 °C.

50 Los "reactivos de amplificación", en el contexto de la invención, son componentes químicos o bioquímicos que permiten la amplificación de ácidos nucleicos. Dichos reactivos comprenden, pero no se limitan a, polimerasas de ácidos nucleicos, tampones, mononucleótidos tales como nucleósidos trifosfato, oligonucleótidos, por ejemplo, como cebadores de oligonucleótidos, sales y sus respectivas soluciones, sondas de detección, tintes y más.

55 Como se conoce en la técnica, un "nucleósido" es una combinación base-azúcar. La porción de base del nucleósido es, normalmente, una base heterocíclica. Las dos clases más comunes de tales bases heterocíclicas son purinas y pirimidinas.

60 Los "nucleótidos" son nucleósidos que incluyen además un grupo fosfato unido covalentemente a la porción de azúcar del nucleósido. Para aquellos nucleósidos que incluyen un azúcar pentofuranosilo, el grupo fosfato puede estar unido al resto hidroxilo 2', 3' o 5' del azúcar. Un nucleótido es la unidad monomérica de un "oligonucleótido", que se puede designar más generalmente como un "compuesto oligomérico", o un "polinucleótido", designado más generalmente como un "compuesto polimérico". Otra expresión general de lo anteriormente mencionado es ácido desoxirribonucleico (ADN) y ácido ribonucleico (ARN).

65

De acuerdo con la invención, un "compuesto oligomérico" es un compuesto que consiste en "unidades monoméricas" que pueden ser nucleótidos solos o compuestos no naturales (véase más adelante), más específicamente nucleótidos modificados (o análogos de nucleótidos) o compuestos no nucleótidos, solos o combinaciones de los mismos.

5 "Oligonucleótidos" y "oligonucleótidos modificados" (o "análogos de oligonucleótidos") son subgrupos de compuestos oligoméricos. En el contexto de la presente invención, el término "oligonucleótido" se refiere a componentes formados a partir de una pluralidad de nucleótidos como sus unidades monoméricas. Los grupos fosfato se entienden comúnmente como parte integrante del esqueleto internucleósido del oligonucleótido. El enlace o esqueleto normal del ARN y el ADN es un enlace fosfodiéster de 3' a 5'. Los oligonucleótidos y los oligonucleótidos modificados (véase más adelante) útiles para la invención se pueden sintetizar como se describe principalmente en la técnica y es conocido por el experto en la materia. Los procedimientos para preparar compuestos oligoméricos de secuencias específicas son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, clonación y restricción de secuencias apropiadas y síntesis química directa. Los procedimientos de síntesis química pueden incluir, por ejemplo, el procedimiento de fosfotriéster descrito por Narang S. A. et al., *Methods in Enzymology* 68 (1979) 90-98, el procedimiento de fosfodiéster divulgado por Brown E. L., et al., *Methods in Enzymology* 68 (1979) 109-151, el procedimiento de fosforamida divulgado en Beaucage et al., *Tetrahedron Letters* 22 (1981) 1859, el procedimiento de H-fosfonato divulgado en Garegg et al., *Chem. Scr.* 25 (1985) 280-282 y el procedimiento de soporte sólido divulgado en el documento US 4.458.066.

20 En el procedimiento descrito anteriormente, los oligonucleótidos se pueden modificar químicamente, es decir, el cebador y/o la sonda comprenden un nucleótido modificado o un compuesto no nucleotídico. La sonda o el cebador es entonces un oligonucleótido modificado.

25 Los "nucleótidos modificados" (o "análogos de nucleótidos") difieren de un nucleótido natural en alguna modificación pero consisten todavía en una base, un azúcar pentofuranosilo, una porción de fosfato, una porción de tipo base de tipo azúcar pentofuranosilo y de tipo fosfato o combinaciones de los mismos. Por ejemplo, un marcador puede estar unido a la porción de base de un nucleótido, por lo que se obtiene un nucleótido modificado. Una base natural en un nucleótido también puede ser reemplazada por, por ejemplo, una 7-deazapurina, por lo que también se obtiene un nucleótido modificado.

30 Un "oligonucleótido modificado" (o "análogo de oligonucleótido"), perteneciente a otro subgrupo específico de compuestos oligoméricos, posee uno o más nucleótidos y uno o más nucleótidos modificados como unidades monoméricas. Por lo tanto, el término "oligonucleótido modificado" (o "análogo de oligonucleótido") se refiere a estructuras que funcionan de manera sustancialmente similar a los oligonucleótidos y se pueden usar indistintamente en el contexto de la presente invención. Desde un punto de vista de la síntesis, un oligonucleótido modificado (o un análogo de oligonucleótido) se puede preparar, por ejemplo, mediante modificación química de oligonucleótidos por modificación apropiada del esqueleto de fosfato, de la unidad de ribosa o de las bases de nucleótidos (Uhlmann y Peyman, *Chemical Reviews* 90 (1990) 543; Verma S., y Eckstein F., *Annu. Rev. Biochem.* 67 (1998) 99-134). Las modificaciones representativas incluyen enlaces fosforotioato, fosforditioato, metil fosfonato, fosfotriéster o fosforamido entre nucleósidos en lugar de enlaces fosfodiéster internucleósidos; deaza- o azapurinas y pirimidinas en lugar de bases de purina y pirimidina naturales, bases de pirimidina que tienen grupos sustituyentes en la posición 5 o 6; bases de purina que tienen grupos sustituyentes alterados en las posiciones 2, 6 u 8 o en la posición 7 como 7-deazapurinas; bases que llevan restos alquilo, alqueno, alquino o arilo, por ejemplo, grupos alquilo inferiores tales como grupos metilo, etilo, propilo, butilo, terc-butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo o grupos arilo tales como fenilo, bencilo, naftilo; azúcares que tienen grupos sustituyentes en, por ejemplo, su posición 2'; o análogos carbocíclicos o acíclicos de azúcar. Otras modificaciones consistentes con el espíritu de la presente invención son conocidas por los expertos en la técnica. Dichos oligonucleótidos modificados (o análogos de oligonucleótidos) se describen mejor como funcionalmente intercambiables con, pero estructuralmente diferentes de, oligonucleótidos naturales. De forma detallada, modificaciones ejemplares se divulgan en Verma S., y Eckstein F., *Annu. Rev. Biochem.* 67 (1998) 99-134 o en el documento WO 02/12263. Además, se puede realizar una modificación en la que las unidades nucleosídicas se unen mediante grupos que sustituyen a los enlaces fosfato internucleósidos o enlaces fosfato-azúcar. Dichos enlaces incluyen los divulgados en Verma S., y Eckstein F., *Annu. Rev. Biochem.* 67 (1998) 99-134. Cuando se utilizan enlaces distintos de fosfato para unir las unidades nucleosídicas, dichas estructuras también se han descrito como "oligonucleósidos".

55 Un "ácido nucleico", así como el "ácido nucleico diana", es un compuesto polimérico de nucleótidos como es conocido por el experto en la técnica. En el presente documento se utiliza "ácido nucleico diana" para indicar un ácido nucleico en una muestra que se debe analizar, es decir, en el que se debe determinar la presencia, la no presencia y/o la cantidad del mismo en una muestra.

60 El término "cebador" se usa en el presente documento como es conocido por el experto en la técnica y se refiere a compuestos oligoméricos, principalmente a oligonucleótidos, pero también a oligonucleótidos modificados que son capaces de cebar la síntesis de ADN mediante una ADN polimerasa dependiente de molde, es decir, el extremo 3' del cebador, por ejemplo, proporciona un grupo 3'-OH libre al que se pueden unir nucleótidos adicionales mediante una ADN polimerasa dependiente de molde para establecer un enlace fosfodiéster 3' a 5' de modo que se utilizan

desoxinucleósidos trifosfato y se libera pirofosfato.

Una "sonda" también designa un oligonucleótido natural o modificado. Como se conoce en la técnica, una sonda sirve para detectar un analito o un amplificado. En el caso del procedimiento descrito anteriormente, se pueden usar sondas para detectar los amplificados de los ácidos nucleicos diana. Para este propósito, las sondas suelen llevar marcadores.

Los "marcadores", a menudo denominados "grupos indicadores", son en general grupos que hacen que un ácido nucleico, en particular oligonucleótidos u oligonucleótidos modificados, así como cualquier ácido nucleico unido a ellos, resulte distinguible del resto de la muestra (los ácidos nucleicos que tienen unido un marcador también se pueden denominar compuestos de unión a ácidos nucleicos marcados, sondas marcadas o, simplemente, sondas). Los marcadores preferentes de acuerdo con la invención son marcadores fluorescentes, que son, por ejemplo, tintes fluorescentes tales como un tinte de fluoresceína, un tinte de rodamina, un tinte de cianina y un tinte de cumarina. Los tintes fluorescentes preferentes de acuerdo con la invención son FAM, HEX, JA270, CAL635, Coumarin343, Quasar705, Cyan500, CY5.5, LC-Red 640, LC-Red 705.

En el contexto de la invención, cualquier cebador y/o sonda se puede modificar químicamente, es decir, el cebador y/o la sonda comprenden un nucleótido modificado o un compuesto no nucleotídico. La sonda o el cebador es entonces un oligonucleótido modificado.

Un procedimiento preferente de amplificación de ácidos nucleicos es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que se divulga, entre otras referencias, en las Patentes de EE. UU. n.º 4.683.202, 4.683.195, 4.800.159 y 4.965.188. La PCR emplea típicamente dos o más cebadores oligonucleotídicos que se unen a un molde de ácido nucleico seleccionado (por ejemplo, ADN o ARN). Los cebadores útiles para el análisis de ácidos nucleicos incluyen oligonucleótidos capaces de actuar como un punto de iniciación de la síntesis de ácido nucleico dentro de las secuencias de ácido nucleico de los ácidos nucleicos diana. Un cebador se puede purificar a partir de un hidrolizado de restricción por procedimientos convencionales, o se puede producir sintéticamente. El cebador es preferentemente monocatenario para una máxima eficacia en la amplificación, pero el cebador puede ser bicatenario. Los cebadores bicatenarios se desnaturalizan primero, es decir, se tratan para separar las hebras. Un procedimiento para desnaturalizar ácidos nucleicos bicatenarios es la aplicación de calor. Una "polimerasa termoestable" es una enzima polimerasa que es estable frente al calor, es decir, es una enzima que cataliza la formación de productos de extensión de cebadores complementarios a un molde y no se desnaturaliza irreversiblemente cuando se somete a las temperaturas elevadas durante el tiempo necesario para efectuar la desnaturalización de ácidos nucleicos molde bicatenarios. En general, la síntesis se inicia en el extremo 3' de cada cebador y continúa en la dirección 5' a 3' a lo largo de la cadena del molde. Las polimerasas termoestables se han aislado, por ejemplo, de *Thermus flavus*, *T. ruber*, *T. thermophilus*, *T. aquaticus*, *T. lacteus*, *T. rubens*, *Bacillus stearothermophilus* y *Methanothermobacter feravidus*. Sin embargo, las polimerasas que no son termoestables también se pueden emplear en ensayos de PCR siempre que se reponga la enzima.

Si el ácido nucleico molde es bicatenario, es necesario separar las dos cadenas antes de que se pueda usar como molde en la PCR. La separación de cadenas se puede realizar mediante cualquier procedimiento de desnaturalización adecuado como medios físicos, químicos o enzimáticos. Un procedimiento para separar las cadenas de ácido nucleico implica calentar el ácido nucleico hasta que se desnaturaliza predominantemente (por ejemplo, se desnaturaliza más de un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 95 %). Las condiciones de calentamiento necesarias para desnaturalizar el ácido nucleico molde dependerán, por ejemplo, de la concentración de sal de tampón y de la longitud y composición de nucleótidos de los ácidos nucleicos que se van a desnaturalizar, pero típicamente oscilan entre aproximadamente 90 °C y aproximadamente 105 °C durante un tiempo que depende de características de la reacción tales como la temperatura y la longitud del ácido nucleico. La desnaturalización se realiza típicamente durante aproximadamente 5 segundos a 9 minutos. Con el fin de no exponer la polimerasa respectiva como, por ejemplo, la polimerasa de ADN Z05, a dichas altas temperaturas durante demasiado tiempo y de arriesgar así una pérdida de enzima funcional, es preferente el uso de etapas de desnaturalización cortas.

En un modo de realización preferente de la invención, la etapa de desnaturalización es de hasta 30 segundos, más preferentemente hasta 20 segundos, más preferentemente hasta 10 segundos, más preferentemente hasta 5 segundos, lo más preferentemente de aproximadamente 5 segundos.

Si el ácido nucleico molde bicatenario se desnaturaliza por calor, la mezcla de reacción se deja enfriar hasta una temperatura que promueva la hibridación de cada cebador con su secuencia diana en los ácidos nucleicos diana.

La temperatura para la hibridación es preferentemente de aproximadamente 35 °C a aproximadamente 70 °C, más preferentemente de aproximadamente 45 °C a aproximadamente 65 °C; más preferentemente de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 60 °C, más preferentemente de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 58 °C. Los tiempos de hibridación pueden ser de aproximadamente 10 segundos a aproximadamente 1 minuto (por ejemplo, de aproximadamente 20 segundos a aproximadamente 50 segundos, de aproximadamente 30 segundos a aproximadamente 40 segundos). En este contexto, puede ser ventajoso utilizar diferentes temperaturas de hibridación para aumentar la inclusividad del ensayo respectivo. En resumen, esto significa que a temperaturas de

5 hibridación relativamente bajas, los cebadores también se pueden unir a dianas que tienen errores de apareamiento
 únicos, de modo que también se pueden amplificar variantes de ciertas secuencias. Esto puede ser deseable si, por
 ejemplo, un determinado organismo tiene variantes genéticas conocidas o desconocidas que también deben ser
 detectadas. Por otra parte, las temperaturas de hibridación relativamente altas tienen la ventaja de proporcionar una
 10 especificidad más alta, ya que a temperaturas más altas disminuye continuamente la probabilidad de unión del
 cebador a secuencias diana que no coincidan exactamente. Para beneficiarse de ambos fenómenos, en algunos
 modos de realización de la invención es preferente que el procedimiento descrito anteriormente comprenda
 hibridación a diferentes temperaturas, preferentemente primero a una temperatura más baja, luego a una
 temperatura más alta. Si, por ejemplo, una primera incubación tiene lugar a 55 °C durante aproximadamente
 15 5 ciclos, secuencias diana que no coinciden exactamente pueden ser (pre)amplificadas. Esto puede ir seguido, por
 ejemplo, de aproximadamente 45 ciclos a 58 °C, proporcionando una mayor especificidad en la mayor parte del
 experimento. De esta manera, las variantes genéticas potencialmente importantes no se pierden, mientras que la
 especificidad se mantiene relativamente alta.

15 La mezcla de reacción se ajusta después a una temperatura a la cual se promueve u optimiza la actividad de la
 polimerasa, es decir, una temperatura suficiente para que se produzca la extensión del cebador hibridado para
 generar productos complementarios al ácido nucleico que se va a analizar. La temperatura debe ser suficiente para
 sintetizar un producto de extensión a partir de cada cebador que se hibrida a un molde de ácido nucleico, pero no
 debe ser tan alta como para desnaturalizar un producto de extensión de su molde complementario (por ejemplo, la
 20 temperatura para extensión varía en general de aproximadamente 40 °C a aproximadamente 80 °C (por ejemplo, de
 aproximadamente 50 °C a aproximadamente 70 °C, aproximadamente 60 °C). Los tiempos de extensión pueden ser
 de aproximadamente 10 segundos a aproximadamente 5 minutos, preferentemente de aproximadamente
 15 segundos a 2 minutos, más preferentemente de aproximadamente 20 segundos a aproximadamente 1 minuto,
 más preferentemente de aproximadamente 25 segundos a aproximadamente 35 segundos. Las cadenas recién
 25 sintetizadas forman una molécula bicatenaria que se puede usar en las etapas sucesivas de la reacción. Las etapas
 de separación, hibridación y elongación de la cadena se pueden repetir tantas veces como sea necesario para
 producir la cantidad deseada de productos de amplificación correspondientes a los ácidos nucleicos diana. Los
 factores limitantes en la reacción son las cantidades de cebadores, de enzima termoestable y de nucleósidos
 trifosfato presentes en la reacción. Las etapas de ciclación (es decir, desnaturalización, hibridación y extensión) se
 30 repiten preferentemente al menos una vez. Para el uso en la detección, el número de etapas de ciclación dependerá,
 por ejemplo, de la naturaleza de la muestra. Si la muestra es una mezcla compleja de ácidos nucleicos, se
 necesitarán más etapas de ciclación para amplificar la secuencia diana suficientemente para la detección. En
 general, las etapas de ciclación se repiten al menos aproximadamente 20 veces, pero se pueden repetir hasta 40, 60
 o incluso 100 veces.

35 Se puede llevar a cabo una PCR en la que las etapas de hibridación y extensión se realizan en la misma etapa (PCR
 en una etapa) o, como se ha descrito anteriormente, en etapas separadas (PCR en dos etapas). Realizar la
 hibridación y la extensión conjuntamente y, por lo tanto, en las mismas condiciones físicas y químicas, con una
 enzima adecuada tal como, por ejemplo, la ADN polimerasa Z05, tiene la ventaja de ahorrar el tiempo necesario
 40 para realizar una etapa adicional en cada ciclo y también de suprimir la necesidad de realizar un ajuste de
 temperatura adicional entre la hibridación y la extensión. Por lo tanto, la PCR en una etapa reduce la complejidad
 global del ensayo respectivo.

45 En general, son preferentes tiempos más cortos para la amplificación global, ya que se reduce el tiempo hasta el
 resultado y pueden conseguir un diagnóstico en menos tiempo.

Otros procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos preferentes a utilizar en el contexto de la invención
 comprenden la reacción en cadena de la ligasa (LCR; Wu D. Y. y Wallace R. B., Genomics 4 (1989) 560-69; y
 Barany F., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 (1991) 189-193); la reacción en cadena de la polimerasa ligasa (Barany F.,
 50 PCR Methods and Applic. 1 (1991) 5-16); Gap-LCR (WO 90/01069); la reacción en cadena de reparación
 (documento EP 0439182 A2), 3SR (Kwoh D.Y. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 1173-1177; Guatelli J.C.,
 et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 (1990) 1874-1878; documento WO 92/08808) y NASBA (documento US
 5.130.238). Además, están la amplificación por desplazamiento de hebras (SDA), amplificación mediada por
 transcripción (TMA) y amplificación por Qb (para una revisión véase, por ejemplo, Whelen A. C. y Persing D. H.,
 55 Annu. Rev. Microbiol. 50(1996) 349-373; Abramson R. D. y Myers T. W., Curr Opin Biotechnol 4 (1993) 41-47).

El ácido nucleico de control interno usado en la presente invención presenta preferentemente las siguientes
 propiedades relativas a su secuencia:

- 60 - una temperatura de fusión de 55 °C a 90 °C, más preferentemente de 65 °C a 85 °C, más preferentemente de
 70 °C a 80 °C, más preferentemente de aproximadamente 75 °C
- una longitud de hasta 500 bases o pares de bases, más preferentemente de 50 a 300 bases o pares de bases,
 más preferentemente de 100 a 200 bases o pares de bases, más preferentemente de aproximadamente 180 bases
 65 o pares de bases

- un contenido de GC de un 30 % a 70 %, más preferentemente de un 40 % a 60 %, lo más preferentemente de aproximadamente un 50 %.

5 En el contexto de la invención, una "secuencia" es la estructura primaria de un ácido nucleico, es decir, la disposición específica de las nucleobases simples de las que están constituidos los ácidos nucleicos respectivos. Se debe entender que el término "secuencia" no denota un tipo específico de ácido nucleico tal como ARN o ADN, sino que se aplica a ambos, así como a otros tipos de ácidos nucleicos tales como, por ejemplo, APN u otros. Cuando las nucleobases se corresponden entre sí, particularmente en el caso del uracilo (presente en el ARN) y la timina (presente en el ADN), estas bases se pueden considerar equivalentes entre secuencias de ARN y ADN, como es bien conocido en la técnica pertinente.

10 Los ácidos nucleicos clínicamente relevantes son a menudo ADN que se puede derivar, por ejemplo, de virus de ADN tales como virus de la hepatitis B (VHB), citomegalovirus (CMV) y otros, o bacterias como, por ejemplo, *Chlamydia trachomatis* (CT), *Neisseria gonorrhoeae* (NG) y otros. En dichos casos, puede ser ventajoso utilizar un ácido nucleico de control interno que consiste en ADN, con el fin de reflejar las propiedades de los ácidos nucleicos diana.

15 Por lo tanto, un aspecto preferente de la invención es el procedimiento descrito anteriormente, en el que dicho ácido nucleico de control interno es ADN.

20 Por otra parte, numerosos ácidos nucleicos relevantes para el diagnóstico clínico son ácidos ribonucleicos como, por ejemplo, los ácidos nucleicos de virus de ARN tales como, por ejemplo, el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), el virus de la hepatitis C (VHC), el virus del Nilo Occidental (VNO), el virus del papiloma humano (VPH), el virus de la encefalitis japonesa (VEJ), el virus de la encefalitis de St. Louis (VESL) y otros. La presente invención se puede aplicar fácilmente a dichos ácidos nucleicos. En este caso, puede ser ventajoso utilizar un ácido nucleico de control interno que consiste en ARN, con el fin de reflejar las propiedades de los ácidos nucleicos diana. Si se va a analizar tanto el ARN como el ADN en el procedimiento descrito *supra*, es preferente que el ácido nucleico de control interno sea ARN, ya que el ácido nucleico de control interno imita preferentemente la diana más sensible de un ensayo que implica múltiples dianas, y las dianas de ARN suelen necesitar un control más estrecho.

25 Por lo tanto, un aspecto preferente de la invención es el procedimiento descrito anteriormente, en el que dicho ácido nucleico de control interno es ARN.

30 Dado que el ARN es más propenso a la degradación que el ADN debido a influencias tales como pH alcalino, ribonucleasas, etc., los ácidos nucleicos de control interno hechos de ARN se proporcionan preferentemente como partículas encapsuladas. Las partículas encapsuladas tales como ARN especialmente encapsulado se describen, por ejemplo, en el documento EP910643. En resumen, el ARN, que se puede producir químicamente o, preferentemente, heterológicamente, por ejemplo, por bacterias tales como, por ejemplo, *E. coli*, está al menos parcialmente encapsulado en una proteína de cubierta vírica. Esto último confiere resistencia al ARN contra influencias externas, en particular ribonucleasas. Se debe entender que el ADN de control interno también se puede proporcionar como una partícula encapsulada. Tanto el ARN encapsulado como el ADN encapsulado son útiles como ácidos nucleicos de control interno en el contexto de la invención. En un modo de realización preferente, los ácidos nucleicos de control de ARN se encapsulan con la proteína de cubierta MS2 de *E. coli*. En un modo de realización preferente adicional, los ácidos nucleicos de control de ADN se encapsulan utilizando el fago lambda GT11.

35 Por lo tanto, un aspecto preferente de la invención es el procedimiento descrito anteriormente, en el que dicho ácido nucleico de control interno es un ácido nucleico encapsulado.

40 Típicamente, en procedimientos diagnósticos de ácidos nucleicos basados en la amplificación, los moldes de ARN se transcriben a ADN antes de la amplificación y detección.

45 Por consiguiente, un aspecto preferente de la invención es el procedimiento descrito anteriormente, en el que dichos reactivos de amplificación comprenden una polimerasa con actividad de transcriptasa inversa, comprendiendo dicho procedimiento entre la etapa e. y la etapa f. la etapa de incubación de dichos ácidos nucleicos purificados en dichos recipientes de reacción con dichos uno o más reactivos de amplificación durante un período de tiempo y en unas condiciones adecuadas para la transcripción de ARN por dicha polimerasa con actividad de transcriptasa inversa.

50 Una "polimerasa con actividad de transcriptasa inversa" es una polimerasa de ácido nucleico capaz de sintetizar ADN basado en un molde de ARN. También es capaz de formar un ADN bicatenario después de que el ARN se haya transcrito de manera inversa a un ADNc monocatenario. En un modo de realización preferente de la invención, la polimerasa con actividad de transcriptasa inversa es termoestable.

55 En un modo de realización preferente, el procedimiento de acuerdo con la invención comprende la incubación de una muestra que contiene un molde de ARN con un cebador oligonucleotídico suficientemente complementario a dicho molde de ARN como para hibridarse con este último, y una ADN polimerasa preferentemente termoestable en

presencia de al menos los cuatro desoxirribonucleósidos trifosfato naturales o modificados, en un tampón apropiado que comprende un tampón de iones metálicos que, en un modo de realización preferente, tampona tanto el pH como la concentración de iones metálicos. Esta incubación se realiza a una temperatura suficiente para que dicho cebador se hibride con dicho molde de ARN y dicha ADN polimerasa para catalizar la polimerización de dichos desoxirribonucleósidos trifosfato para formar una secuencia de ADNc complementaria a la secuencia de dicho molde de ARN.

Como se usa en el presente documento, el término "ADNc" se refiere a una molécula de ADN complementaria sintetizada usando una cadena de ácido ribonucleico (ARN) como molde. El ARN puede ser, por ejemplo, ARNm, ARNt, ARNr u otra forma de ARN, tal como ARN vírico. El ADNc puede ser monocatenario, bicatenario o puede estar unido mediante enlaces de hidrógeno a una molécula de ARN complementaria como en un híbrido ARN/ADNc.

Un cebador adecuado para la hibridación a un molde de ARN también puede ser adecuado para la amplificación por PCR. Para PCR, un segundo cebador, complementario a la cadena de ADNc transcrita inversamente, proporciona un sitio de iniciación para la síntesis de un producto de extensión.

En la amplificación de una molécula de ARN por una ADN polimerasa, la primera reacción de extensión es la transcripción inversa usando un molde de ARN, y se produce una cadena de ADN. La segunda reacción de extensión, usando el molde de ADN, produce una molécula de ADN bicatenario. De este modo, la síntesis de una cadena de ADN complementaria a partir de un molde de ARN mediante una ADN polimerasa proporciona el material de partida para la amplificación.

Las ADN polimerasas termoestables se pueden usar en una reacción combinada de transcripción inversa y amplificación con una sola enzima. El término "homogéneo", en este contexto, se refiere a una reacción de adición única de dos etapas para la transcripción inversa y la amplificación de una diana de ARN. Por homogéneo se entiende que, después de la etapa de transcripción inversa (RT), no hay necesidad de abrir el recipiente de reacción o de ajustar de otro modo los componentes de reacción antes de realizar la etapa de amplificación. En una reacción RT/PCR no homogénea, después de la transcripción inversa y antes de la amplificación, uno o más de los componentes de la reacción tales como los reactivos de amplificación se ajustan, añaden o diluyen, por ejemplo, para lo cual es necesario abrir el recipiente de reacción o, al menos, manipular su contenido. Aunque tanto los modos de realización homogéneos como los no homogéneos están comprendidos en el alcance de la invención, es preferente el formato homogéneo para RT/PCR.

La transcripción inversa es un paso importante en una RT/PCR. Por ejemplo, es conocido en la técnica que los moldes de ARN muestran una tendencia hacia la formación de estructuras secundarias que puede obstaculizar la unión del cebador y/o el alargamiento de la cadena de ADNc por la respectiva transcriptasa inversa. Por lo tanto, las temperaturas relativamente altas para una reacción de RT son ventajosas con respecto a la eficiencia de la transcripción. Por otra parte, el aumento de la temperatura de incubación también implica una mayor especificidad, es decir, los cebadores de la RT no se hibridarán a secuencias que presentan errores de apareamiento con la secuencia o secuencias esperadas. Particularmente en el caso de múltiples ARN diana diferentes, puede ser deseable también transcribir y posteriormente amplificar y detectar secuencias con errores de apareamiento únicos, por ejemplo, en el caso de la posible presencia de subcepas o subespecies desconocidas o raras de organismos en la muestra fluida.

Con el fin de beneficiarse de ambas ventajas descritas anteriormente, es decir, la reducción de estructuras secundarias y la transcripción inversa de moldes con errores de apareamiento, es preferente llevar a cabo la incubación de RT a más de una temperatura diferente.

Por lo tanto, un aspecto preferente de la invención es el procedimiento descrito anteriormente, en el que dicha incubación de la polimerasa con actividad de transcriptasa inversa se lleva a cabo a diferentes temperaturas de 30 °C a 75 °C, preferentemente de 45 °C a 70 °C, más preferentemente de 55 °C a 65 °C.

Como un aspecto importante adicional de la transcripción inversa, las etapas de RT prolongadas pueden dañar las moldes de ADN que pueden estar presentes en la muestra fluida. Si la muestra fluida contiene tanto especies de ARN como de ADN, es favorable mantener la duración de las etapas de RT lo más cortas posible, pero al mismo tiempo garantizar la síntesis de cantidades de ADNc suficientes para la posterior amplificación y detección opcional de amplificados.

Por lo tanto, un aspecto preferente de la invención es el procedimiento descrito anteriormente, en el que el período de tiempo para la incubación de la polimerasa con actividad de transcriptasa inversa es de hasta 30 minutos, 20 minutos, 15 minutos, 12,5 minutos, 10 minutos, 5 minutos o 1 minuto.

Un aspecto preferente adicional de la invención es el procedimiento descrito anteriormente, en el que la polimerasa con actividad de transcriptasa inversa y que comprende una mutación se selecciona del grupo que consiste en

a) una ADN polimerasa CS5

- b) una ADN polimerasa CS6
- c) una ADN polimerasa de *Thermotoga maritima*
- d) una ADN polimerasa de *Thermus aquaticus*
- e) una ADN polimerasa de *Thermus thermophilus*
- 5 f) una ADN polimerasa de *Thermus flavus*
- g) una ADN polimerasa de *Thermus filiformis*
- h) una ADN polimerasa de *Thermus sp. Sps17*
- i) una ADN polimerasa de *Thermus sp. Z05*
- 10 j) una ADN polimerasa de *Thermotoga neapolitana*
- k) una ADN polimerasa de *Thermosipho africanus*
- l) una ADN polimerasa de *Thermus caldophilus*

Particularmente adecuados para estos requisitos son enzimas que llevan una mutación en el dominio de la polimerasa que aumenta su eficacia de transcripción inversa en términos de una tasa de extensión más rápida.

15 Por lo tanto, un aspecto preferente de la invención es el procedimiento descrito anteriormente, en el que la polimerasa con actividad de transcriptasa inversa es una polimerasa que comprende una mutación que confiere una tasa de extensión de ácido nucleico mejorada y/o una actividad de transcriptasa inversa mejorada con respecto a la polimerasa de tipo natural respectiva.

20 En un modo de realización más preferente, en el procedimiento descrito anteriormente, la polimerasa con actividad de transcriptasa inversa es una polimerasa que comprende una mutación que confiere una actividad de transcriptasa inversa mejorada con respecto a la polimerasa de tipo natural respectiva.

25 Polimerasas que llevan mutaciones puntuales que las hacen particularmente útiles en el contexto de la invención se divulgan en el documento WO 2008/046612. En particular, polimerasas preferentes a utilizar en el contexto de la presente invención son ADN polimerasas mutadas que comprenden al menos el siguiente motivo en el dominio polimerasa:

30 T-G-R-L-S-S-X_{b7}-X_{b8}-P-N-L-Q-N; en el que X_{b7} es un aminoácido seleccionado entre S o T y en el que X_{b8} es un aminoácido seleccionado entre G, T, R, K o L, en el que la polimerasa comprende actividad exonucleasa 3'-5' y tiene una tasa de extensión de ácido nucleico mejorada y/o una eficiencia de transcripción inversa mejorada con respecto a la ADN polimerasa de tipo natural, en el que en dicha ADN polimerasa de tipo natural X_{b8} es un aminoácido seleccionado entre D, E o N.

35 Un ejemplo particularmente preferente son los mutantes de la ADN polimerasa termoestable de la especie Z05 de *Thermus* (descritos, por ejemplo, en el documento US 5.455.170), comprendiendo dichas variaciones mutaciones en el dominio polimerasa en comparación con la enzima Z05 de tipo natural respectiva. Para el procedimiento de acuerdo con la invención es especialmente preferente una ADN polimerasa Z05 mutante en la que el aminoácido en la posición 580 se selecciona del grupo que consiste en G, T, R, K y L.

40 Para la transcripción inversa usando una polimerasa termoestable, es preferente el Mn²⁺ como catión divalente y se incluye típicamente como una sal, por ejemplo, cloruro de manganeso (MnCl₂), acetato de manganeso (Mn(OAc)₂) o sulfato de manganeso (MnSO₄). Si se incluye MnCl₂ en una reacción que contiene tampón Tricina 50 mM, por ejemplo, el MnCl₂ está en general presente en una concentración de 0,5-7,0 mM; es preferente 0,8-1,4 mM cuando se utilizan dGTP, dATP, dUTP y dCTP 200 mM cada uno; y lo más preferente es MnCl₂ 2,5 - 3,5 mM. Además, el uso de Mg₂₊ como catión divalente para la transcripción inversa también es preferente en el contexto de la presente invención.

50 Dado que, dentro del alcance de la divulgación, está la transcripción inversa de ácidos nucleicos diana de ARN a ADNc mientras se conservan los ácidos nucleicos diana de ADN de forma que tanto ADNc como ADN se pueden usar para la posterior amplificación, el procedimiento controlado internamente descrito anteriormente es particularmente útil para la amplificación simultánea de ácidos nucleicos diana derivados de tanto de organismos que tienen un genoma de ARN como de organismos que tienen un genoma de ADN. Esta ventaja aumenta considerablemente el espectro de organismos diferentes, especialmente patógenos, que se pueden analizar en condiciones físicas idénticas.

Por lo tanto, un aspecto preferente de la invención es el procedimiento descrito anteriormente, en el que los al menos dos ácidos nucleicos diana comprenden ARN y ADN.

60 Un "organismo", tal como se utiliza en el presente documento, significa cualquier forma de vida mono o multicelular viva. En el contexto de la invención, un virus es un organismo.

Especialmente debido a una temperatura óptima apropiada, enzimas como la polimerasa Tth o, preferentemente, la ADN polimerasa Z05 mutante mencionada anteriormente son adecuadas para llevar a cabo la etapa subsiguiente de amplificación de los ácidos nucleicos diana. Aprovechar la misma enzima tanto para la transcripción inversa como para la amplificación contribuye hacer más fácil el procedimiento y facilita su automatización, puesto que la muestra

fluida no tiene que ser manipulada entre la etapa de RT y la etapa de amplificación.

Por lo tanto, en un modo de realización preferente, en el procedimiento descrito anteriormente, la misma polimerasa con actividad de transcriptasa inversa se utiliza para la transcripción inversa y para la amplificación en la etapa f. Preferentemente, la enzima es la ADN polimerasa Z05 mutante descrita *supra*.

Con el fin de no exponer la polimerasa u otros componentes de la mezcla de reacción utilizados en el contexto de la invención a temperaturas elevadas durante tiempos más largos de lo necesario, en un modo de realización preferente, las etapas que se realizan por encima de 90 °C son de hasta 20 segundos, preferentemente de hasta 15 segundos, más preferentemente de hasta 10 segundos, más preferentemente de hasta 5 segundos y lo más preferentemente de 5 segundos de duración. Esto también reduce el tiempo hasta el resultado y reduce el tiempo total requerido del ensayo.

En dicha configuración homogénea, puede ser considerablemente ventajoso sellar los recipientes de reacción antes de iniciar la RT y la amplificación, reduciendo así el riesgo de contaminación. El sellado se puede lograr, por ejemplo, aplicando una lámina que sea preferentemente transparente, una tapa o añadiendo aceite a los recipientes de reacción y formando una fase lipófila como capa de sellado en la parte superior del fluido.

Así, un aspecto preferente de la invención es el procedimiento descrito anteriormente, que comprende además, después de la etapa e., la etapa de sellado de los al menos dos recipientes de reacción.

Para facilitar la manipulación y la automatización, es preferente combinar los al menos dos recipientes de reacción en una disposición integral, de modo que se puedan manipular juntos.

Por consiguiente, un aspecto preferente de la invención es el procedimiento descrito anteriormente, en el que los al menos dos recipientes de reacción se combinan en la misma disposición integral.

Las disposiciones integrales pueden ser, por ejemplo, viales o tubos unidos de manera reversible o irreversible entre sí o dispuestos en una gradilla. Preferentemente, la disposición integral es una placa multipocillo.

El objetivo de la etapa de amplificación puede ser una molécula híbrida de ARN/ADN. El objetivo puede ser un ácido nucleico monocatenario o bicatenario. Aunque el procedimiento de PCR más ampliamente utilizado utiliza una diana bicatenaria, esto no es una necesidad. Después del primer ciclo de amplificación de una diana de ADN monocatenario, la mezcla de reacción contiene una molécula de ADN bicatenario constituida por la diana monocatenaria y una cadena complementaria recién sintetizada. De forma similar, tras el primer ciclo de amplificación de una diana de ARN/ADNc, la mezcla de reacción contiene una molécula de ADNc bicatenario. En este punto, los ciclos de amplificación sucesivos proceden como se ha descrito anteriormente.

Dado que la amplificación de ácidos nucleicos, especialmente pero no sólo en el caso de la PCR, es muy eficaz si se lleva a cabo como una reacción de ciclación, un aspecto preferente de la invención es el procedimiento descrito anteriormente, en el que la reacción de amplificación en la etapa f. consiste en múltiples etapas de ciclación.

Los procedimientos de detección de ácidos nucleicos adecuados son conocidos por el experto en la materia y se describen en libros de texto estándar como Sambrook J. et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989 y Ausubel F. et al.: *Current Protocols in Molecular Biology* 1987, J. Wiley and Sons, NY. Pueden existir también etapas de purificación adicionales antes de que se lleve a cabo la etapa de detección de ácido nucleico como, por ejemplo, una etapa de precipitación. Los procedimientos de detección pueden incluir, pero no se limitan a, la unión o intercalación de tintes específicos como bromuro de etidio, que se intercalan en el ADN bicatenario y luego cambian su fluorescencia. El ácido nucleico purificado también se puede separar por procedimientos electroforéticos opcionalmente después de una hidrólisis de restricción y visualizarse a continuación. También hay ensayos basados en sondas que aprovechan la hibridación de oligonucleótidos a secuencias específicas y posterior detección del híbrido.

Es preferente detectar los ácidos nucleicos diana amplificados durante o después de la reacción de amplificación para evaluar el resultado del análisis. Particularmente para la detección en tiempo real, es ventajoso utilizar sondas de ácido nucleico.

Por lo tanto, un aspecto preferente de la invención es el procedimiento descrito anteriormente, en el que una etapa de ciclación comprende una etapa de amplificación y una etapa de hibridación, comprendiendo dicha etapa de hibridación la hibridación de los ácidos nucleicos amplificados con sondas.

Puede ser favorable monitorizar la reacción de amplificación en tiempo real, es decir, detectar los ácidos nucleicos diana y/o sus amplificados durante la propia amplificación.

Por lo tanto, un aspecto preferente de la invención es el procedimiento descrito anteriormente, en el que las sondas están marcadas con un resto fluorescente donante y un resto fluorescente aceptor correspondiente.

Los procedimientos expuestos anteriormente se basan preferentemente en la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) entre un resto fluorescente donante y un resto fluorescente aceptor. Un resto fluorescente donante representativo es fluoresceína, y los restos fluorescentes aceptores representativos correspondientes incluyen LC-Red 640, LC-Red 705, Cy5 y Cy5.5. Típicamente, la detección incluye excitar la muestra a una longitud de onda absorbida por el resto fluorescente donante y visualizar y/o medir la longitud de onda emitida por el resto fluorescente aceptor correspondiente. En el procedimiento de acuerdo con la invención, la detección va seguida preferentemente por la cuantificación de la FRET. Preferentemente, la detección se realiza después de cada etapa de ciclación. Más preferentemente, la detección se realiza en tiempo real. Utilizando instrumentos de PCR en tiempo real disponible en el mercado (por ejemplo, LightCycler™ o TaqMan®), la amplificación por PCR y la detección del producto de amplificación se pueden combinar en una sola cubeta cerrada con un tiempo de ciclación considerablemente reducido. Puesto que la detección se produce simultáneamente con la amplificación, los procedimientos de PCR en tiempo real obvian la necesidad de manipulación del producto de amplificación y disminuyen el riesgo de contaminación cruzada entre los productos de amplificación. La PCR en tiempo real reduce en gran medida el tiempo de respuesta y es una alternativa atractiva frente a las técnicas de PCR convencionales en el laboratorio clínico.

Las siguientes solicitudes de patente describen la PCR en tiempo real utilizada en la tecnología LightCycler™: WO 97/46707, WO 97/46714 y WO 97/46712. El instrumento LightCycler™ es un ciclador térmico rápido combinado con un microfluorímetro que utiliza óptica de alta calidad. Esta técnica de termociclado rápido utiliza cubetas de vidrio finas como recipientes de reacción. El calentamiento y enfriamiento de la cámara de reacción se controlan alternando aire caliente y aire ambiente. La baja masa de aire y la alta relación entre la superficie y el volumen de las cubetas permiten alcanzar velocidades de intercambio de temperatura muy rápidas dentro de la cámara térmica.

La tecnología TaqMan® utiliza una sonda de hibridación monocatenaria marcada con dos restos fluorescentes. Cuando se excita un primer resto fluorescente con luz de una longitud de onda adecuada, la energía absorbida se transfiere a un segundo resto fluorescente de acuerdo con los principios de la FRET. El segundo resto fluorescente es, en general, una molécula desactivadora. Los tintes fluorescentes típicos usados en este formato son, por ejemplo, entre otros, FAM, HEX, CY5, JA270, Cyan y CY5.5. Durante la etapa de hibridación de la reacción de PCR, la sonda de hibridación marcada se une al ácido nucleico diana (es decir, el producto de amplificación) y se degrada por la actividad de exonucleasa 5' a 3' de la Taq ADN polimerasa u otra polimerasa adecuada como conoce el experto en la técnica, tal como la polimerasa Z05 mutante preferente, durante la fase de elongación posterior. Como resultado, el resto fluorescente excitado y el resto desactivador se separan espacialmente entre sí. Como consecuencia, tras la excitación del primer resto fluorescente en ausencia del desactivador, se puede detectar la emisión de fluorescencia del primer resto fluorescente.

En ambos formatos de detección, la intensidad de la señal emitida se puede correlacionar con el número de moléculas de ácido nucleico diana iniciales.

Como alternativa a FRET, un producto de amplificación se puede detectar usando un tinte de unión a ADN bicatenario tal como un tinte de unión a ADN fluorescente (por ejemplo, SYBRGREEN I® o SYBRGOLD® (Molecular Probes)). Tras la interacción con el ácido nucleico bicatenario, dichos tintes de unión a ADN fluorescentes emiten una señal fluorescente después de la excitación con luz a una longitud de onda adecuada. También se puede usar un tinte de unión a ADN bicatenario, tal como un tinte de intercalación de ácido nucleico. Cuando se usan tintes de unión a ADN bicatenario, habitualmente se realiza un análisis de curva de fusión para confirmar la presencia del producto de amplificación.

Las balizas moleculares conjuntamente con FRET también se pueden usar para detectar la presencia de un producto de amplificación usando los procedimientos de PCR en tiempo real de la invención. La tecnología de baliza molecular utiliza una sonda de hibridación marcada con un primer resto fluorescente y un segundo resto fluorescente. El segundo resto fluorescente es, en general, un desactivador, y los marcadores fluorescentes están situados típicamente en cada extremo de la sonda. La tecnología de baliza molecular utiliza un oligonucleótido de sonda que tiene secuencias que permiten la formación de estructura secundaria (por ejemplo, una horquilla). Como resultado de la formación de estructura secundaria dentro de la sonda, ambos restos fluorescentes están en proximidad espacial cuando la sonda está en solución. Después de la hibridación a los productos de amplificación, la estructura secundaria de la sonda se rompe y los restos fluorescentes se separan entre sí de tal manera que, después de la excitación con luz de una longitud de onda adecuada, se puede detectar la emisión del primer resto fluorescente.

Así, un procedimiento preferente de acuerdo con la invención es el procedimiento descrito anteriormente utilizando FRET, en el que dichas sondas comprenden una secuencia de ácido nucleico que permite la formación de estructura secundaria, en el que dicha formación de estructura secundaria da como resultado una proximidad espacial entre dichos primer y segundo resto fluorescente.

La FRET eficiente sólo puede tener lugar cuando los restos fluorescentes están en proximidad local directa y cuando el espectro de emisión del resto fluorescente donante se superpone con el espectro de absorción del resto

fluorescente aceptor.

Así, en un modo de realización preferente, dichos fragmentos fluorescentes donante y aceptor están situados a no más de 5 nucleótidos entre sí en dicha sonda.

5 En un modo de realización preferente adicional, dicho resto fluorescente aceptor es un desactivador.

10 Tal como se describe anteriormente, en el formato TaqMan, durante la etapa de hibridación de la reacción de PCR, la sonda de hibridación marcada se une al ácido nucleico diana (es decir, el producto de amplificación) y se degrada por la actividad de exonucleasa 5' a 3' de la Taq ADN polimerasa u otra polimerasa adecuada como se conoce por el experto en la técnica, tal como polimerasa de Z05, durante la fase de elongación posterior.

15 Así, en un modo de realización preferente, en el procedimiento descrito anteriormente, la amplificación emplea una enzima polimerasa que tiene actividad de exonucleasa 5' a 3'.

20 Es además ventajoso seleccionar cuidadosamente la longitud del amplicón que se obtiene como resultado del procedimiento descrito anteriormente. En general, los amplicones relativamente cortos aumentan la eficacia de la reacción de amplificación. Por lo tanto, un aspecto preferente de la invención es el procedimiento descrito anteriormente, en el que los fragmentos amplificados comprenden hasta 450 bases, preferentemente hasta 300 bases, más preferentemente hasta 200 bases, y más preferentemente hasta 150 bases.

25 El ácido nucleico de control interno utilizado en la presente invención sirve como "ácido nucleico patrón cuantitativo" que es apto para ser y utilizarse como referencia para cuantificar, es decir, para determinar la cantidad de los ácidos nucleicos diana. Para este propósito, uno o más ácidos nucleicos patrón cuantitativos experimentan todas las etapas posibles de preparación de la muestra junto con los ácidos nucleicos diana. Además, un ácido nucleico patrón cuantitativo se procesa durante todo el procedimiento dentro de la misma mezcla de reacción. Debe generar, directa o indirectamente, una señal detectable tanto en presencia como en ausencia del ácido nucleico diana. Con este fin, la concentración del ácido nucleico patrón cuantitativo se debe optimizar cuidadosamente en cada ensayo, no para que interfiera en la sensibilidad, sino para generar una señal detectable también, por ejemplo, a concentraciones diana muy altas. En términos del límite de detección (LDD, véase más adelante) del ensayo respectivo, el intervalo de concentración para el "ácido nucleico patrón cuantitativo" es preferentemente de 20-5000 x LDD, más preferentemente de 20-1000 x LDD, lo más preferentemente de 20-5000 x LDD. La concentración final del ácido nucleico patrón cuantitativo en la mezcla de reacción depende del intervalo de medición cuantitativa logrado.

35 "Límite de detección" o "LDD" significa la cantidad o concentración más baja detectable de un ácido nucleico en una muestra. Un bajo "LDD" corresponde a alta sensibilidad y viceversa. El "LDD" se expresa normalmente por medio de la unidad "cp/ml", particularmente si el ácido nucleico es un ácido nucleico vírico, o como UI/ml. "cp/ml" significa "copias por mililitro" en el que una "copia" es una copia del ácido nucleico respectivo. UI/ml corresponde a "unidades internacionales/ml", en referencia a la norma de la OMS.

40 Un procedimiento ampliamente utilizado para calcular un LDD es "análisis Probit", que es un procedimiento que analiza la relación entre un estímulo (dosis) y la respuesta cuántica (todo o nada). En un experimento típico de respuesta cuántica, a los grupos de animales se les administran diferentes dosis de un fármaco. Se registra el porcentaje de muerte a cada nivel de dosis. Estos datos se pueden analizar entonces usando el análisis Probit. El modelo Probit asume que el porcentaje de respuesta está relacionado con la dosis logarítmica como la distribución normal acumulada. Es decir, las dosis logarítmicas se pueden usar como variables para leer el porcentaje de muerte a partir de la normal acumulada. El uso de la distribución normal, en lugar de otras distribuciones de probabilidad, influye en la tasa de respuesta prevista en los extremos alto y bajo de las dosis posibles, pero tiene poca influencia en la zona intermedia.

50 El análisis de Probit se puede aplicar a distintas "tasas de éxito". Como se conoce en la técnica, una "tasa de éxito" se expresa comúnmente en porcentaje [%] e indica el porcentaje de resultados positivos a una concentración específica de un analito. Así, por ejemplo, un LDD se puede determinar a un 95 % de tasa de éxito, lo que significa que el LDD se calcula para un entorno en el que un 95 % de los resultados válidos son positivos.

55 En un modo de realización preferente, el procedimiento descrito anteriormente proporciona un LDD de 1 a 100 cp/ml o de 0,5 a 50 UI/ml, más preferentemente de 1 a 75 cp/ml o de 0,5 a 30 UI/ml, más preferentemente de 1 a 25 cp/ml o de 1 a 20 UI/ml.

60 Con respecto a algunos ejemplos de posibles ácidos nucleicos diana de ciertos virus, el procedimiento descrito anteriormente proporciona preferentemente los siguientes LDD:

- VIH: hasta 60 cp/ml, más preferentemente hasta 50 cp/ml, más preferentemente hasta 40 cp/ml, más preferentemente hasta 30 cp/ml, más preferentemente hasta 20 cp/ml, más preferentemente hasta 15 cp/ml
- VHB: hasta 10 UI/ml, más preferentemente hasta 7,5 UI/ml, más preferentemente hasta 5 UI/ml
- 65 • VHC: hasta 10 UI/ml, más preferentemente hasta 7,5 UI/ml, más preferentemente hasta 5 UI/ml
- VNO I: hasta 20 cp/ml, más preferentemente hasta 15 cp/ml, más preferentemente hasta 10 cp/ml

- VNO II: hasta 20 cp/ml, más preferentemente hasta 15 cp/ml, más preferentemente hasta 10 cp/ml, más preferentemente hasta 5 cp/ml
- VEJ: hasta 100 cp/ml, más preferentemente hasta 75 cp/ml, más preferentemente hasta 50 cp/ml, más preferentemente hasta 30 cp/ml
- 5 • VESL: hasta 100 cp/ml, más preferentemente hasta 75 cp/ml, más preferentemente hasta 50 cp/ml, más preferentemente hasta 25 cp/ml, más preferentemente hasta 10 cp/ml.

Un ejemplo de cómo realizar el cálculo de resultados cuantitativos en el formato TaqMan basado en un ácido nucleico de control interno que sirve como ácido nucleico patrón cuantitativo se describe continuación: se calcula un título a partir de los datos de entrada de los valores de fluorescencia corregidos para el instrumento de una tanda de PCR completa. Un conjunto de muestras que contienen un ácido nucleico diana y un ácido nucleico de control interno que actúa como un ácido nucleico patrón cuantitativo se someten a PCR en un termociclador usando un perfil de temperatura especificado. A temperaturas y tiempos seleccionados durante el perfil de PCR, las muestras se iluminan por luz filtrada y los datos de fluorescencia filtrados se recogen para cada muestra para el ácido nucleico diana y para el ácido nucleico de control interno. Una vez completada la PCR, las lecturas de fluorescencia se procesan para producir un conjunto de datos de concentración de tinte para el ácido nucleico de control interno y un conjunto de datos de concentración de tinte para el ácido nucleico diana. Cada conjunto de datos de concentración de tinte se procesa de la misma manera. Después de varias verificaciones de plausibilidad, se calculan los valores de inflexión (CT) para el ácido nucleico de control interno y para el ácido nucleico diana. El valor de inflexión se define como el punto en el que la fluorescencia del ácido nucleico diana o del ácido nucleico de control interno cruza un umbral predefinido (concentración de fluorescencia). La determinación de los títulos se basa en los supuestos de que el ácido nucleico diana y el ácido nucleico de control interno se amplifican con la misma eficacia y de que, al valor de inflexión calculado, se amplifican y detectan cantidades iguales de copias de amplificación de ácido nucleico diana y ácido nucleico de control interno. Por lo tanto, el $(CT_{QS} - CT_{diana})$ es lineal a log (cono de diana/cono QS). En este contexto, QS denota el ácido nucleico de control interno que sirve como ácido nucleico patrón cuantitativo. El título T se puede entonces calcular, por ejemplo, utilizando una fórmula de calibración polinómica como en la siguiente ecuación:

$$T = 10 (a(CT_{QS} - CT_{diana})^2 + b(CT_{QS} - CT_{diana}) + c)$$

Las constantes polinómicas y la concentración del ácido nucleico patrón cuantitativo son conocidas, por lo que la única variable en la ecuación es la diferencia $(CT_{QS} - CT_{diana})$.

Además, en general, un ácido nucleico de control interno puede servir como "ácido nucleico de control interno cualitativo". Un "ácido nucleico de control interno cualitativo" es particularmente útil para confirmar la validez del resultado de ensayo de un ensayo de detección cualitativa: incluso en el caso de un resultado negativo, se debe detectar el control interno cualitativo; de lo contrario, se considera que el ensayo no es operativo. Sin embargo, en una configuración cualitativa, no tiene necesariamente que ser detectado en caso de un resultado positivo. Como consecuencia, su concentración debe ser relativamente baja. Tiene que ser cuidadosamente adaptada al respectivo ensayo y a su sensibilidad. Preferentemente, el intervalo de concentración para el ácido nucleico interno cualitativo, es decir, el segundo ácido nucleico de control, comprenderá un intervalo de 1 copia por reacción a 1000 copias por reacción. En relación con el límite de detección (LDD) del ensayo respectivo, su concentración está preferentemente entre el LDD de un ensayo y un valor igual a 25 veces el LDD, más preferentemente entre el LDD y 10 x LDD. Más preferentemente, está entre 2 x LDD y 10 x LDD. Incluso más preferentemente, está entre 5 x LDD y 10 x LDD. Lo más preferentemente, es 5 x LDD o 10 x LDD.

El ácido nucleico de control interno, tal como se utiliza en la presente invención, no está restringido a una secuencia particular. Puede ser ventajoso añadir diferentes ácidos nucleicos de control interno a muestras fluidas, pero usar sólo una de ellas para la amplificación, por ejemplo, añadiendo sólo cebadores para uno de dichos ácidos nucleicos de control interno. En dichos modos de realización, el experto en la técnica puede elegir el ácido nucleico de control interno que se va a amplificar en un experimento determinado, aumentando así la flexibilidad del análisis que se va a realizar. En modos de realización particularmente ventajosos, dichos diferentes ácidos nucleicos de control interno pueden estar comprendidos por un solo constructo de ácido nucleico, por ejemplo, un plásmido o una molécula de ácido nucleico adecuada diferente.

Por lo tanto, un aspecto preferente de la invención es el procedimiento descrito anteriormente, en el que se añade más de un ácido nucleico de control interno en la etapa a, pero sólo uno de dichos ácidos nucleicos de control interno se amplifica en la etapa f.

Los resultados descritos anteriormente pueden estar adulterados y, por ejemplo, comprender falsos positivos, en el caso de contaminación cruzada con ácidos nucleicos de fuentes distintas de la muestra fluida. En particular, los amplificadores de experimentos anteriores pueden contribuir a dichos efectos no deseados. Un procedimiento particular para minimizar los efectos de la contaminación cruzada de la amplificación de ácido nucleico se describe en la Patente de EE. UU. n.º 5.035.996. El procedimiento implica la introducción de bases de nucleótidos no convencionales, tales como dUTP, en el producto amplificado y la exposición de los productos de transporte a un tratamiento enzimático y/o físico-químico para conseguir que el ADN del producto sea incapaz de servir como molde

para las amplificaciones posteriores. Las enzimas para dichos tratamientos son conocidas en la técnica. Por ejemplo, la uracil-ADN glicosilasa, también conocida como uracil-N-glicosilasa o UNG, eliminará los residuos de uracilo de los productos de PCR que contienen esa base. El tratamiento enzimático da como resultado la degradación del producto de PCR de arrastre contaminante y sirve para "esterilizar" la reacción de amplificación.

5 De este modo, un aspecto preferente de la invención es el procedimiento descrito anteriormente, que comprende además, entre la etapa d) y la etapa e), las etapas de

- tratar la muestra fluida con una enzima en condiciones en las que los productos procedentes de amplificaciones de ácidos nucleicos contaminantes cruzados de otras muestras se degradan enzimáticamente;

10 • inactivar dicha enzima.

Preferentemente, la enzima es uracil-N-glicosilasa.

15 En el procedimiento de acuerdo con la invención, es preferente que todas las etapas estén automatizadas. "Automatizado" significa que las etapas de un procedimiento son adecuadas para ser llevadas a cabo con un aparato o máquina capaz de operar con poco o ningún control externo o influencia de un ser humano. Sólo las etapas de preparación para el procedimiento pueden tener que realizarse a mano, por ejemplo, hay que llenar los recipientes de almacenamiento y ponerlos en su lugar, la elección de muestras ha de ser realizada por un ser humano y otras etapas conocidas por el experto en el campo, por ejemplo, el funcionamiento de un ordenador de control. El aparato o máquina puede, por ejemplo, añadir automáticamente líquidos, mezclar las muestras o llevar a cabo etapas de incubación a temperaturas específicas. Típicamente, dicha máquina o aparato es un robot controlado por un ordenador que ejecuta un programa en el que se especifican las etapas y comandos individuales.

25 Un aspecto adicional de la presente divulgación es un sistema analítico (440) para aislar y simultáneamente amplificar al menos dos ácidos nucleicos diana que pueden estar presentes en una muestra fluida, comprendiendo dicho sistema analítico los siguientes módulos:

- una estación de separación (230) que comprende un material de soporte sólido, con dicha estación de separación construida y dispuesta para separar y purificar un ácido nucleico diana comprendido en una muestra fluida

30 • una estación de amplificación (405) que comprende al menos dos recipientes de reacción, comprendiendo dichos recipientes de reacción reactivos de amplificación, al menos un primer ácido nucleico diana purificado en al menos un primer recipiente de reacción y al menos un segundo ácido nucleico diana purificado en al menos un segundo recipiente, en el que el segundo ácido nucleico diana está ausente del primer recipiente de reacción, un ácido nucleico de control interno y una polimerasa con actividad de transcriptasa inversa, comprendiendo además dicha polimerasa una mutación que confiere una tasa de extensión de ácido nucleico mejorada y/o una actividad de transcriptasa inversa mejorada con respecto a la polimerasa de tipo natural respectiva.

35 Un "sistema analítico" es una disposición de componentes tales como instrumentos que interactúan entre sí con el fin último de analizar una muestra dada.

40 Las ventajas de dicho sistema analítico son las mismas que las descritas *supra* con respecto al procedimiento de acuerdo con la invención.

45 El sistema analítico (440, Fig. 11) de la presente invención es un sistema (440) que comprende un módulo (401) para aislar y/o purificar un analito. Además, el sistema (440) comprende adicionalmente un módulo (403) para analizar dicho analito para obtener una señal detectable. La señal detectable se puede detectar en el mismo módulo (401, 402, 403) o, de forma alternativa, en un módulo separado. El término "módulo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier posición definida espacialmente dentro del analizador (400). Dos módulos (401, 403) pueden estar separados por paredes, o pueden estar en relación abierta. Cualquier módulo individual (401, 402, 403) se puede controlar de forma autónoma, o el control del módulo (401, 402, 403) se puede compartir con otros módulos. Preferentemente, todos los módulos se controlan centralmente. La transferencia entre los módulos (401, 402, 403) puede ser manual, pero preferentemente automatizada. Así, la presente invención abarca varios modos de realización diferentes de analizadores automatizados (400).

55 La "estación de separación" se describe *supra*.

60 Una "estación de amplificación" comprende una incubadora con temperatura controlada para incubar el contenido de al menos dos recipientes de reacción. Comprende además una variedad de recipientes de reacción como tubos o placas, en los que tiene lugar una reacción para el análisis de la muestra, tal como PCR. Los límites o paredes exteriores de dichos recipientes son químicamente inertes de modo que no interfieren en la reacción de amplificación que tiene lugar dentro de ellos. Para facilitar la manipulación y la automatización, es preferente combinar los al menos dos recipientes de reacción en una disposición integral, de modo que se puedan manipular juntos.

65 Por consiguiente, un aspecto preferente de la divulgación es el sistema analítico descrito anteriormente, en el que los al menos dos recipientes de reacción se combinan en una disposición integral.

Las disposiciones integrales pueden ser, por ejemplo, viales o tubos unidos de manera reversible o irreversible entre sí o dispuestos en una gradilla. Preferentemente, la disposición integral es una placa multipocillo.

5 Preferentemente, dicha placa multipocillo se retiene en una estación de retención. En un modo de realización más preferente, un manipulador transporta un recipiente multipocillo desde una estación de retención a una esclusa de presión (460), y un segundo manipulador transporta dicha placa multipocillo de dicha esclusa de presión a dicha estación de amplificación, donde ambos manipuladores interactúan con dicha placa multipocillo mediante una interacción de bloqueo de forma.

10 En un modo de realización preferente, el sistema analítico está totalmente automatizado.

En un modo de realización, al menos dos recipientes de reacción combinados en una disposición integral son transportados entre las estaciones del sistema.

15 En un segundo modo de realización, el ácido nucleico diana purificado se transfiere desde dicha estación de separación a dicha estación de amplificación. Preferentemente, un pipeteador que comprende pipetas con puntas de pipeta acopladas transfiere el líquido que comprende el ácido nucleico purificado.

20 En un tercer modo de realización, el ácido nucleico purificado se transfiere desde dicha estación de separación a un recipiente de reacción en una disposición integral retenida en una estación de retención. Preferentemente, dicho recipiente de reacción en una disposición integral se transfiere entonces de dicha estación de retención a dicha estación de amplificación.

25 El sistema analítico de acuerdo con la invención comprende además preferentemente una unidad de pipeteado. Dicha unidad de pipeteado comprende al menos una pipeta, preferentemente múltiples pipetas. En un modo de realización preferente, dichas múltiples pipetas se combinan en una o más disposiciones integrales, dentro de las cuales las pipetas se pueden manipular preferentemente de manera individual. Las pipetas usadas en el contexto de la invención son preferentemente pipetas que comprenden puntas de pipeta como se ha descrito *supra*. En otro modo de realización preferente, las pipetas son agujas de pipeteado.

30 De forma alternativa, un recipiente de reacción o disposición de recipientes de reacción utilizados para la preparación de muestras en la estación de separación y que contienen el fluido que comprende los ácidos nucleicos diana purificados se puede transferir desde la estación de separación hasta la estación de amplificación.

35 Para este propósito, el sistema analítico de acuerdo con la invención comprende además preferentemente una unidad de transferencia, comprendiendo preferentemente dicha unidad de transferencia un dispositivo robótico, comprendiendo preferentemente dicho dispositivo un manipulador.

Por las razones expuestas anteriormente en el contexto del procedimiento de acuerdo con la invención, los siguientes son aspectos preferentes adicionales de la invención:

40 • El sistema analítico (440) descrito anteriormente en el que al menos un recipiente de reacción comprende un ácido nucleico diana de ARN y un ácido nucleico diana de ADN.

45 • El sistema analítico (440) descrito anteriormente, en el que al menos un recipiente de reacción comprende un ácido nucleico diana de ARN, y al menos otro recipiente de reacción comprende un ácido nucleico diana de ADN.

Preferentemente, el sistema analítico (440) descrito anteriormente comprende además uno o más elementos seleccionados del grupo que consiste en:

- 50 • un módulo de detección (403) para detectar señales evocadas por un analito
 • un sellador (410)
 • un módulo de almacenamiento (1008) para reactivos y/o desechables.
 • una unidad de control (1006) para controlar los componentes del sistema.

55 Un "módulo de detección" (403) puede ser, por ejemplo, una unidad de detección óptica para detectar el resultado o el efecto del procedimiento de amplificación. Una unidad de detección óptica puede comprender una fuente de luz, por ejemplo, una lámpara de xenón, óptica tal como espejos, lentes, filtros ópticos, fibra óptica para guiar y filtrar la luz, uno o más canales de referencia o una cámara CCD o una cámara diferente.

60 Un "sellador" (410) está construido y dispuesto para sellar cualesquiera recipientes usados en conexión con el sistema analítico de acuerdo con la invención. Dicho sellador puede, por ejemplo, sellar tubos con tapones apropiados, o placas multipocillo con láminas u otros materiales de sellado adecuados.

65 Un "módulo de almacenamiento" (1008) almacena los reactivos necesarios para provocar una reacción química o biológica importante para el análisis de la muestra fluida. También puede comprender componentes adicionales útiles para el procedimiento de la invención, por ejemplo, desechables tales como puntas de pipeta o recipientes que se utilizarán como recipientes de reacción dentro de la estación de separación y/o la estación de amplificación.

Preferentemente, el sistema analítico de acuerdo con la divulgación comprende además una unidad de control para controlar los componentes del sistema.

5 Dicha "unidad de control" (1006) puede comprender un software para garantizar que los diferentes componentes de dicho sistema analítico funcionan e interactúan correctamente y con la sincronización correcta, por ejemplo, moviendo y manipulando componentes tales como pipetas de una manera coordinada. La unidad de control también puede comprender un procesador que ejecuta un sistema operativo en tiempo real (SOTR), que es un sistema operativo multitarea diseñado para aplicaciones en tiempo real. En otras palabras, el procesador del sistema es capaz de gestionar las limitaciones en tiempo real, es decir, los plazos operativos desde el evento hasta la respuesta del sistema independientemente de la carga del sistema. Controla en tiempo real el correcto funcionamiento y respuesta de las diferentes unidades del sistema de acuerdo con las instrucciones dadas.

15 En un modo de realización preferente, la presente divulgación se refiere a un sistema analítico (440) para procesar un analito, que comprende

a. Una primera posición que comprende los primeros receptáculos (1001) en disposición lineal que comprende muestras de líquido (1010), una placa de procesamiento (101) que comprende receptáculos (103) en una disposición $n \times m$ para contener una muestra de líquido (1011), un primer dispositivo de pipeteado (700) que comprende al menos dos unidades de pipeteado (702) en disposición lineal, en el que dichas unidades de pipeteado (702) están acopladas a puntas de pipeta (3, 4) y una gradilla de puntas (70) que comprende puntas de pipeta (3, 4) en una disposición $a \times (n \times m)$;

20 b. Una segunda posición que comprende un soporte (201, 128) para dicha placa de procesamiento (101), un soporte (330) para una placa multipocillo, un soporte (470) para dicha gradilla de puntas (70) y un segundo dispositivo de pipeteado (35), comprendiendo dicho segundo dispositivo de pipeteado (35) unidades de pipeteado (702) en una disposición $n \times m$ para acoplamiento a las puntas de pipeta (3, 4) (Fig. 12). El término "soporte", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier disposición capaz de recibir una gradilla o una placa de procesamiento.

30 Las ventajas del sistema analítico (440) de la presente invención son las descritas anteriormente para el procedimiento de la presente invención.

Preferentemente, la posición de dichas unidades de pipeteado (702) del primer dispositivo de pipeteado (700) es variable. A continuación en el presente documento se describen modos de realización preferentes de dicho primer dispositivo de pipeteado (700).

35 En un modo de realización, la gradilla de puntas (70) comprende puntas de pipeta (3, 4) en una disposición $a \times (n \times m)$. Preferentemente, la gradilla de puntas (70) comprende un primer tipo (4) y un segundo tipo (3) de puntas de pipeta. En este modo de realización, el primer tipo de puntas de pipeta (4) está dispuesto en una disposición $n \times m$ y el segundo tipo de puntas de pipeta (3) está dispuesto en la disposición $n \times m$. En este contexto, "n" denota el número de filas y "m" el número de columnas, en el que n es preferentemente 6 y m es preferentemente 8. Más preferentemente, el primer tipo de puntas de pipeta (4) tiene un volumen diferente que el segundo tipo de puntas de pipeta (3); lo más preferentemente, el volumen del primer tipo de puntas de pipeta (4) es de más de 500 μl y el del segundo tipo de puntas de pipeta (3) es de menos de 500 μl . En este modo de realización, $a = 2$. Sin embargo, en la presente invención también se incluyen modos de realización de la invención con más de dos tipos de puntas de pipeta y, por lo tanto, con $a > 2$.

50 En un aspecto, el sistema analítico (440) de la presente invención comprende una unidad de control (1006) para asignar tipos de muestras y ensayos individuales a posiciones individuales de dicha placa de procesamiento (101). Preferentemente, dichas posiciones son celdas separadas (401, 402).

55 En un aspecto de la divulgación, el sistema comprende adicionalmente un sistema de transferencia (480) para transferir dicha placa de procesamiento (101) y dicha gradilla de puntas (70) entre las posiciones primera (402) y segunda (401). Los modos de realización preferentes de dicho sistema de transferencia (480) son cintas transportadoras o, más preferentemente, uno o más manipuladores.

Además, preferentemente dichas unidades de pipeta de dicho segundo dispositivo de pipeteado (35) están acopladas a puntas de pipeta (3, 4) que se usaron en la primera posición (402).

60 Un modo de realización preferente del sistema (440) de la presente divulgación comprende adicionalmente una tercera estación (403) que comprende una incubadora con temperatura controlada para incubar dicho analito con los reactivos necesarios para obtener una señal detectable. Otros modos de realización preferentes de este sistema se describen a continuación en el presente documento.

65 Se consigue un control más óptimo de la asignación de muestras y ensayos a la disposición $n \times m$ con un primer procesador (1004) que está comprendido en dicha primera posición (402) a la que dicha unidad de control (1006) transfiere instrucciones para asignar tipos de muestras y ensayos individuales a posiciones específicas de la

disposición n x m de recipientes (103) de la placa de procesamiento (101), y un segundo procesador (1005) que está comprendido en dicha segunda posición (401) a la que dicha unidad de control (1006) transfiere instrucciones para asignar tipos de muestras y ensayos individuales a posiciones específicas de la disposición n x m de recipientes (103) de la placa de procesamiento.

5 Preferentemente, dicho sistema comprende adicionalmente un primer procesador situado en dicha primera posición, y un segundo procesador situado en dicha segunda posición.

10 Más preferentemente, dicho primer procesador (1004) controla dicho primer dispositivo de pipeteado (700) y dicho segundo procesador (1005) controla dicho segundo dispositivo de pipeteado (35).

Todos los demás modos de realización preferentes y descripciones específicas de modos de realización del sistema analítico de acuerdo con la divulgación son los mencionados para el procedimiento de acuerdo con la invención.

15 Breve descripción de las figuras

Figura 1:

20 Representación esquemática del flujo de trabajo de preparación de muestras como se describe en el presente documento.

25 Las flechas apuntando hacia abajo indican la adición de un componente o reactivo a cada pocillo respectivo de la placa de pocillos profundos mencionada anteriormente, mientras que las flechas apuntando hacia arriba indican su respectiva eliminación. Estas acciones se realizaron manualmente en las etapas 2, 3, 4, 21 y 22, mediante el cabezal de procesamiento del aparato en las etapas 10, 14, 16, 18 y 24 y mediante el cabezal de reactivos del aparato en las etapas 5, 6, 7, 11, 15 y 19.

30 Se debe entender que los volúmenes utilizados se pueden ajustar de manera flexible, preferentemente al menos hasta aproximadamente un 30 % de los valores descritos. En particular, en el caso de la etapa 2, el volumen de muestra es preferentemente variable para tener en cuenta los diferentes tipos de muestras fluidas que pueden requerir más o menos material de partida para obtener resultados adecuados, como es conocido por el experto en la técnica. Preferentemente, el intervalo es de aproximadamente 100 μ l a aproximadamente 850 μ l. Más preferentemente, es de aproximadamente 100 μ l, aproximadamente 500 μ l o aproximadamente 850 μ l. Preferentemente, el volumen en los recipientes respectivos se ajusta a un volumen total idéntico con el diluyente en la etapa 3. Preferentemente, como en el esquema mostrado en la Fig. 1, se añade volumen hasta un volumen total de aproximadamente 850 μ l.

Figura 2:

40 Curvas de crecimiento de las amplificaciones de los ácidos nucleicos diana derivados de VIH, VHB y CT llevadas a cabo en un LightCycler480 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DE) como se describe en el Ejemplo 1. La "señal" indicada en el eje y es una señal fluorescente normalizada. El eje x muestra el número del ciclo de PCR respectivo.

45 Las curvas de crecimiento de VIH y VHB se muestran junto con las curvas de crecimiento del correspondiente ácido nucleico de control interno. Las respectivas curvas de ácido nucleico diana están representadas por líneas rectas, las curvas de ácido nucleico de control por líneas de puntos.

Fig. 2a: Ensayo cualitativo de VIH, medido en el canal para la detección de la sonda diana.

50 Fig. 2b: Ensayo cualitativo de VIH, medido en el canal para la detección de la sonda de control.

Fig. 2c: Ensayo cuantitativo de VIH, medido en el canal para la detección de la sonda diana.

55 Fig. 2d: Ensayo cuantitativo de VIH, medido en el canal para la detección de la sonda de control.

Fig. 2e: Ensayo cuantitativo de VHB, medido en el canal para la detección de la sonda diana.

Fig. 2f: Ensayo cuantitativo de VHB, medido en el canal para la detección de la sonda de control.

60 Fig. 2g: Ensayo de CT, medido en el canal para la detección de la sonda diana.

Figura 3:

Vista en perspectiva de la placa de procesamiento.

65

Figura 4:

Vista en perspectiva de la placa de procesamiento desde el ángulo opuesto.

Figura 5:

5 Vista superior de la placa de procesamiento.

Figura 6:

10 Vista de corte transversal a lo largo del lado más largo de la placa de procesamiento.

Figura 7:

15 Una vista parcial de la vista de corte transversal.

Figura 8:

Vista en perspectiva del lado más largo de la placa de procesamiento.

20 **Figura 9:**

a) a d) muestran diferentes vistas del segundo modo de realización de la estación de separación magnética.

Figura 10:

25 a) a c) muestran una vista del primer modo de realización de la estación de separación magnética que sostiene la placa de procesamiento, con el primer tipo de imanes en la posición Z más alta y el segundo tipo de imanes en la posición Z más baja.

30 **Figura 11:**

Dibujos esquemáticos de un analizador que comprende diferentes estaciones, módulos o celdas.

Figura 12:

35 Esquema de un sistema analítico descrito en el presente documento.

Figura 13:

40 Linealidad del ensayo cuantitativo de VHB en plasma con EDTA de acuerdo con los datos del Ejemplo 2.

Figura 14:

45 Linealidad del ensayo cuantitativo de VHB en suero de acuerdo con los datos del Ejemplo 2.

Figura 15:

Linealidad del ensayo cuantitativo de VHC en plasma con EDTA de acuerdo con los datos del Ejemplo 2.

50 **Figura 16:**

Linealidad del ensayo cuantitativo de VHC en suero de acuerdo con los datos del Ejemplo 2.

Figura 17:

55 Linealidad del ensayo cuantitativo de VIH en plasma con EDTA según los datos del Ejemplo 2.

Ejemplos

60 Los siguientes ejemplos describen un modo de realización en la que puede trabajar la invención.

Ejemplo 1:

65 Este ejemplo describe un procedimiento para aislar y simultáneamente amplificar al menos un primer y un segundo ácido nucleico diana usando un único ácido nucleico de control interno genérico.

En resumen, en el modo de realización representado, la PCR en tiempo real se lleva a cabo simultáneamente y en condiciones idénticas en un panel de varias dianas diferentes que comprenden bacterias (*Chlamydia trachomatis*, CT) así como un virus de ADN (VHB) y un virus de ARN (VIH). Todas las muestras se procesaron y analizaron en el mismo experimento, es decir, en la misma placa de pocillos profundos (para preparación de muestras) o placa multipocillo (para amplificación y detección), respectivamente.

5

Las siguientes muestras se prepararon y se analizaron posteriormente:

Reactivo	Fabricante:
Patrón secundario de VIH-1M , 50 000 cp/ml	Roche
Patrón secundario de VHB, 400 UI/ml	Roche
CT (DNA POS CTL pCHL-1)	Roche

10 Los patrones adecuados u otros tipos de dianas están disponibles para el experto en la técnica.

Los instrumentos enumerados en la tabla siguiente se utilizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante respectivo:

Instrumento	Fabricante
Hamilton Star	Hamilton Medical AG (Bonaduz, CH)
Light Cyler 480	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, DE)
Chameleon Sealer	K biosystems (Essex, Reino Unido)
Compresor	K biosystems (Essex, Reino Unido)

15

Para la preparación de la muestra se utilizaron los siguientes reactivos como diluyentes:

Reactivo	Fabricante
PreservCyt	ThinPrep
Plasma con EDTA K3, PCR neg.	Roche

20

Las siguientes diluciones se prepararon de antemano y se almacenaron durante la noche (diluciones en plasma de -60 °C a -90 °C, diluciones en PreservCyt a 2-8 °C):

Diana	Concentración		Matriz
VHB	50	UI/ml	Plasma con EDTA K3
VIH-1M	100	cp/ml	Plasma con EDTA K3
CT	2,5	fg/ml	PreservCyt

25

Cada muestra respectiva (500 µl) y cada diluyente de muestra respectivo (350 µl) se pipetearon manualmente en una placa de pocillos profundos, en la que cada muestra se añadió a tres pocillos diferentes para un análisis por triplicado. A cada pocillo que contenía una muestra de VIH o VHB se añadieron manualmente 50 µl de un ácido nucleico de control interno. Para el ensayo cualitativo de VIH, se añadió un ARN que servía como control cualitativo (100 partículas encapsuladas/muestra). Para el ensayo cuantitativo de VIH, se añadió un ARN que servía como patrón cuantitativo (500 partículas encapsuladas/muestra). Para el ensayo cuantitativo de VHB, se añadió un ADN que servía de patrón cuantitativo (1E4 copias/muestra). La secuencia de dichos ácidos nucleicos de control era idéntica en todos los casos y se seleccionó del grupo de las SEQ ID NO. 45-48.

30

El ácido nucleico de control respectivo se almacenó en el siguiente tampón:

IC/IQS - Tampón de almacenamiento	Conc. o pH
Tris (mM)	10
EDTA (mM)	0,1

Azida de sodio (p/v, %)	0,05
ARN poli rA (mg/l)	20
<i>pH</i>	8

La preparación de la muestra se realizó en un Hamilton Star (Hamilton, Bonaduz, CH) siguiendo el flujo de trabajo de acuerdo con el esquema representado de la Fig. 1 y utilizando los reactivos siguientes:

Reactivo de proteasas	Conc. o pH
Tris (mM)	10
EDTA (mM)	1
Cloruro de calcio (mM)	5
Acetato de calcio (mM)	5
Esperasa (mg/ml)	80
Glicerina (p/v, %)	50
<i>pH</i>	5,5

5

Reactivo MGP	Conc. o pH
MPG polvo (mg/ml)	60
Tris (mM)	30
Metilparabeno (p/v, %)	0,1
Azida de sodio (p/v, %)	0,095
<i>pH</i>	8,5

Reactivo de lisis	Conc. o pH
Tiocianato de guanidina (M)	4
Citrato de sodio (mM)	50
Polidocanol (p/v, %)	5
Ditiotreitol (p/v, %)	2
<i>pH</i>	5,8

Tampón de lavado	Conc. o pH
Citrato de sodio (mM)	7,5
Metilparabeno (p/v, %)	0,1
<i>pH</i>	4,1

Tampón de elución	Conc. o pH
Tris (mM)	30
Metilparabeno (p/v, %)	0,2
<i>pH</i>	8,5

10 Después de la etapa final, el cabezal de procesamiento del aparato Hamilton Star añadió las respectivas mezclas maestras (Mmx) que contenían reactivos de amplificación a cada pocillo, mezcló los fluidos que contenían los ácidos nucleicos aislados con la Mmx y transfirió cada mezcla resultante a un pocillo correspondiente de una placa de micropocillos en la que se llevó a cabo la amplificación.

15 Se usaron las siguientes mezclas maestras (cada una de las cuales consistía en los dos reactivos R1 y R2):

Para VIH:

ES 2 640 522 T3

Reactivo R1	Conc./50 μ l - PCR [μ M]
Agua (calidad PCR)	
Mn(Ac) ₂ * 4H ₂ O (pH 6,1 ajustado con ácido acético)	3000
NaN ₃ /Ri, tamponado con Tris 10 mM a pH 7 [%]	0,018

Reactivo R2	Conc./50 μ l - PCR [μ M]
DMSO [%]	5,000 %
NaN ₃ /Ri, tamponado con Tris 10 mM a pH 7 [%]	0,027 %
Acetato de potasio pH 7,0	110 000
Glicerol [%]	3,000 %
Tricina pH 8.0	50 000
Igepal [%]	0,024 %
dGTP	337,5
dATP	337,5
dCTP	337,5
dUTP	675
Cebadores/sondas seleccionadas de SEQ ID NO. 1-35	0,1-0,15
SEQ ID NO. 42	0,1
SEQ ID NO. 43	0,1
SEQ ID NO. 44	0,1
Uracil-N-glicosilasa	10 (U/reacción)
Polimerasa Z05-D	40 (U/reacción)
Aptámero NTQ21-46A	0,222
Agua	

Para VHB:

Reactivo R2	Conc. en 50 μ l - PCR	
H ₂ O	100	%
Tricina 7,7	40	mM
Tween 20	0,03	% (v/v)
Glicerol	5	% (v/v)
KOH	25,2	mM
KOAc	121,8	mM
NTQ21-46A (Aptámero)	0,2625	μ M
dGTP	0,42	μ M
dATP	0,42	μ M
dCTP	0,42	μ M

ES 2 640 522 T3

dUTP	0,84	μM
SEQ ID NO. 36	1,2	μM
SEQ ID NO. 37	0,1	μM
SEQ ID NO. 38	1,2	μM
SEQ ID NO. 42	0,6	μM
SEQ ID NO. 43	0,6	μM
SEQ ID NO. 44	0,15	μM
Polimerasa Z05D	35	(U/reacción)
Uracil-N-glicosilasa	2	(U/reacción)
Azida de sodio	0,027	% (m/v)
Reactivo R1	Conc./50 μl - PCR	
H ₂ O	100	%
MgOAc	2,5	mM
MnOAc pH 6,1	2,5	mM
Azida de sodio	0,018	% (m/v)

Para CT:

Reactivo R1	Conc. en 50 μl - PCR
Agua (calidad PCR)	
Mn(Ac) ₂ (pH 6,5 en ácido acético glacial 0,002 % (v/v))	2,7 mM
NaN ₃	0,0135 % (p/v)
Reactivo R2	Conc./50 μl - PCR
NaN ₃ /Ri, tamponado con Tris 10 mM a pH 7 [%]	0,0315%
Acetato de potasio	112,4 mM
Glicerol [%]	3,5%
Tricina	61 mM
Hidróxido de potasio	28,4 mM
dGTP	525 μM
dATP	525 μM
dCTP	525 μM
dUTP	1,05 mM
SEQ ID NO. 39	750 nM
SEQ ID NO. 40	600 nM

ES 2 640 522 T3

SEQ ID NO. 41	116 nM
Aptámero NTQ-46A	175 nM
Uracil-N-glicosilasa	5 U/reacción
Polimerasa Z05-D	31 U/reacción

Para la amplificación y detección, la placa de micropocillos se selló con un sellador de placa automatizado (véase más arriba), y la placa se transfirió a un LightCycler 480 (véase más arriba).

- 5 Se utilizó el siguiente perfil de PCR:

Perfil de termociclado

Nombre del programa	Objetivo (°C)	Modo de adquisición	Mantenimiento (hh:mm:ss)	Rampa de temperatura (°C/s)	Ciclos	Modo de análisis
Pre-PCR	50	Ninguno	00:02:00	4,4	1	Ninguno
	94	Ninguno	0:00:05	4,4		
	55	Ninguno	00:02:00	2,2		
	60	Ninguno	0:06:00	4,4		
	65	Ninguno	0:04:00	4,4		
1ª medición	95	Ninguno	0:00:05	4,4	5	Cuantificación
	55	Único	0:00:30	2,2		
2ª medición	91	Ninguno	0:00:05	4,4	45	Cuantificación
	58	Único	0:00:25	2,2		
Enfriamiento	40	Ninguno	00:02:00	2,2	1	Ninguno

- 10 Formato de detección (manual)

Combinación de filtros	Tiempo de integración (s)
435 - 470	1
495 - 525	0,5
540 - 580	0,5
610 - 645	0,5
680 - 700	1

- 15 El programa Pre-PCR comprende la desnaturalización inicial y la incubación a 55, 60 y 65 °C para la transcripción inversa de moldes de ARN. La incubación a tres temperaturas combina los efectos ventajosos de que, a temperaturas más bajas, también se transcriben secuencias diana con ligeros errores de apareamiento (tales como variantes genéticas de un organismo), mientras que a temperaturas más altas se suprime la formación de estructuras secundarias de ARN, lo que conduce a una transcripción más eficiente.

- 20 El ciclo de PCR se divide en dos mediciones, en el que ambas mediciones aplican una configuración de un solo paso (combinación de hibridación y extensión). Los 5 primeros ciclos a 55 °C permiten una mayor inclusividad preamplificando secuencias diana con ligeros errores de apareamiento, mientras que los 45 ciclos de la segunda medición proporcionan una especificidad aumentada al usar una temperatura de hibridación/extensión de 58 °C.

- 25 Usando este perfil en todas las muestras comprendidas en la placa de micropocillos mencionada anteriormente, se logró la amplificación y detección en todas las muestras, como se representa en la Fig. 2. Esto demuestra que la preparación de la muestra antes de la amplificación también se llevó a cabo con éxito.

- 30 Los resultados para los controles internos cualitativos y cuantitativos del VIH y el control interno cuantitativo del VHB se describen por separado en la Fig. 2 en aras de la claridad. Se puede observar que los controles se amplificaron con éxito en todos los casos. La cuantificación de las dianas de VIH y VHB en la configuración cuantitativa se calculó por comparación con el ácido nucleico de control interno que sirve como patrón cuantitativo.

Ejemplo 2:

El procedimiento de amplificación genérico descrito anteriormente en el presente documento se llevó a cabo en una variedad de diferentes ácidos nucleicos diana en experimentos separados pero en condiciones idénticas. El aislamiento del ácido nucleico respectivo se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 1.

5 El ácido nucleico de control interno genérico respectivo se seleccionó de SEQ ID NO. 45-49 y fue ARN encapsulado para dianas de ARN y ADN empaquetado en lambda para dianas de ADN. Para ensayos de ARN cualitativos se añadieron 300 partículas por muestra, para ensayos de ARN cuantitativos se añadieron 3000 y para todos los ensayos de ADN 500.

10 Se utilizó el siguiente perfil de PCR para todas las dianas:

		Objetivo [°C]	Modo de adquisición	Mantenimiento [hh:mm:ss]	Medición [hh:mm:ss]	Rampa de temperatura [°C/s]
Pre-PCR	Etapa UNG	50	ninguno	00:02:00	0:00:00	2,2
	Desnaturalización de molde/UNG	94	ninguno	0:00:05	0:00:00	4,4
	Etapa de RT	55	ninguno	00:02:00	0:00:00	2,2
		60	ninguno	0:06:00	0:00:00	4,4
		65	ninguno	0:04:00	0:00:00	4,4
1ª medición	95	ninguno	0:00:05	0:00:00	4,4	
	55	único	0:00:30	0:00:08	2,2	
2ª medición	91	ninguno	0:00:05	0:00:00	4,4	
	58	único	0:00:25	0:00:08	2,2	
Enfriamiento	40	ninguno	00:02:00	0:00:00	2,2	

Denominación	Ciclos
Pre-PCR	1
1ª medición	5
2ª medición	45
Enfriamiento	1

En detalle, se realizaron los siguientes experimentos:

15

1. Análisis cualitativo múltiple de VHB, VHC y VIH

a. Mezcla maestra

20 R1:

	Conc. en 50 µl - PCR (µM)
Mn(Ac) ₂ * 4H ₂ O (pH 6,1 ajustado con ácido acético)	3300
Na ₃ Ri, tamponado con Tris 10 mM a pH 7	0,018
	pH: 6,41

R2:

Reactivo	Conc. en 50 µl - PCR (µM)
DMSO (%)	5,4

ES 2 640 522 T3

NaN ₃ /Ri, tamponado con Tris 10 mM a pH 7	0,027
KOAc (pH 7,0)	120 000
Glicerol (%)	3
Tween 20 (%)	0,015
Tricina pH 8.0	60 000
Aptámero NTQ21-46A	0,2222
Uracil-N-glicosilasa (U/μl)	0,2
dGTP	400,0
dATP	400,0
dCTP	400,0
dUTP	800,0
Polimerasa Z05-D (U/μl)*	0,9
Cebadores/sondas seleccionadas de SEQ ID NO. 1-35	0,125-0,3
SEQ ID NO. 36	0,100
SEQ ID NO. 37	0,100
SEQ ID NO. 38	0,150
Cebadores/sondas seleccionadas de SEQ ID NO. 60-76	0,050-0,250
SEQ ID NO. 42	0,200
SEQ ID NO. 43	0,200
SEQ ID NO. 44	0,100

Sensibilidad analítica / LDD

- 5 Para cada virus detectado (VIH-1 grupo M, VIH-1 grupo O, VIH-2, VHB y VHC), a varias concentraciones/niveles en y alrededor del LDD previsto para el plasma con EDTA. Se ensayó un panel por virus y concentración con al menos 20 réplicas válidas por concentración. El LDD se determinó mediante el análisis PROBIT (véase la Tabla 1-5).

VIH

- 10 Tabla 1: VIH-1 grupo M. Tasas de éxito y LDD Probit de un panel individual

Concentración	Número de réplicas	Número de positivos	Tasa de éxito
32 cp/ml	21	21	100 %
16 cp/ml	21	21	100 %
8 cp/ml	21	21	100 %
4 cp/ml	21	20	95 %
2 cp/ml	21	15	71 %
1 cp/ml	21	9	43 %
0 cp/ml (control negativo)	12	0	0 %
LDD por análisis PROBIT (95 % de tasa de éxito)			4,06 cp/ml
Intervalo de confianza del 95 % para LDD mediante análisis PROBIT			2,85-9,24 cp/ml

El título de la norma de la OMS para el VIH-1 grupo M se convirtió a UI/ml.

$$\text{Título} \left(\frac{\text{UI}}{\text{ml}^{\text{an}}} \right) = \frac{\text{Titer} \left(\frac{\text{cp}}{\text{ml}^{\text{an}}} \right)}{0,6}$$

Por lo tanto, el LDD del VIH-1 grupo M en UI/ml es

5 LDD por análisis PROBIT (95 % de tasa de éxito): 6,77 UI/ml

Intervalo de confianza del 95 % para LDD mediante análisis PROBIT: 4,75 - 15,4 UI/ml

10 Tabla 2: VIH-1 grupo O. Tasas de éxito y LDD Probit de un panel individual

Concentración	Número de réplicas	Número de positivos	Tasa de éxito
60 cp/ml	21	21	100 %
30 cp/ml	20	20	100 %
20 cp/ml	21	21	100 %
14 cp/ml	21	19	90%
7 cp/ml	21	15	71 %
4,5 cp/ml	21	12	57%
0 cp/ml (control negativo)	12	0	0 %
LDD por análisis PROBIT (95 % de tasa de éxito)			14,9 cp/ml
Intervalo de confianza del 95 % para LDD mediante análisis PROBIT			10,9-31,5 cp/ml

El título del patrón primario para el VIH-1 grupo O se reasignó al panel del VIH-1 grupo O de CBER; el factor de cálculo es 0,586.

15 Por lo tanto, el LDD del VIH-1 grupo O es

LDD por análisis PROBIT (95 % de tasa de éxito): 8,8 cp/ml

Intervalo de confianza del 95 % para LDD mediante análisis PROBIT: 6,4 - 18,5 cp/ml

20

Tabla 3: VIH-2. Tasas de éxito y LDD Probit de un panel individual

Concentración	Número de réplicas	Número de positivos	Tasa de éxito
4 cp/ml	21	21	100 %
2 cp/ml	21	21	100 %
1 cp/ml	21	20	95 %
0,5 cp/ml	21	13	62%
0,25 cp/ml	21	13	62%
0,125 cp/ml	21	7	33 %
0 cp/ml (control negativo)	12	0	0%
LDD por análisis PROBIT (95 % de tasa de éxito)			1,29 cp/ml
Intervalo de confianza del 95 % para LDD mediante análisis PROBIT			- 3,11 cp/ml

El título del patrón primario para el VIH-2 se reasignó al panel del VIH-2 de CBER; el factor de cálculo es 26,7.

25

Por lo tanto, el LDD del VIH-2 es

LDD por análisis PROBIT (95 % de tasa de éxito): 34,44 cp/ml

Intervalo de confianza del 95 % para LDD mediante análisis PROBIT: 21,89 - 83,04 cp/ml

VHB

5

Tabla 4: VHB. Tasas de éxito y LDD Probit de un panel individual

Concentración	Número de réplicas	Número de positivos	Tasa de éxito
7,6 UI/ml	21	21	100 %
3,8 UI/ml	21	21	100 %
1,9 UI/ml	21	20	95 %
0,95 UI/ml	21	14	67 %
0,6 UI/ml	19	12	63 %
0,4 UI/ml	21	12	57 %
0 UI/ml (control negativo)	12	0	0 %
LDD por análisis PROBIT (95 % de tasa de éxito)			2,27 UI/ml
Intervalo de confianza del 95 % para LDD mediante análisis PROBIT			1,48 - 6,54 UI/ml

VHC

10

Tabla 5: VHC. Tasas de éxito y LDD Probit de un panel individual

Concentración	Número de réplicas	Número de positivos	Tasa de éxito
24 UI/ml	21	21	100 %
12 UI/ml	21	21	100 %
6 UI/ml	21	21	100 %
3 UI/ml	21	17	81 %
1,5 UI/ml	21	14	67 %
0,75 UI/ml	21	9	43 %
0 UI/ml (control negativo)	18	0	0 %
LDD por análisis PROBIT (95 % de tasa de éxito)			4,76 UI/ml
Intervalo de confianza del 95 % para LDD mediante análisis PROBIT			3,14 - 11,61 UI/ml

2. Análisis cualitativo del VNO

15

Mezcla maestra

R1:

Reactivo	Conc. en 50 µl - PCR (µM)
Mn(Ac) ₂ * 4H ₂ O (pH 6,1 ajustado con ácido acético)	3.300
NaN ₃ /Ri, tamponado con Tris 10 mM a pH 7	0,018
	pH: 6,41

20

R2:

Reactivo	Conc. en 50 µl - PCR (µM)
DMSO (%)	5,4
NaN ₃ /Ri, tamponado con Tris 10 mM a pH 7	0,027

ES 2 640 522 T3

Acetato de potasio pH 7,0	120 000
Glicerol (%)	3
Tween 20 (%)	0,015
Tricina pH 8.0	60 000
Aptámero NTQ21-46A	0,2222
Uracil-N-glicosilasa (U/μl)	0,2
dGTP	400,0
dATP	400,0
dCTP	400,0
dUTP	800,0
Polimerasa Z05-D (U/μl)*	0,9
Cebadores/sondas seleccionadas de SEQ ID NO. 53-59	0,08-0,4
SEQ ID NO. 42	0,150
SEQ ID NO. 43	0,150
SEQ ID NO. 44	0,100

Sensibilidad analítica / LDD

5 Para los virus (VNO, VESL y VEJ) se preparó un panel independiente como una dilución en serie del patrón respectivo incluyendo varias concentraciones/niveles en y alrededor del LDD previsto. Se ensayó un panel por virus y concentración con al menos 20 réplicas válidas por concentración. El LDD se determinó mediante el análisis PROBIT.

10 Tabla 6: VNO. Tasas de éxito y LDD Probit de un panel individual

Concentración	Número de réplicas	Número de positivos	Tasa de éxito
20 cp/ml	21	21	100 %
12 cp/ml	21	21	100 %
8 cp/ml	21	21	100 %
5 cp/ml	21	17	81 %
2,5 cp/ml	21	15	71,4 %
0,5 cp/ml	21	1	4,8 %
0 cp/ml (control negativo)	12	0	0 %
LDD por análisis PROBIT (95 % de tasa de éxito)			6,57 cp/ml
Intervalo de confianza del 95 % para LDD mediante análisis PROBIT			4,74 - 11,03 cp/ml

Tabla 7: VESL. Tasas de éxito y LDD Probit de un panel individual

Concentración	Número de réplicas	Número de positivos	Tasa de éxito
140 cp/ml	21	21	100 %
100 cp/ml	21	20	95,2 %
70 cp/ml	21	20	95,2 %
40 cp/ml	21	17	81,0 %
20 cp/ml	21	11	52,4 %
10 cp/ml	21	6	28,6 %
0 cp/ml (control negativo)	12	0	0 %

ES 2 640 522 T3

Concentración	Número de réplicas	Número de positivos	Tasa de éxito
LDD por análisis PROBIT (95 % de tasa de éxito)			78,9 cp/ml
Intervalo de confianza del 95 % para LDD mediante análisis PROBIT			55,4 - 145,7 cp/ml

Tabla 8: VEJ. Tasas de éxito y LDD Probit de un panel individual

Concentración	Número de réplicas	Número de positivos	Tasa de éxito
20 cp/ml	21	20	95,2 %
12 cp/ml	21	20	95,2 %
8 cp/ml	21	18	85,7 %
5 cp/ml	21	17	81,0%
2,5 cp/ml	21	14	66,7 %
0,5 cp/ml	21	2	9,52 %
0 cp/ml (control negativo)	12	0	0 %
LDD por análisis PROBIT (95 % de tasa de éxito)			13,55 cp/ml
Intervalo de confianza del 95 % para LDD mediante análisis PROBIT			8,78-27,7 cp/ml

5 3. Análisis cuantitativo de VHB

Mezcla maestra

R1:

10

Reactivo	Conc. final en 50 µl - PCR (µM)
Mn(Ac) ₂ * 4H ₂ O (pH 6,1 ajustado con ácido acético)	3300
NaN ₃ /Ri, tamponado con Tris 10 mM a pH 7	0,018
	pH: 6,41

R2:

Reactivo	Conc. final en 50 µl - PCR (µM)
Glicerol (p/v, %)	3 %
Tricina	60 mM
DMSO (% , v/v)	5,4 %
KOAc	120 mM
Tween 20 (v/v)	0,015 %
Aptámero NTQ21-46A	0,222 µM
Polimerasa Z05D	0,9 U/µl (45 U/rxn)
Uracil-N-glicosilasa	0,2 U/µl (10 U/rxn)
Azida de sodio (p/v)	0,027 %
dCTP	400 µM
dGTP	400 µM
dATP	400 µM
dUTP	800 µM
SEQ ID NO. 36	1,2 µM
SEQ ID NO. 37	1,2 µM

Reactivo	Conc. final en 50 µl - PCR (µM)
SEQ ID NO. 50	0,6 µM
SEQ ID NO. 51	0,6 µM
SEQ ID NO. 38	0,1 µM
SEQ ID NO. 52	M

Sensibilidad analítica / LDD

5 Se prepararon cuatro paneles de dilución con el patrón secundario de VHB (que representa el genotipo A), es decir, dos en suero negativo para VHB para volúmenes de entrada de muestra de 200 µl y 500 µl y dos en plasma con EDTA negativo para VHB para volúmenes de entrada de 200 µl y 500 µl. Cada panel incluyó 7 niveles de concentración en y alrededor del LDD previsto. Se ensayó un panel por matriz con ≥ 21 réplicas por nivel de concentración. Al menos 20 réplicas necesitaban ser válidas. El LDD se determinó mediante el análisis PROBIT a una tasa de éxito del 95 % y mediante un análisis de la tasa de éxito ≥ 95 %.

10

Tabla 9: Análisis de LDD para un volumen de entrada de 200 µl en plasma con EDTA. *

Concentración	Número de réplicas	Número de positivos	Tasa de éxito
25 UI/ml	41	41	100 %
15 UI/ml	41	39	95,1 %
10 UI/ml	41	40	97,6 %
7 UI/ml	41	40	97,6 %
4 UI/ml	24	20	83,3 %
1 UI/ml	24	4	16,7 %
0 UI/ml (control negativo)	24	0	0%
LDD por análisis PROBIT (95 % de tasa de éxito)			8,2 UI/ml
Intervalo de confianza del 95 % para LDD mediante análisis PROBIT			4,8 - 26,0 UI/ml

* Se probaron réplicas adicionales para estrechar el intervalo de confianza del 95 % observado.

15

Tabla 10: Análisis de LDD para un volumen de entrada de 500 µl en plasma con EDTA.

Concentración	Número de réplicas	Número de positivos	Tasa de éxito
10 UI/ml	21	21	100 %
7 UI/ml	21	21	100 %
4 UI/ml	21	21	100 %
2,5 UI/ml	21	20	95,2 %
1 UI/ml	21	14	66,7 %
0,2 UI/ml	21	1	4,8 %
0 UI/ml (control negativo)	21	0	0%
LDD por análisis PROBIT (95 % de tasa de éxito)			2,3 UI/ml
Intervalo de confianza del 95 % para LDD mediante análisis PROBIT			1,6 - 4,2 UI/ml

Tabla 11: Análisis de LDD para un volumen de entrada de 200 µl en suero.

Concentración	Número de réplicas	Número de positivos	Tasa de éxito
25 UI/ml	21	21	100 %
15 UI/ml	21	20.	95,2 %

Concentración	Número de réplicas	Número de positivos	Tasa de éxito
10 UI/ml	21	21	100 %
7 UI/ml	21	20	95,2 %
4 UI/ml	21	15	71,4 %
1 UI/ml	21	8	38,1 %
0 UI/ml (control negativo)	21	0	0 %
LDD por análisis PROBIT (95 % de tasa de éxito)			9,4 UI/ml
Intervalo de confianza del 95 % para LDD mediante análisis PROBIT			6,2 - 19,0 UI/ml

Tabla 12: Análisis de LDD para un volumen de entrada de 500 µl en suero.

Concentración	Número de réplicas	Número de positivos	Tasa de éxito
10 UI/ml	21	21	100 %
7 UI/ml	21	21	100 %
4 UI/ml	21	21	100 %
2,5 UI/ml	21	16	76,2 %
1 UI/ml	21	16	76,2 %
0,2 UI/ml	21	7	33,3 %
0 UI/ml (control negativo)	21	0	0%
LDD por análisis PROBIT (95 % de tasa de éxito)			4,1 UI/ml
Intervalo de confianza del 95 % para LDD mediante análisis PROBIT			2,4 - 10,0 UI/ml

5 Resumen del LDD:

Plasma con EDTA: El análisis PROBIT a una tasa de éxito del 95 % dio como resultado un LDD de 8,2 UI/ml para 200 µl de volumen de entrada de muestra y de 2,3 UI/ml para 500 µl de volumen de entrada de muestra para el plasma con EDTA.

10 El intervalo de confianza del 95 % para estas concentraciones fue de 4,8 - 26,0 UI/ml para 200 µl de volumen de entrada de muestra y de 1,6 - 4,2 UI/ml para 500 µl de volumen de entrada de muestra.

15 Suero: El análisis PROBIT a una tasa de éxito del 95 % dio como resultado un LDD de 9,02 UI/ml para 200 µl de volumen de entrada de muestra y de 4,1 UI/ml para 500 µl de volumen de entrada de muestra para el suero.

El intervalo de confianza del 95 % para estas concentraciones fue de 6,2 - 19,0 UI/ml para 200 µl de volumen de entrada de muestra y de 2,4 - 10,0 UI/ml para 500 µl de volumen de entrada de muestra.

20 **Linealidad**

Se preparó un panel de plasma con EDTA y un panel de suero utilizando el genotipo A de VHB (proporcionado por RMD Research Pleasanton, plásmido linealizado, pVHB-PC_ADW2). Cada uno de los paneles se analizó a 12 niveles de concentración para la determinación del rango dinámico esperado (4 - 2E+09 UI/ml) del ensayo. Todos los niveles de concentración / miembros del panel (MP) se sometieron a ensayo con 21 réplicas.

Este estudio se realizó con un volumen de entrada de muestra de 500 µl. Los niveles de concentración se seleccionaron como sigue: un nivel por debajo del límite inferior de cuantificación (LIC) esperado, uno en el LIC esperado, uno por encima del LIC esperado, varias concentraciones a niveles intermedios, al límite superior de cuantificación (LSC) esperado y uno por encima del LSC esperado.

MP 12 = 2,0E+09 UI/ml - por encima del LSC esperado

MP 11 = 1,0E+09 UI/ml - en el LSC esperado

35

MP 10 = 1,0E+08 UI/ml - por debajo del LSC esperado

MP 9 = 1,0E+07 UI/ml - nivel de concentración intermedio

5 PM 8 = 1,0E+06 UI/ml - nivel de concentración intermedio

MP 7 = 1,0E+05 UI/ml - nivel de concentración intermedio

10 MP 6 = 1,0E+04 UI/ml - nivel de concentración intermedio

MP 5 = 1,0E+03 UI/ml - nivel de concentración intermedio

15 MP 6a = 2,0E+02 UI/ml - nivel de concentración intermedio (MP 6 diluido a 2,0E+02 UI/ml, utilizado para la asignación del título del panel de suero)

MP 4 = 1,0E+02 UI/ml - nivel de concentración intermedio (también utilizado para la asignación del título del panel de plasma)

20 MP 3 = 5,0E+01 UI/ml - por encima del LIC esperado

MP 2 = 1,0E+01 UI/ml - en el LIC esperado

MP 1 = 4,0E+00 UI/ml - por debajo del LIC esperado

25 Para cada muestra válida del panel de linealidad, el título de ADN de VHB observado se transformó en título logarítmico y se calculó el título logarítmico medio para cada nivel de concentración.

Tabla 13: Linealidad en plasma con EDTA

Título nominal (UI/ml)	Título asignado (UI/ml)	Título asignado (log10)	Título medio observado (log10)	Réplicas
4,00E+00	3,50E+00	0,54	0,52	17
1,00E+01	8,70E+00	0,94	0,91	21
5,00E+01	4,40E+01	1,64	1,69	21
1,00E+02	8,70E+01	1,94	2,04	21
1,00E+03	8,70E+02	2,94	3,01	21
1,00E+04	8,70E+03	3,94	3,9	21
1,00E+05	8,70E+04	4,94	4,88	21
1,00E+06	8,70E+05	5,94	5,87	21
1,00E+07	8,70E+06	6,94	6,92	21
1,00E+08	8,70E+07	7,94	8,01	21
1,00E+09	8,70E+08	8,94	9,04	21
2,00E+09	1,70E+09	9,24	9,38	21

30

Una representación gráfica de este resultado se muestra en la Fig. 13.

Tabla 14: Linealidad en suero

Título nominal (UI/ml)	Título asignado (UI/ml)	Título asignado (log10)	Título medio observado (log10)	Réplicas
4,00E+00	3,30E+00	0,52	0,7	21
1,00E+01	8,30E+00	0,92	0,99	21
5,00E+01	4,10E+01	1,62	1,73	21
1,00E+02	8,30E+01	1,92	2,03	21
1,00E+03	8,30E+02	2,92	2,93	21
1,00E+04	8,30E+03	3,92	3,8	21
1,00E+05	8,30E+04	4,92	4,78	21

Título nominal (UI/ml)	Título asignado (UI/ml)	Título asignado (log10)	Título medio observado (log10)	Réplicas
1,00E+06	8,30E+05	5,92	5,75	21
1,00E+07	8,30E+06	6,92	6,73	21
1,00E+08	8,30E+07	7,92	7,78	21
1,00E+09	8,30E+08	8,92	8,92	21
2,00E+09	1,70E+09	9,22	9,22	21

Una representación gráfica de este resultado se muestra en la Fig. 14.

Resumen de linealidad:

5 El intervalo lineal, definido como el intervalo de concentración para el cual la desviación logarítmica de los títulos medios logarítmicos observados está dentro de $\pm 0,3$ del título nominal logarítmico, se determinó como: 3,5E+00 UI/ml - 1,7E+09 UI/ml para el plasma con EDTA y 3,3E+00 UI/ml - 1,7E+09 UI/ml para el suero. Se encontró que el límite inferior de cuantificación era: 4,0E+00 UI/ml para plasma con EDTA y suero.

10

4. Análisis cuantitativo del VHC

Mezcla maestra

15 R1:

Reactivo	Conc. final en 50 μ l - PCR (μ M)
Mn(Ac) ₂ * 4H ₂ O (pH 6,1 ajustado con ácido acético)	3300
NaN ₃ /Ri, tamponado con Tris 10 mM a pH 7	0,018
	pH: 6,41

R2:

Reactivo	Conc. final en 50 μ l - PCR
Glicerol (p/v, %)	3 %
Tricina	60 mM
DMSO (% v/v)	5,4 %
KOAc	120 mM
Tween 20 (v/v)	0,015 %
NTQ21-46A	0,222 μ M
Z05D	0,9 U/ μ l (45 U/rxn)
UNG	0,2 U/ μ l (10 U/rxn)
Azida de sodio (p/v)	0,027
dCTP	400 μ M
dGTP	400 μ M
dATP	400 μ M
dUTP	800 μ M
Cebadores/sondas seleccionadas de SEQ ID NO. 60-76	0,1 μ M
SEQ ID NO. 42	0,3 μ M
SEQ ID NO. 43	0,3 μ M
SEQ ID NO. 44	μ M

20

Sensibilidad analítica / LDD

Se preparó un panel de dilución con el patrón secundario de VHC de Roche en plasma con EDTA y suero negativos para VHC utilizando volúmenes de entrada de muestra de 200 μ l y 500 μ l. Cada nivel de concentración se sometió a

ES 2 640 522 T3

ensayo con 21 réplicas. Al menos 20 réplicas necesitaban ser válidas. El LDD se determinó mediante el análisis PROBIT a una tasa de éxito del 95 % y mediante un análisis de la tasa de éxito ≥ 95 %.

5 Tabla 15: Tasas de éxito y análisis Probit con volumen de entrada de procesamiento de muestra de 200 μ l para plasma con EDTA

Concentración	Número de réplicas	Número de positivos	Tasa de éxito
55 UI/ml	21	21	100 %
38 UI/ml	21	21	100 %
25 UI/ml	21	20	95 %
12,5 UI/ml	21	19	90 %
6 UI/ml	21	15	71 %
3 UI/ml	21	6	29 %
0 UI/ml (control negativo)	21	0	0 %
LDD por análisis PROBIT (95 % de tasa de éxito)			17,4 UI/ml
Intervalo de confianza del 95 % para LDD mediante análisis PROBIT			12,1 - 34,3 UI/ml

10 Tabla 16: Tasas de éxito y análisis Probit con volumen de entrada de procesamiento de muestra de 500 μ l para plasma con EDTA

Concentración	Número de réplicas	Número de positivos	Tasa de éxito
22 UI/ml	21	21	100 %
15 UI/ml	21	21	100 %
10 UI/ml	20	20	100 %
5 UI/ml	21	19	76 %
2,5 UI/ml	21	15	71 %
1 UI/ml	21	6	57 %
0 UI/ml (control negativo)	21	0	0 %
LDD por análisis PROBIT (95 % de tasa de éxito)			9,0 UI/ml
Intervalo de confianza del 95 % para LDD mediante análisis PROBIT			5,5 - 25,4 UI/ml

15 Tabla 17: Tasas de éxito y análisis Probit con volumen de entrada de procesamiento de muestra de 200 μ l para suero

Concentración	Número de réplicas	Número de positivos	Tasa de éxito
55 UI/ml	21	21	100 %
38 UI/ml	21	21	100 %
25 UI/ml	21	20	95 %
12,5 UI/ml	21	18	86 %
6 UI/ml	21	13	62 %
3 UI/ml	21	6	29 %
0 UI/ml (control negativo)	21	0	0 %
LDD por análisis PROBIT (95 % de tasa de éxito)			20,2 UI/ml
Intervalo de confianza del 95 % para LDD mediante análisis PROBIT			14,0 - 39,3 UI/ml

Tabla 18: Tasas de éxito y análisis Probit con volumen de entrada de procesamiento de muestra de 500 µl para suero

Concentración	Número de réplicas	Número de positivos	Tasa de éxito
22 UI/ml	21	21	100 %
15 UI/ml	21	21	100 %
10 UI/ml	21	20	95 %
5 UI/ml	21	18	86 %
2,5 UI/ml	21	12	57 %
1 UI/ml	21	4	19 %
0 UI/ml (control negativo)	21	0	0 %
LDD por análisis PROBIT (95 % de tasa de éxito)			8,2 UI/ml
Intervalo de confianza del 95 % para LDD mediante análisis PROBIT			5,8 - 15,0 UI/ml

5 **Resumen del LDD:**

1. El análisis PROBIT a una tasa de éxito del 95 % dio como resultado un LDD de 17,4 UI/ml para 200 µl de volumen de entrada de procesamiento de muestra y de 9,0 UI/ml para 500 µl de volumen de entrada de procesamiento de muestra para plasma con EDTA. El intervalo de confianza del 95 % para estas concentraciones fue de 12,1 - 34,3 UI/ml para 200 µl de volumen de entrada de procesamiento de muestra y de 5,5 - 25,4 UI/ml para 500 µl de volumen de entrada de procesamiento de muestra.

2. Los valores del análisis PROBIT a una tasa de éxito del 95 % son de 20,2 UI/ml para 200 µl de volumen de entrada del procedimiento de muestra y de 8,2 UI/ml para 500 µl de volumen de entrada del procedimiento de muestra para el suero. El intervalo de confianza del 95 % para estas concentraciones fue de 14,0 - 39,3 UI/ml para 200 µl de volumen de entrada de procesamiento de muestra y de 5,8 - 15,0 UI/ml para 500 µl de volumen de entrada de procesamiento de muestra.

20 **Linealidad**

Se analizó una preparación de un panel de plasma con EDTA y una preparación de un panel de suero de ARN de VHC trazable a la norma de la OMS de VHC. Los paneles de linealidad se prepararon por dilución en serie y se analizaron a 10 concentraciones diferentes. El estudio se realizó con 500 µl de volumen de entrada del procesamiento de muestra. Las concentraciones se seleccionaron como sigue: un nivel por debajo del límite inferior de cuantificación (LIC) esperado, uno en el LIC, uno por encima del LIC, varias concentraciones a niveles intermedios, al límite superior de cuantificación (LSC) esperado y uno por encima del LSC. Para todas las concentraciones se sometieron a ensayo 21 réplicas.

30 MP 1 = 2,0E+08 UI/ml - por encima del LSC esperado

MP 2 = 1,0E+08 UI/ml - en el LSC esperado

MP 3 = 1,0E+07 UI/ml - por debajo del LSC esperado

35 MP 4 = 1,0E+06 UI/ml - nivel de concentración intermedio

MP 5 = 1,0E+05 UI/ml - nivel de concentración intermedio

40 MP 6 = 1,0E+04 UI/ml - nivel de concentración intermedio para la asignación del título

MP 7 = 1,0E+03 UI/ml - nivel de concentración intermedio

MP 8 = 1,0E+02 UI/ml - por encima del LIC esperado

45 MP 9 = 1,0E+01 UI/ml - en el LIC esperado

MP 10 = 8,0E+00 UI/ml - por debajo del LIC esperado

Tabla 19: Linealidad en plasma con EDTA

ES 2 640 522 T3

Título nominal (UI/ml)	Título asignado (UI/ml)	Título asignado (log10)	Título medio observado (log10)	Réplicas
8,00E+00	4,87E+00	0,7	0,6	15
1,00E+01	6,09E+00	0,8	0,8	17
1,00E+02	6,09E+01	1,8	1,7	21
1,00E+03	6,09E+02	2,8	2,8	21
1,00E+04	6,09E+03	3,8	3,8	21
1,00E+05	6,09E+04	4,8	4,7	21/20
1,00E+06	6,09E+05	5,8	5,6	21/20
1,00E+07	6,09E+06	6,8	6,7	21
1,00E+08	6,09E+07	7,8	7,8/7,7	21/18
2,00E+08	1,22E+08	8,1	8	21/20

Una representación gráfica de este resultado se muestra en la Fig. 15.

5 Tabla 20: Linealidad en suero

Título nominal (UI/ml)	Título asignado (UI/ml)	Título asignado (log10)	Título medio observado (log10)	Réplicas
8,00E+00	3,90E+00	0,6	0,7	10
1,00E+01	4,96E+00	0,7	0,7	14
1,00E+02	4,96E+01	1,7	1,6	21
1,00E+03	4,96E+02	2,7	2,8	21
1,00E+04	4,96E+03	3,7	3,7	21
1,00E+05	4,96E+04	4,7	4,7	21
1,00E+06	4,96E+05	5,7	5,7	21
1,00E+07	4,96E+06	6,7	6,7	21
1,00E+08	4,96E+07	7,7	7,7	21
2,00E+08	9,92E+07	8	8,1	21

Una representación gráfica de este resultado se muestra en la Fig. 16.

10 Resumen de linealidad:

El intervalo lineal, definido como el intervalo de concentración para el cual la desviación logarítmica de los títulos medios logarítmicos observados está dentro de $\pm 0,3$ del título nominal logarítmico, se determinó como: 4,87E+00 UI/ml - 1,22E+08 UI/ml para el plasma con EDTA y 3,90E+00 UI/ml - 9,92E+07 UI/ml para el suero.

15 5. Análisis cuantitativo del VIH

Mezcla maestra

20 R1:

Reactivo	Conc. final en 50 μ l - PCR (μ M)
Mn(Ac) ₂ * 4H ₂ O (pH 6,1 ajustado con ácido acético)	3300
NaN ₃ /Ri, tamponado con Tris 10 mM a pH 7	0,018
	pH: 6,41

R2:

Reactivo	Conc. final en 50 μ l - PCR
----------	---------------------------------

Reactivo	Conc. final en 50 µl - PCR
Glicerol (p/v, %)	3 %
Tricina	60 mM
DMSO (% , v/v)	5,4 %
KOAc	120 mM
Tween 20 (v/v)	0,02 %
Aptámero NTQ21-46A	0,222 µM
Polimerasa Z05D	0,9 U/µl (45 U/rxn)
UNG	0,2 U/µl (10 U/rxn)
Azida de sodio (p/v)	0,027
dCTP	400 µM
dGTP	400 µM
dATP	400 µM
dUTP	800 µM
Cebadores/sondas seleccionadas de SEQ ID NO. 1-35	0,1 µM - 0,3 µM
SEQ ID NO. 50	0,3 µM
SEQ ID NO. 51	0,3 µM
SEQ ID NO. 52	µM

Sensibilidad analítica / LDD

- 5 Se preparó un panel de dilución con el patrón secundario de VIH-1M en plasma con EDTA negativo para VIH-1 utilizando volúmenes de entrada de muestra de 200 µl y 500 µl. Cada nivel de concentración se sometió a ensayo con 21 réplicas. Al menos 20 réplicas necesitaban ser válidas. El LDD se determinó mediante el análisis PROBIT a una tasa de éxito del 95 % y mediante un análisis de la tasa de éxito ≥ 95 %.

10 Tabla 21: Análisis de LDD para un volumen de entrada de 200 µl en plasma con EDTA

Concentración	Número de réplicas	Número de positivos	Tasa de éxito
200 cp/ml	21	21	100 %
100 cp/ml	21	21	100 %
80 cp/ml	21	21	100 %
50 cp/ml	21	20	95,2 %
30 cp/ml	21	18	85,7 %
20 cp/ml	21	17	81,0 %
10 cp/ml	21	8	38,1 %
0 cp/ml (control negativo)	21	0	0 %
LDD por análisis PROBIT (95 % de tasa de éxito)			41,8 cp/ml
Intervalo de confianza del 95 % para LDD mediante análisis PROBIT			30,9 - 74,9 cp/ml

Tabla 22: Análisis de LDD para un volumen de entrada de 500 µl

Concentración	Número de réplicas	Número de positivos	Tasa de éxito
30 cp/ml	21	21	100 %
25 cp/ml	21	20	95,2 %
20 cp/ml	21	21	100 %
13,5 cp/ml	21	18	85,7 %

9 cp/ml	21	13	61,9 %
6 cp/ml	21	9	42,9 %
0 cp/ml (control negativo)	21	0	0 %
LDD por análisis PROBIT (95 % de tasa de éxito)			18,9 cp/ml
Intervalo de confianza del 95 % para LDD mediante análisis PROBIT			14,9 - 29,4 cp/ml

Resumen del LDD:

- 5 El análisis PROBIT a una tasa de éxito del 95 % dio como resultado un LDD de 41,8 cp/ml para 200 µl de volumen de entrada y de 18,9 cp/ml para 500 µl de volumen de entrada.
2. El intervalo de confianza del 95 % para estas concentraciones fue de 30,9 - 74,9 cp/ml para 200 µl de volumen de entrada y de 14,9 - 29,4 cp/ml para 500 µl de volumen de entrada.

10 Linealidad

Las muestras utilizadas en el estudio de linealidad / rango dinámico / precisión consistieron en un panel de dilución de un material sobrenadante de cultivo de células con VIH-1, el subtipo B del grupo M de VIH-1.

- 15 El panel de linealidad se preparó por dilución en serie. Este panel se analizó a 10 niveles de concentración.

Las concentraciones se seleccionaron como sigue: un nivel por debajo del límite inferior de cuantificación (LIC) esperado, uno en el LIC, uno por encima del LIC, varias concentraciones a niveles intermedios, al límite superior de cuantificación (LSC) esperado y uno por encima del LSC. Para todas las concentraciones se sometieron a ensayo 21 réplicas. El estudio de linealidad se realizó con 500 µl de volumen de entrada:

- MP 1 = 2,0E+07 cp/ml - por encima del LSC esperado
- MP 2 = 1,0E+07 cp/ml - en el LSC esperado
- 25 MP 3 = 1,0E+06 cp/ml - por debajo del LSC esperado
- MP 4 = 1,0E+05 cp/ml - nivel de concentración intermedio
- 30 MP 5 = 3,0E+04 cp/ml - nivel de concentración intermedio para la asignación del título
- MP 6 = 1,0E+04 cp/ml - nivel de concentración intermedio
- MP 7 = 1,0E+03 cp/ml - nivel de concentración intermedio
- 35 MP 8 = 1,0E+02 cp/ml - nivel de concentración intermedio
- MP 9 = 5,0E+01 cp/ml - por encima del LIC esperado
- 40 MP 10 = 2,0E+01 cp/ml - en el LIC esperado
- MP 11 = 1,5E+01 cp/ml - por debajo del LIC esperado

Tabla 23: Linealidad en plasma con EDTA

45

Título nominal (cp/ml)	Título asignado (cp/ml)	Título asignado (log10)	Título medio observado (log10)	Réplicas
1,50E+01	1,50E+01	1,2	1,3	21
2,00E+01	2,00E+01	1,3	1,5	21
5,00E+01	5,10E+01	1,7	1,8	21
1,00E+02	1,00E+02	2	2	21
1,00E+03	1,00E+03	3	3	21
1,00E+04	1,00E+04	4	4	21

ES 2 640 522 T3

1,00E+05	1,00E+05	5	5	21
1,00E+06	1,00E+06	6	6	21
1,00E+07	1,00E+07	7	7	21
2,00E+07	2,00E+07	7,3	7,4	21

Una representación gráfica de este resultado se muestra en la Fig. 17.

Resumen de linealidad:

- 5 El intervalo lineal, definido como el intervalo de concentración para el cual la desviación logarítmica de los títulos medios logarítmicos observados está dentro de $\pm 0,3$ del título nominal logarítmico, se determinó como 1,5E+01 cp/ml - 2,0E+07 cp/ml

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento para aislar y simultáneamente amplificar un primer y un segundo ácido nucleico diana que pueden estar presentes en una o más muestras fluidas, comprendiendo dicho procedimiento las etapas automatizadas de:
- 10 a. añadir un ácido nucleico patrón cuantitativo a cada una de dichas muestras fluidas, en el que la secuencia del ácido nucleico patrón cuantitativo se deriva de una fuente diferente del origen de las muestras fluidas, es diferente de las otras secuencias de ácido nucleico de las muestras fluidas, se deriva de un genoma vegetal y presenta mutaciones "*scramble*", en el que dicho ácido nucleico patrón cuantitativo tiene una concentración de entre 20 x LDD y 5000 x LDD
- 15 b. combinar un material de soporte sólido y dicha una o más muestras fluidas en uno o más recipientes durante un período de tiempo y en condiciones suficientes para permitir que los ácidos nucleicos que comprenden los ácidos nucleicos diana y el ácido nucleico patrón cuantitativo queden inmovilizados sobre el material de soporte sólido
- 20 c. aislar el material de soporte sólido del otro material presente en las muestras fluidas en una estación de separación
- d. purificar los ácidos nucleicos en dicha estación de separación y lavar el material de soporte sólido una o más veces con un tampón de lavado
- 25 e. poner en contacto los ácidos nucleicos diana purificados y el ácido nucleico patrón cuantitativo purificado con reactivos de amplificación que comprenden al menos un conjunto distinto de cebadores para cada uno de dichos ácidos nucleicos diana y para dicho ácido nucleico patrón cuantitativo en al menos dos recipientes de reacción para la amplificación del al menos el primer y segundo ácidos nucleicos diana y del ácido nucleico patrón cuantitativo en los al menos dos recipientes de reacción
- 30 f. incubar en dichos recipientes de reacción dichos ácidos nucleicos diana purificados y dicho ácido nucleico patrón cuantitativo purificado con dichos reactivos de amplificación durante un período de tiempo y en condiciones suficientes para que se produzca una reacción de amplificación indicativa de la presencia o ausencia de dichos ácidos nucleicos diana mientras se amplifica el primer pero no el segundo ácido nucleico diana en el primer recipiente de reacción y se amplifica el segundo pero no el primer ácido nucleico diana en el segundo recipiente de reacción
- 35 g. detectar y medir las señales generadas por los productos de amplificación de dichos ácidos nucleicos diana y que son proporcionales a la concentración de dichos ácidos nucleicos diana, y detectar y medir una señal generada por dicho ácido nucleico patrón cuantitativo
- h. determinar la cantidad de uno o más de dichos ácidos nucleicos diana usando el ácido nucleico patrón cuantitativo como referencia
- en el que las condiciones para la amplificación y detección en las etapas e. a g. son idénticas para dichos primer y segundo ácidos nucleicos diana purificados y dicho ácido nucleico patrón cuantitativo.
- 40 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la presencia de un producto de amplificación de dicho ácido nucleico patrón cuantitativo es indicativa de que se produce una amplificación en la mezcla de reacción incluso en ausencia de productos de amplificación de uno o más de dichos ácidos nucleicos diana.
3. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho ácido nucleico de control cuantitativo es un ácido nucleico encapsulado.
- 45 4. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la temperatura de fusión de dicho ácido nucleico patrón cuantitativo es de 50 °C a 90 °C.
- 50 5. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el ácido nucleico patrón cuantitativo tiene una longitud de hasta 500 bases.
6. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la secuencia del ácido nucleico patrón cuantitativo tiene un contenido de GC de un 30 % a un 70 %.

Fig. 1

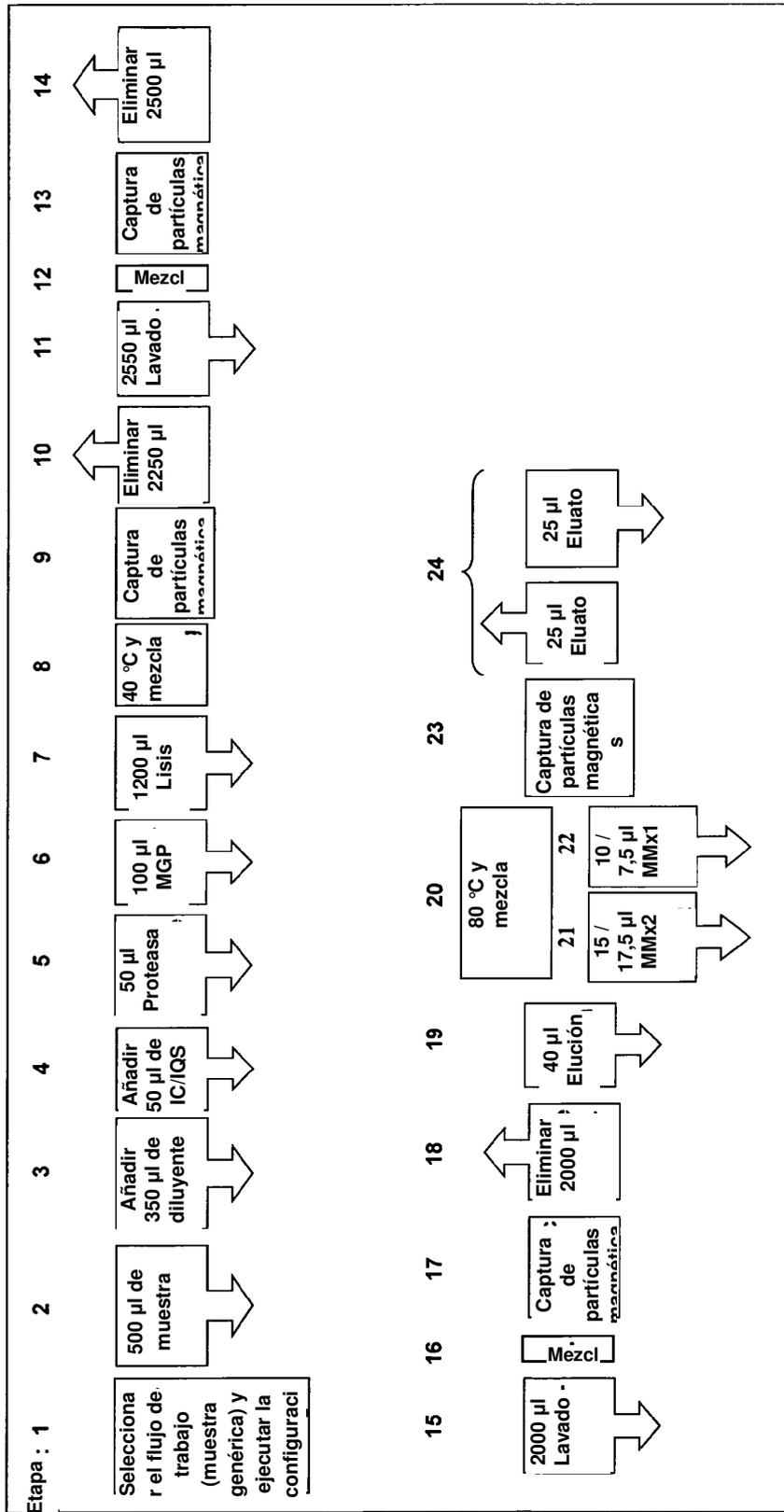


Fig. 2a

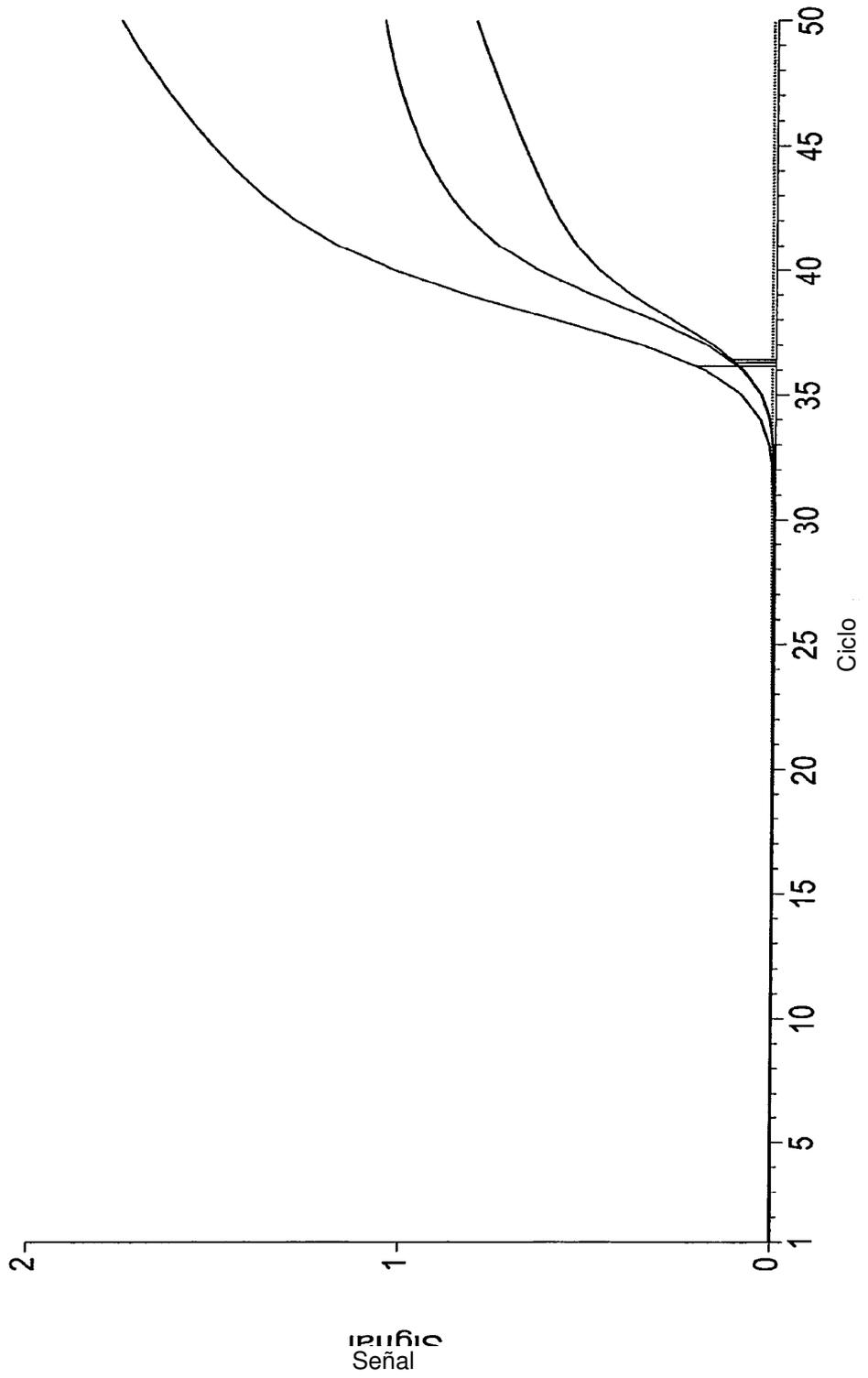


Fig. 2b

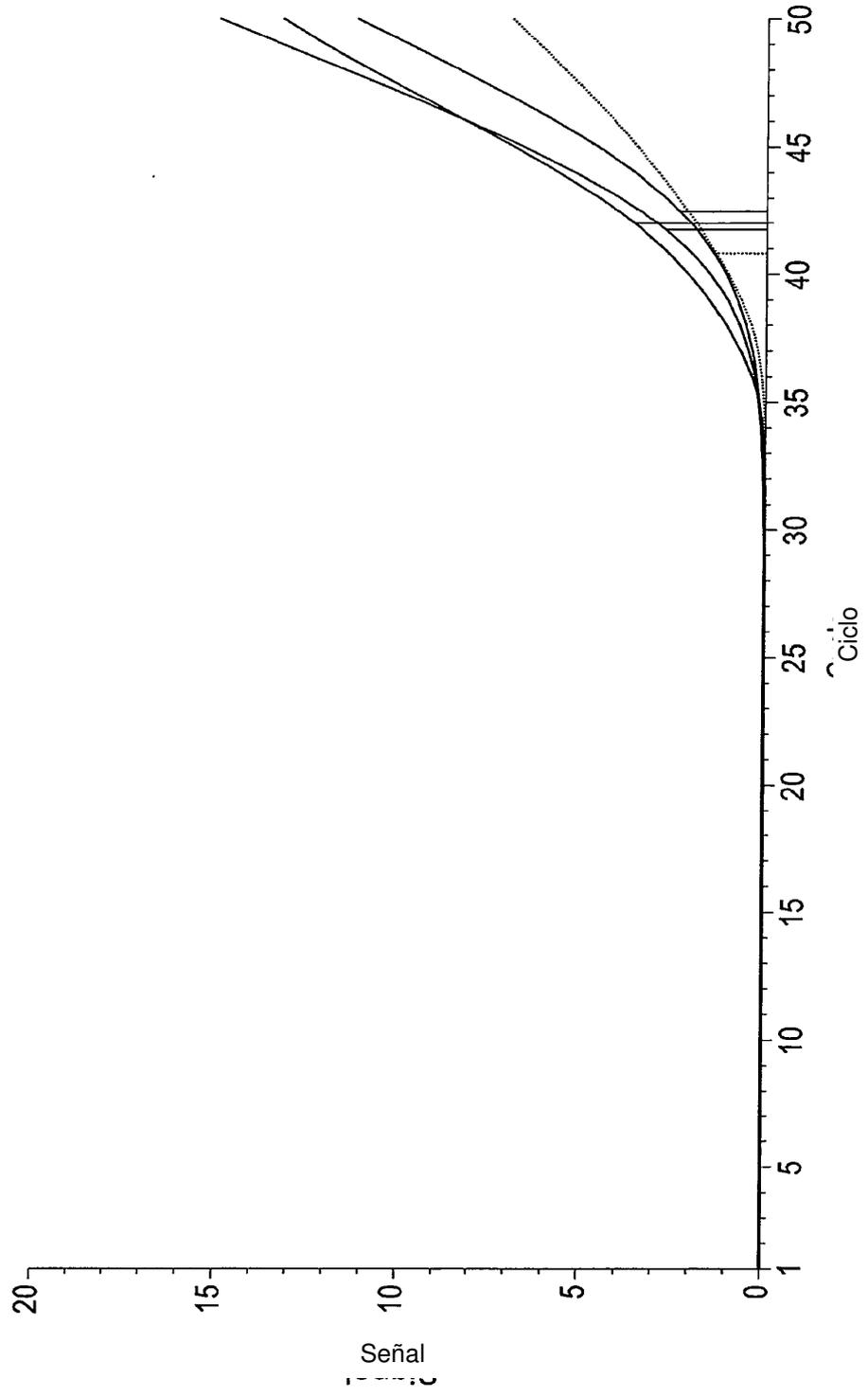


Fig. 2c

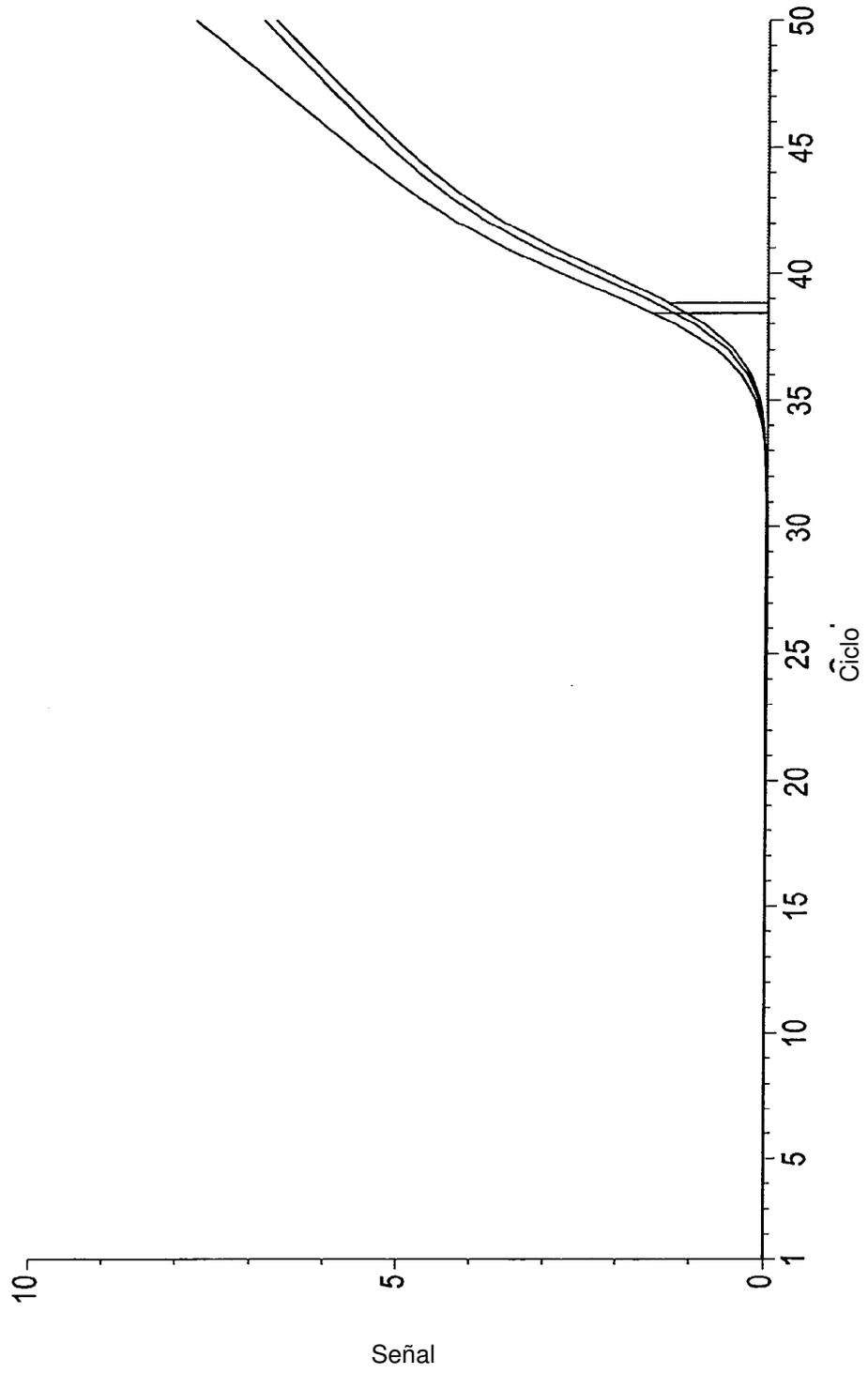


Fig. 2d

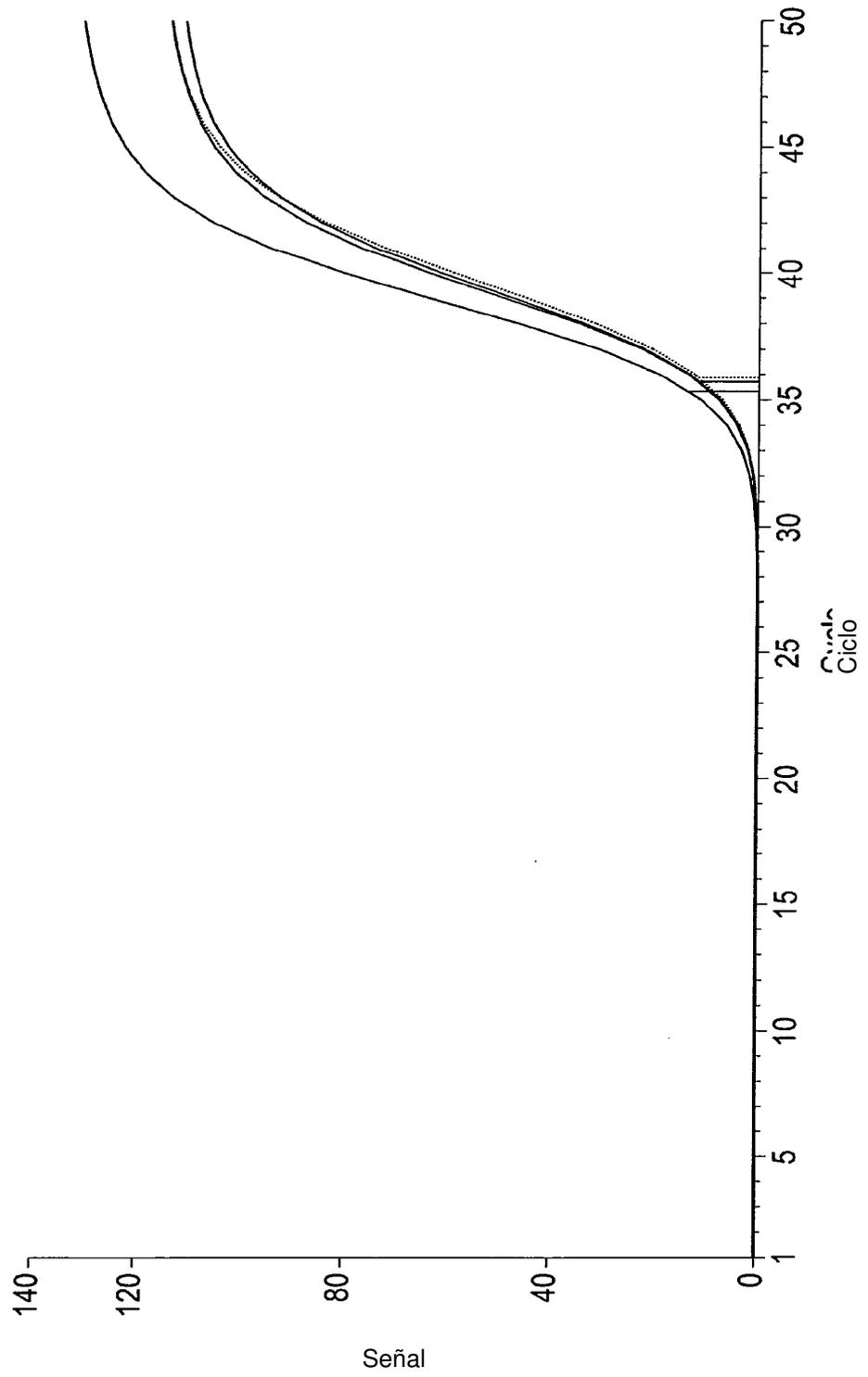


Fig. 2e

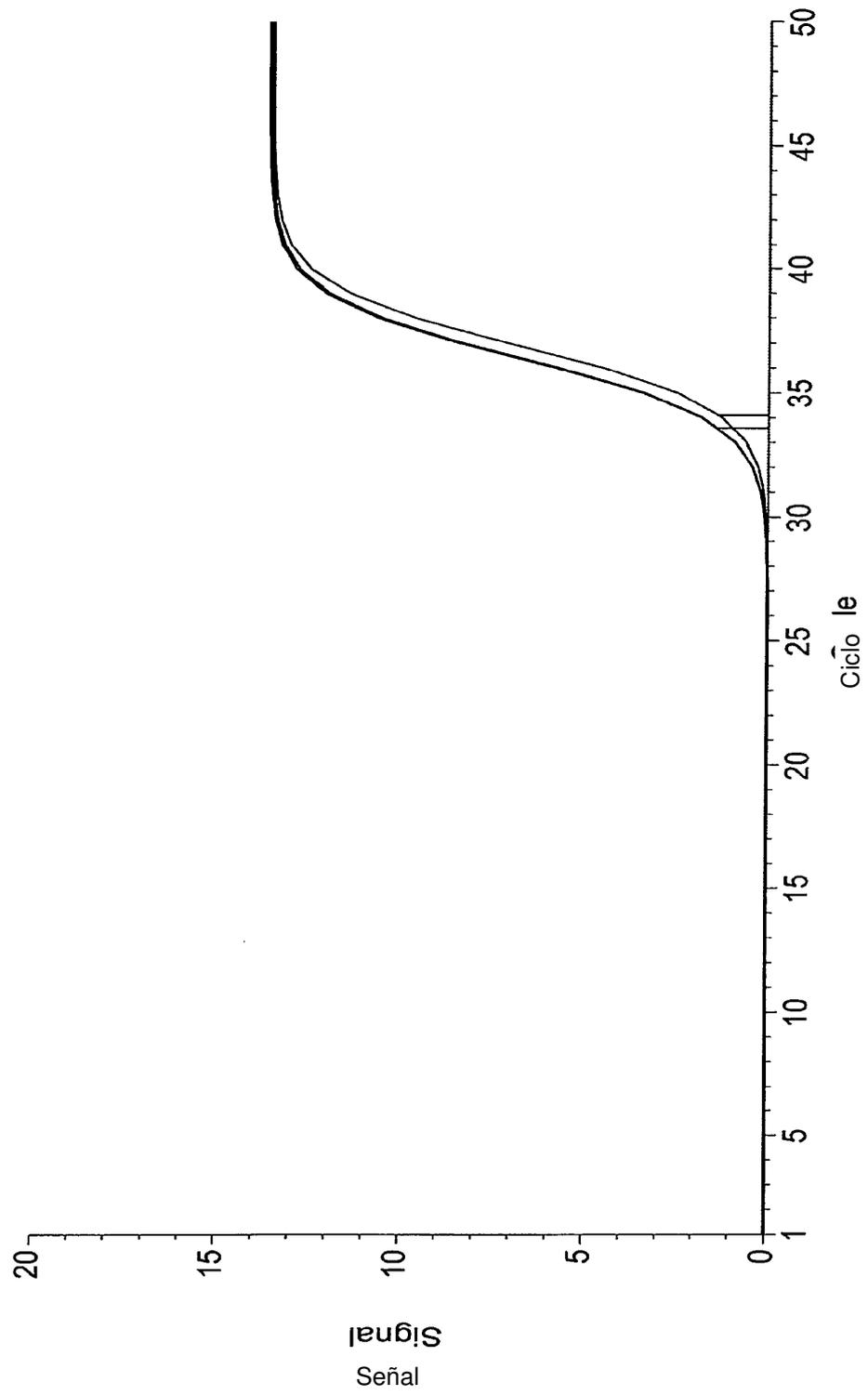


Fig. 2f

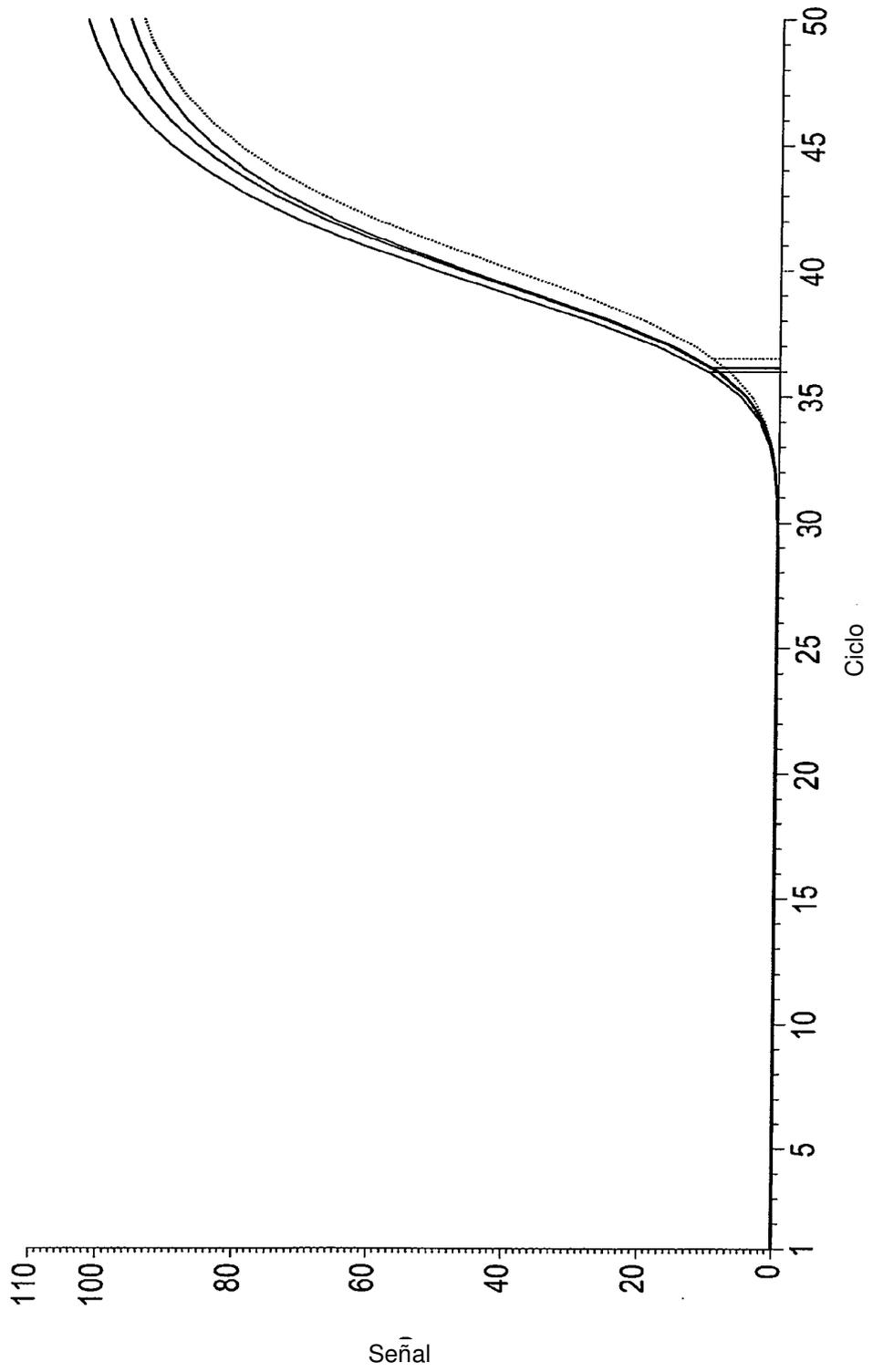
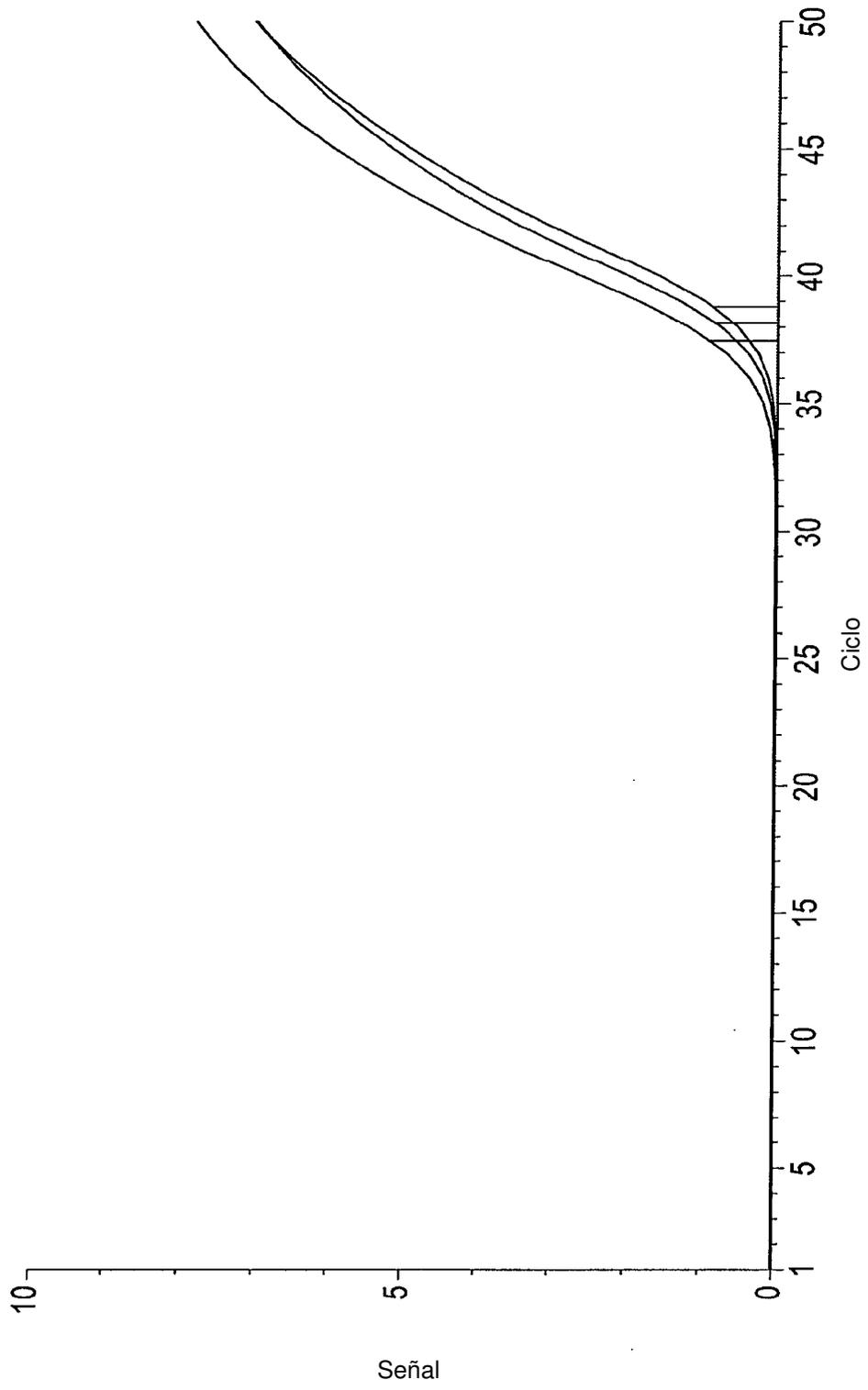
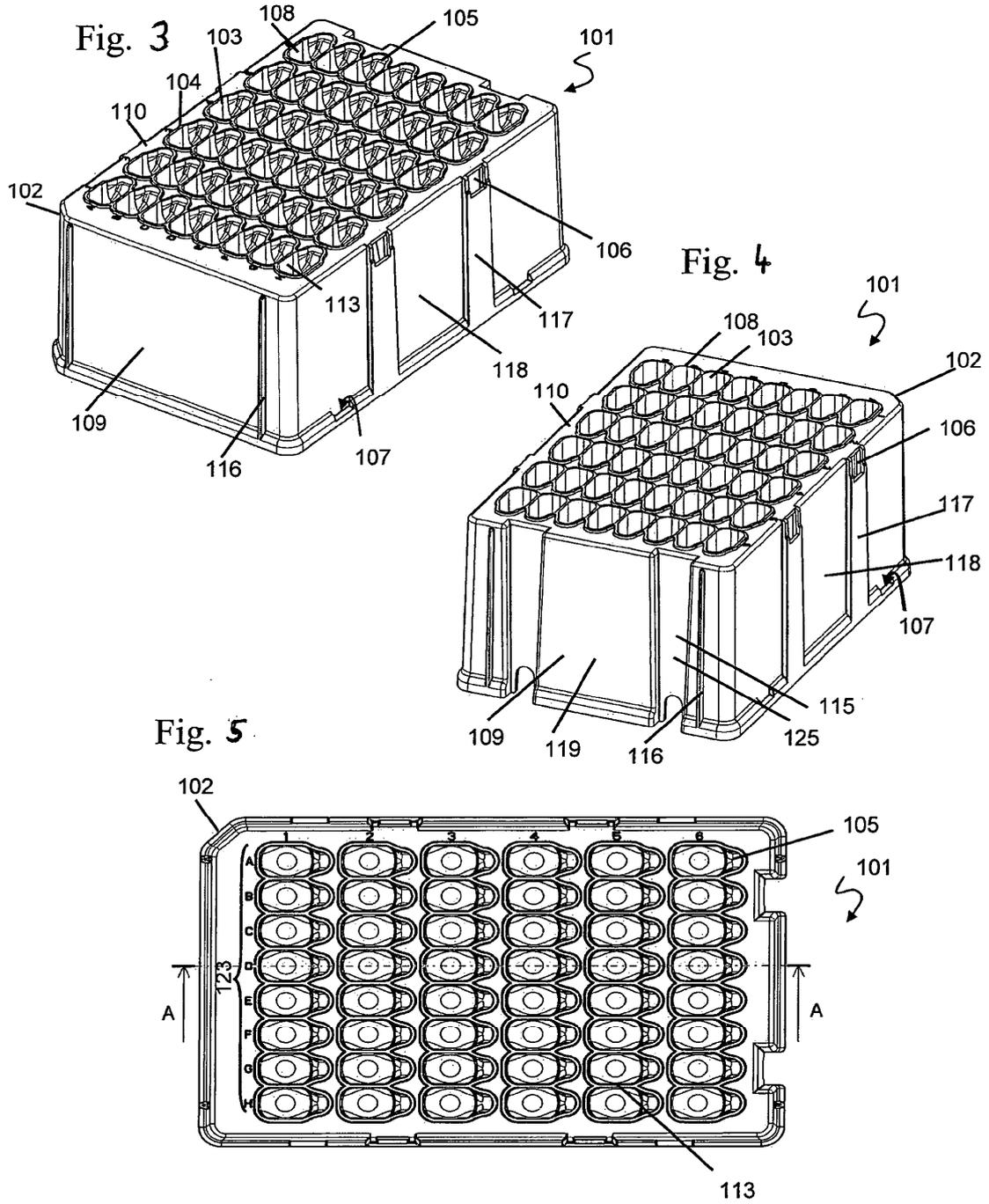


Fig. 2g





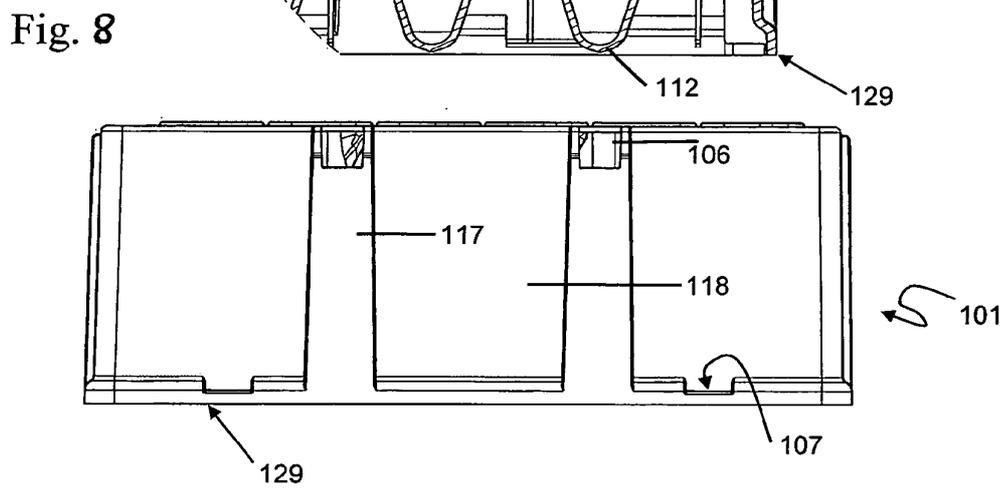
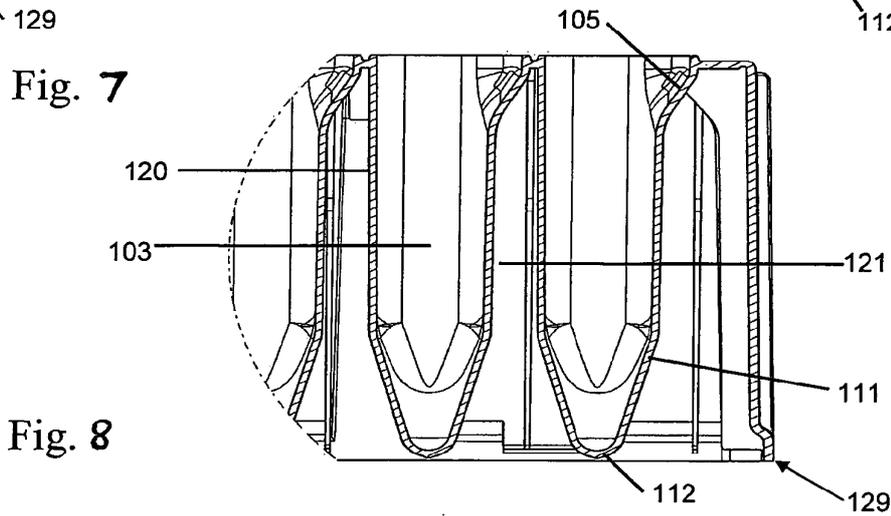
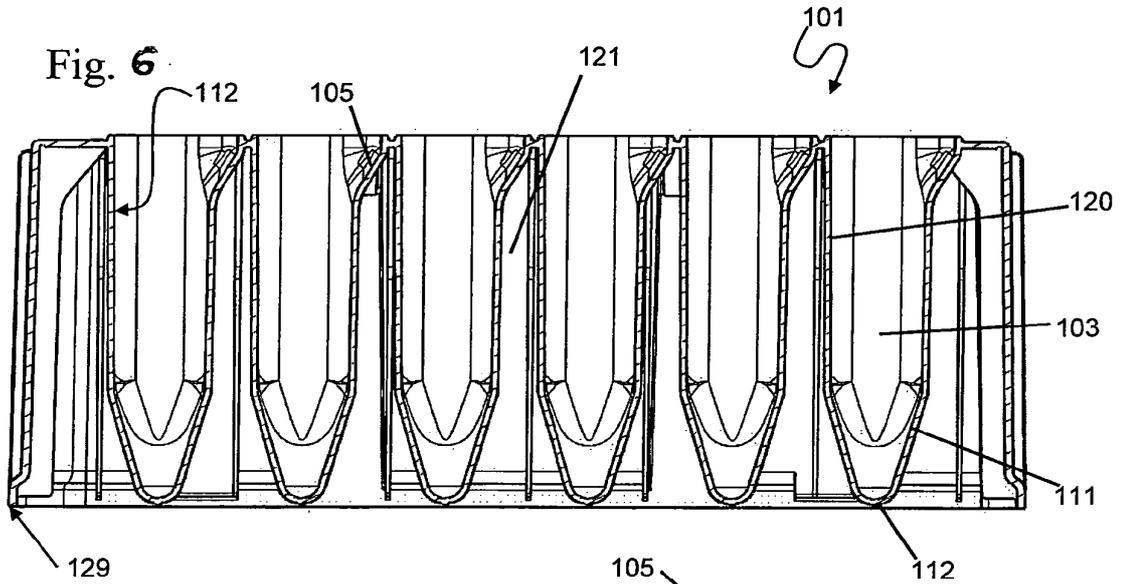
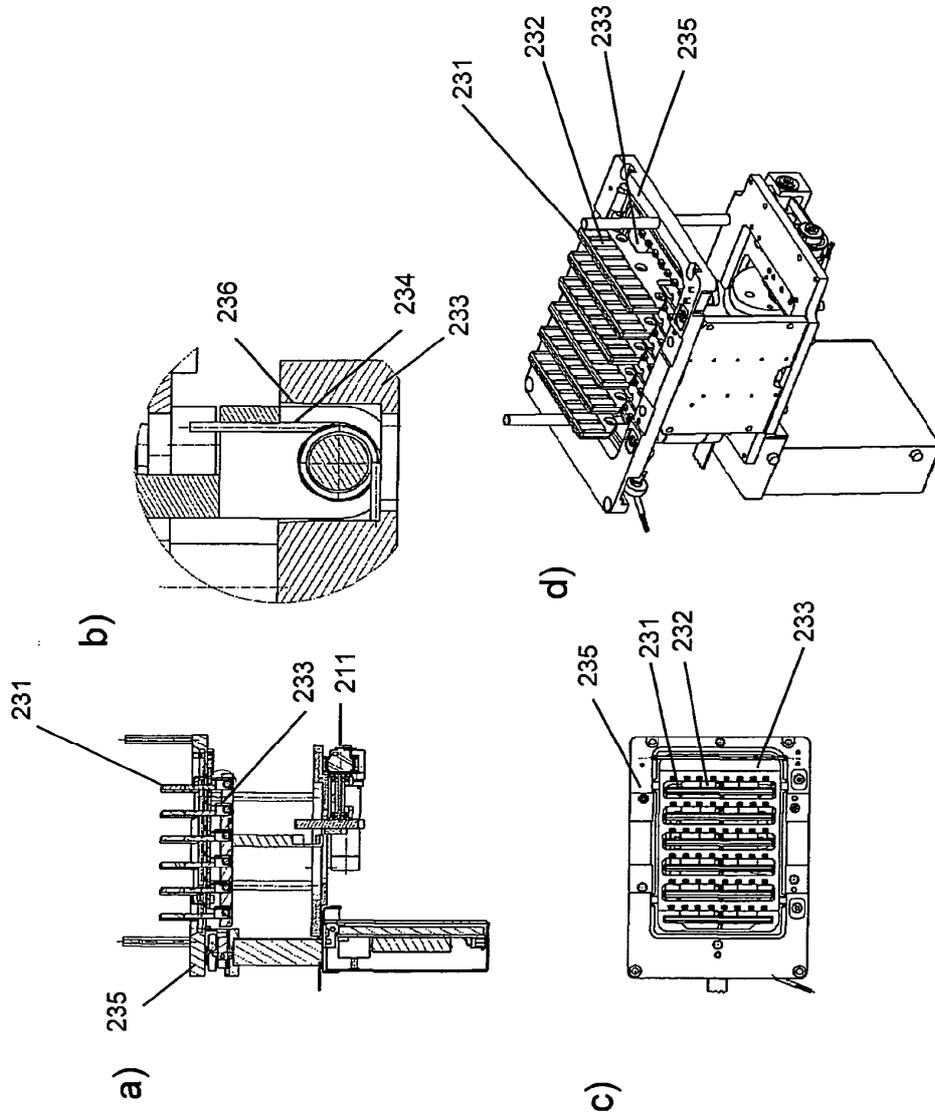


Fig. 9



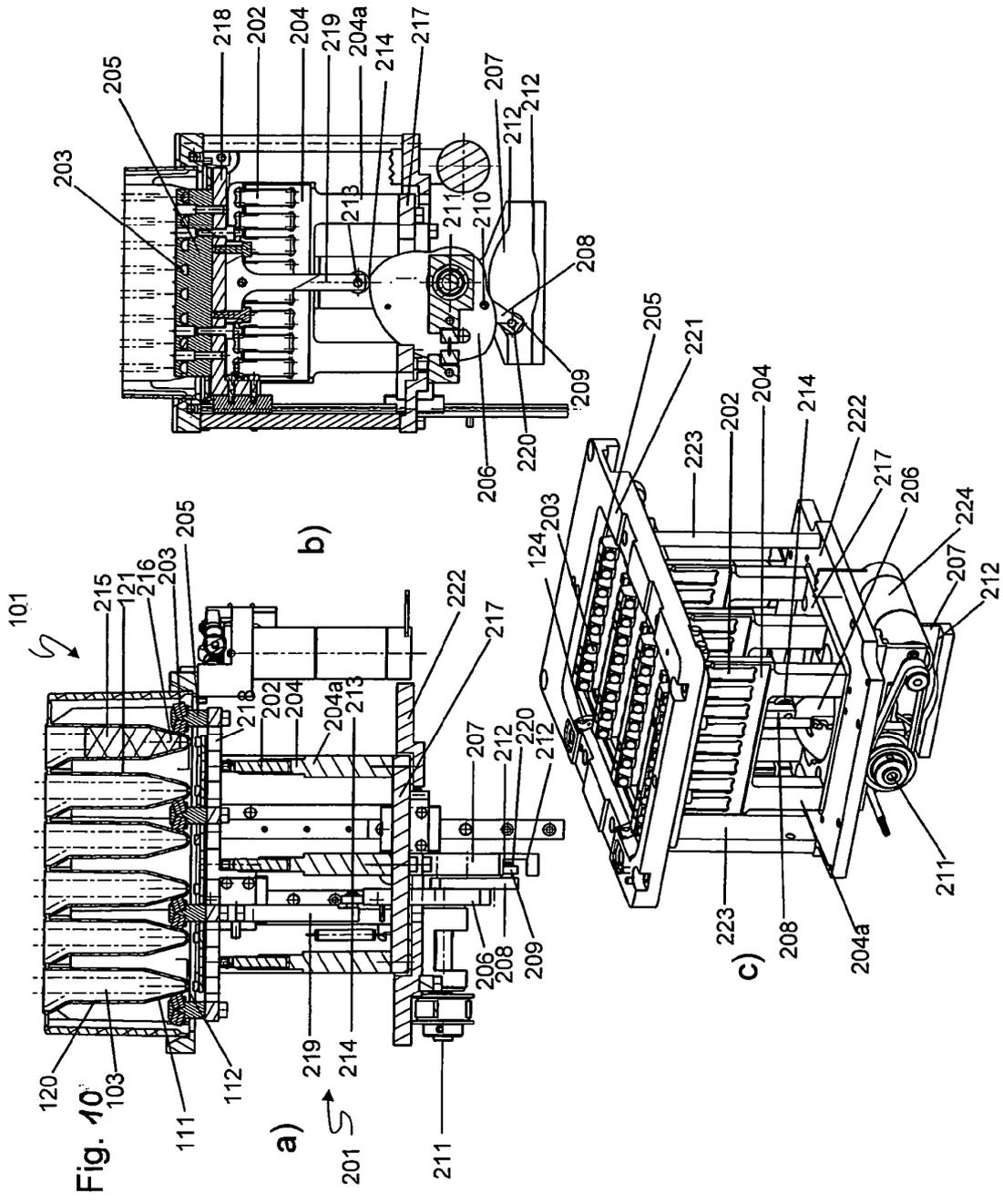
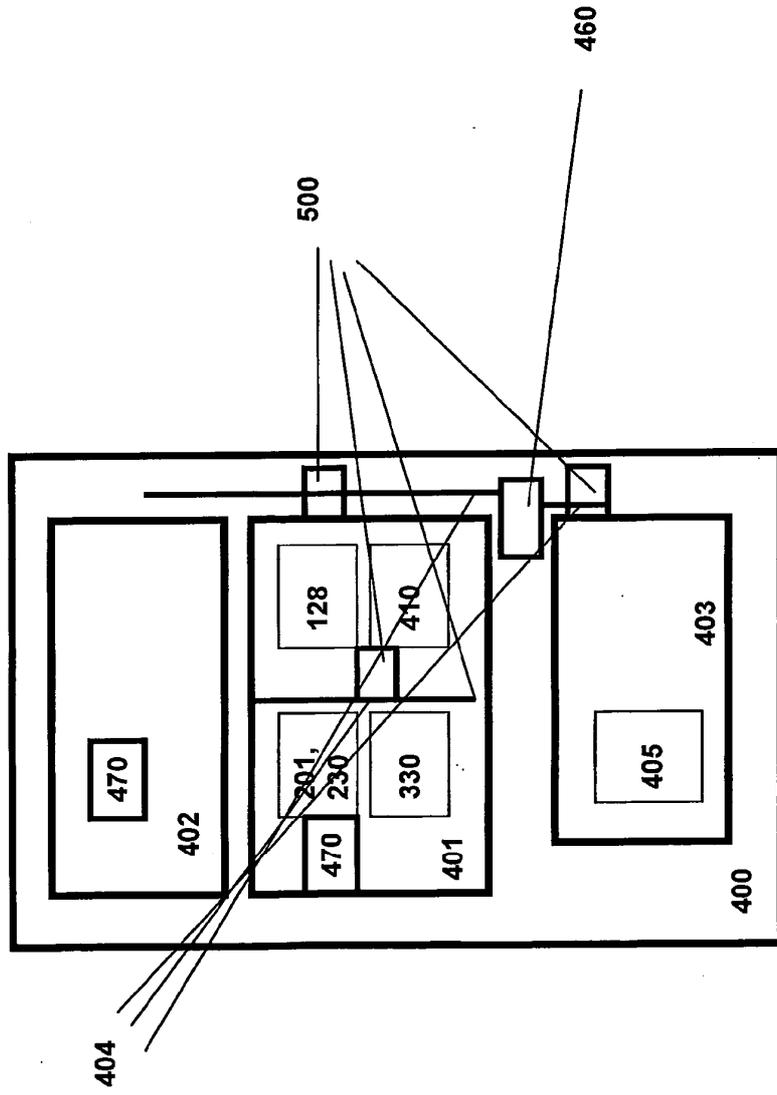


Fig. 11



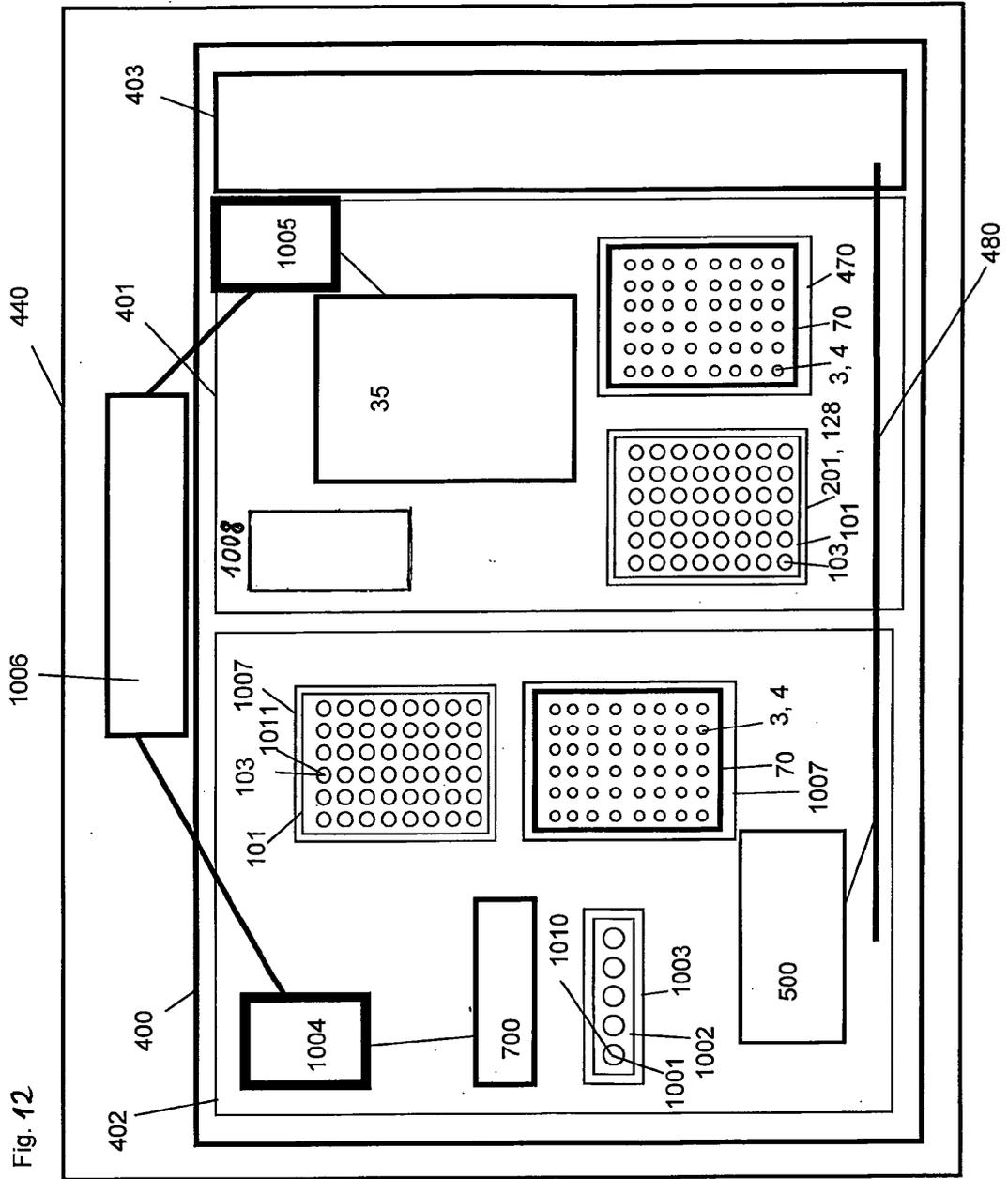


Fig. 13

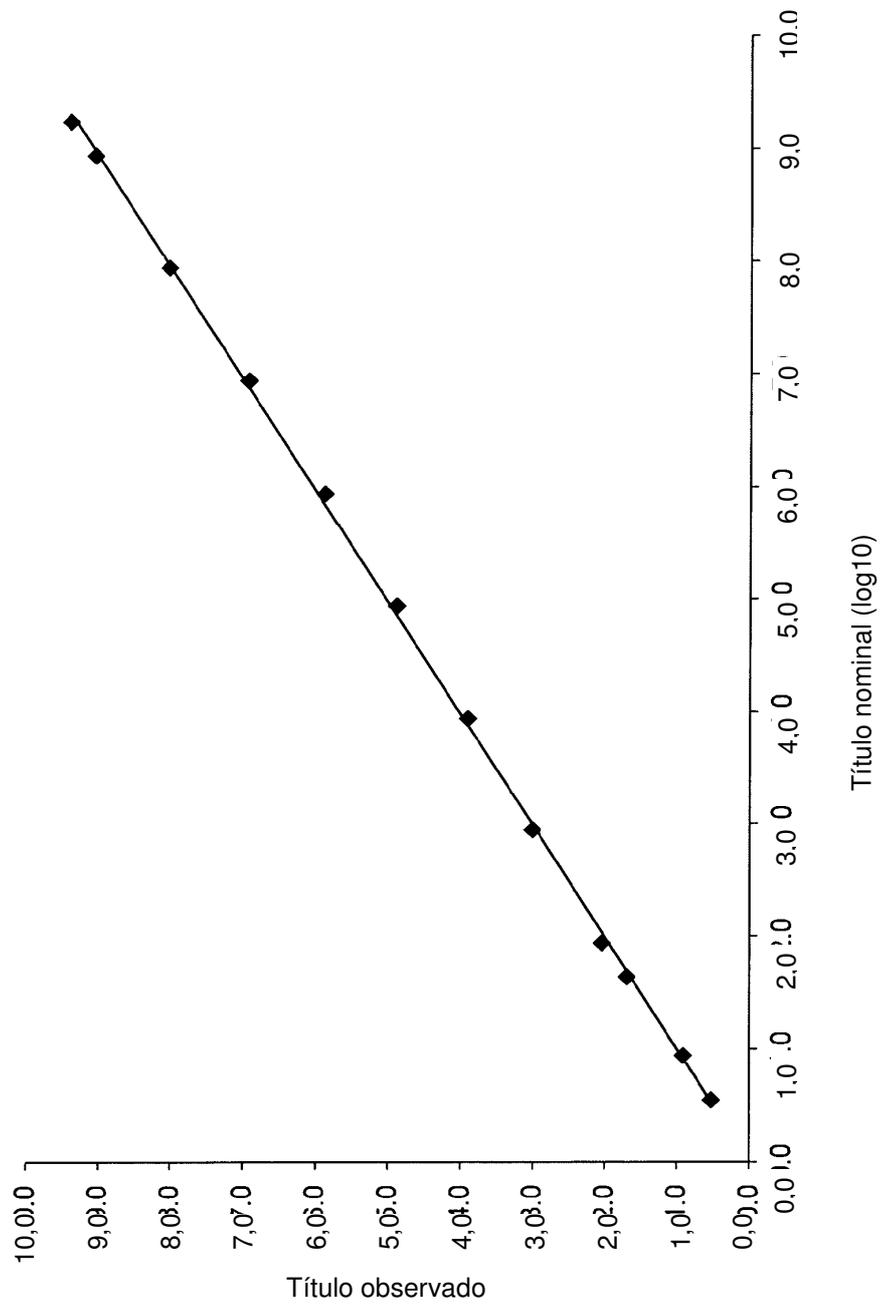


Fig. 14

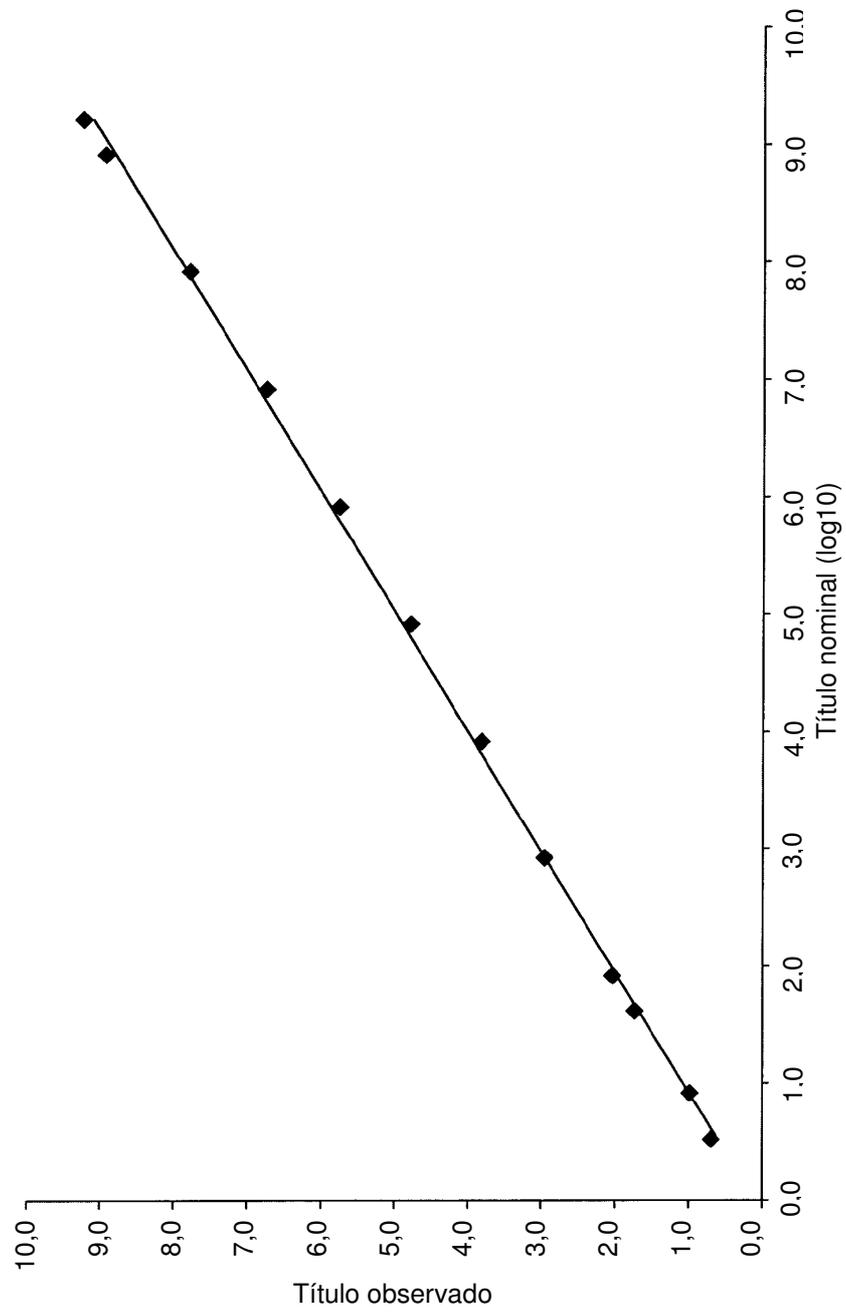


Fig. 15

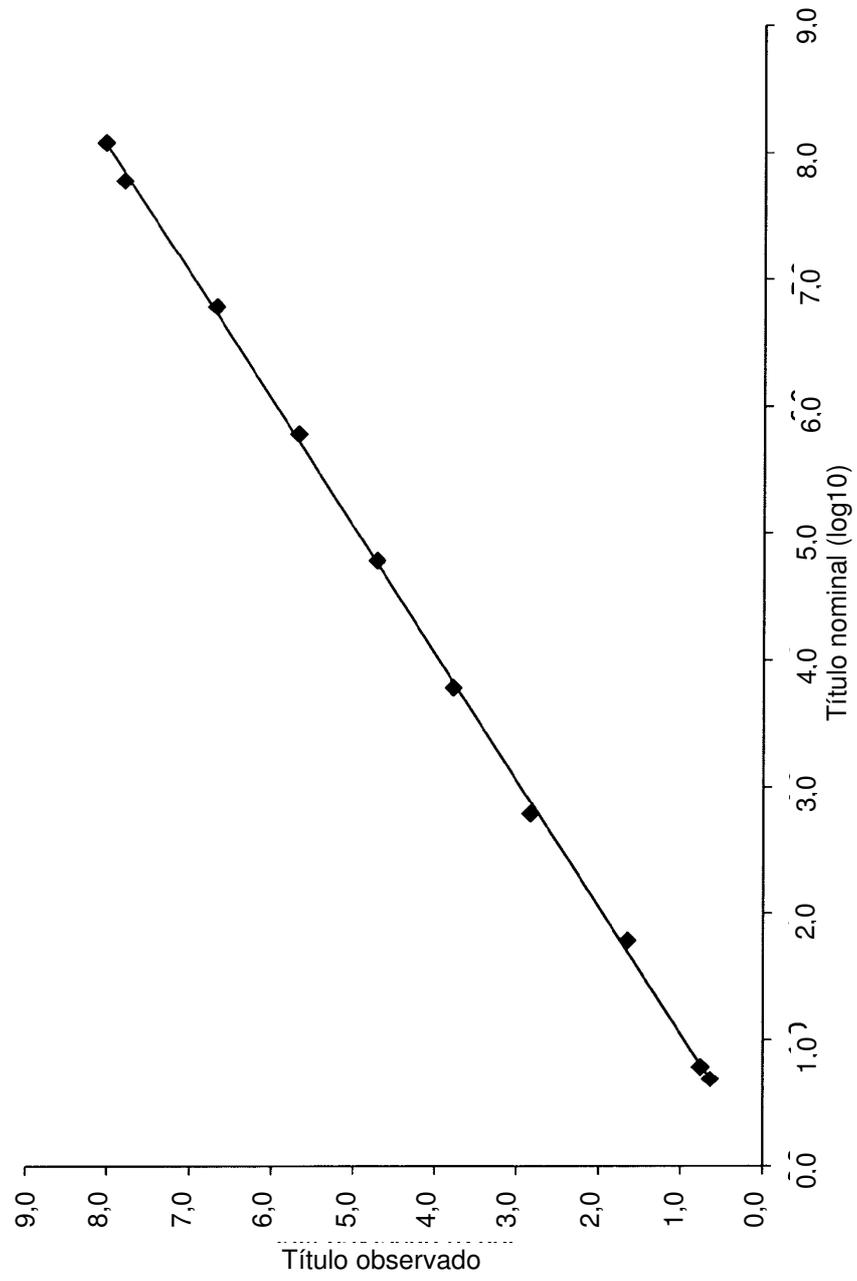


Fig. 16

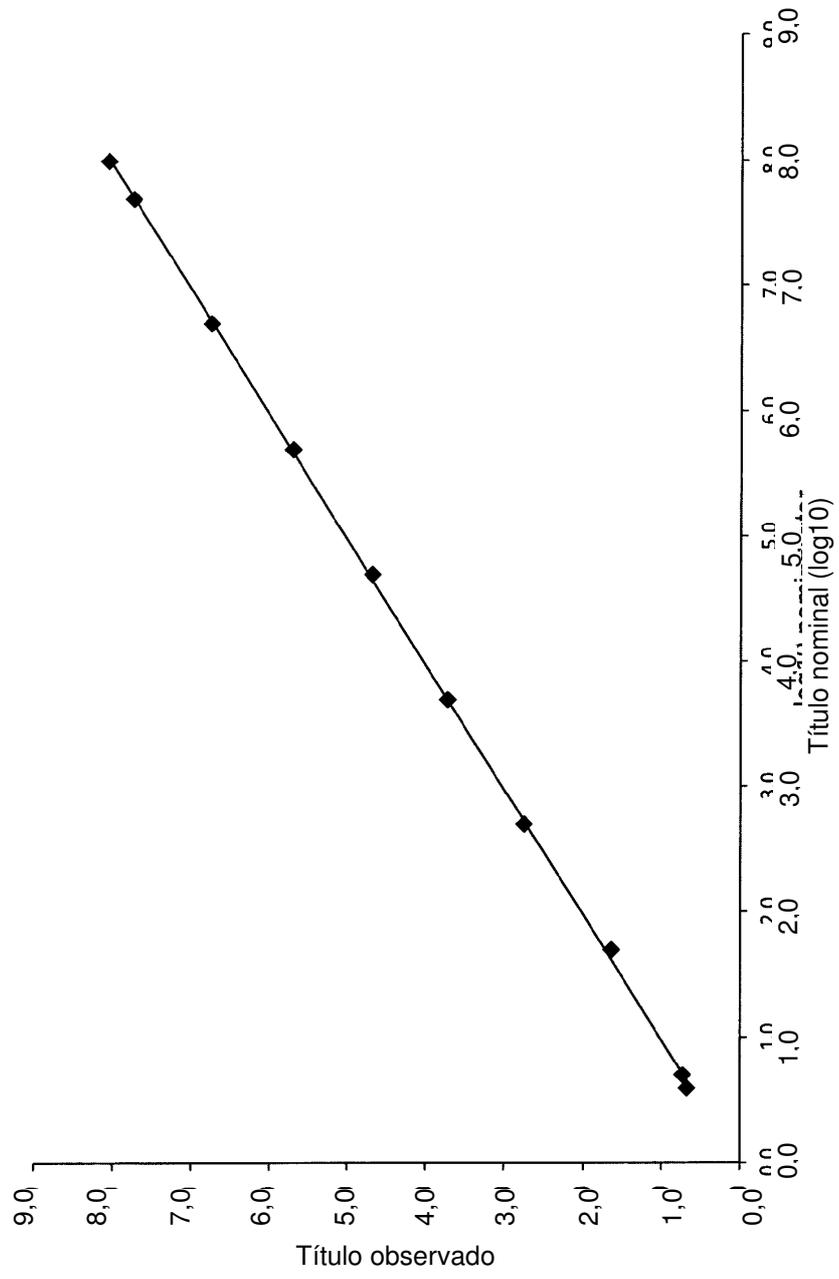
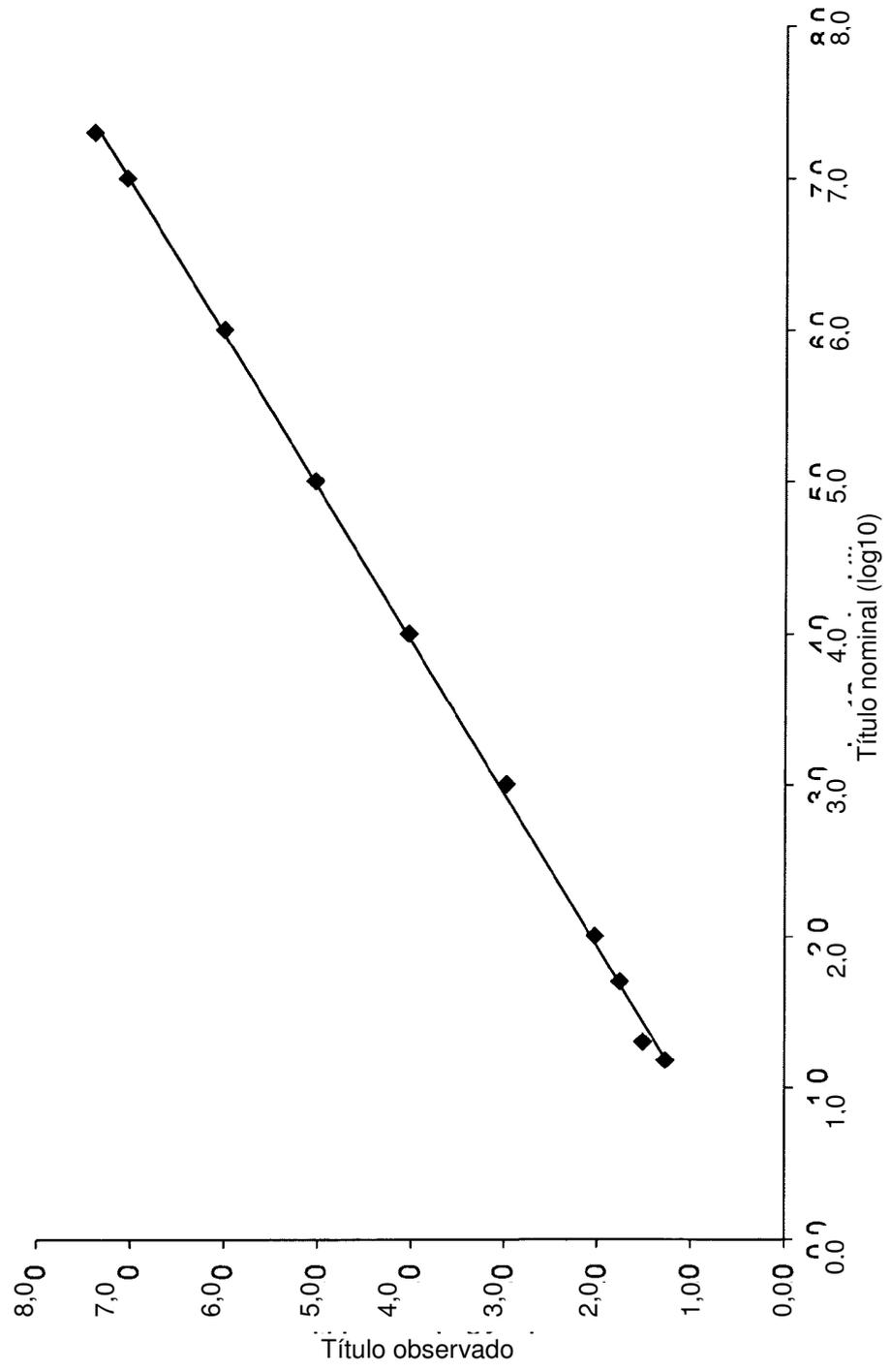


Fig. 17



LISTADO DE SECUENCIAS

5	<110> Roche Diagnostics F. HOFFMANN-LA ROCHE AG	
	<120> Ácidos nucleicos de control para múltiples parámetros	
	<130> 26554 EP1	
10	<160> 76	
	<170> PatentIn versión 3.5	
15	<210> 1	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Cebador/Sonda	
	<400> 1	
25	agtgggggga catcaagcag ccatgcaaa	29
	<210> 2	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Cebador/Sonda	
	<400> 2	
35	agtgggggga catcaagcag ccatgcaaat	30
	<210> 3	
	<211> 23	
40	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador/Sonda	
45	<400> 3	
	gctttcagcc cagaagtaat acc	23
50	<210> 4	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
55	<220>	
	<223> Cebador/Sonda	
	<400> 4	
60	ggacacatca agcagccatg caaat	25
	<210> 5	
	<211> 20	
	<212> ADN	

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador/Sonda	
5	<400> 5	
	agagaaccaa ggggaagtga	20
10	<210> 6	
	<211> 28	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Cebador/Sonda	
	<400> 6	
20	ataatccacc tatccagta ggagaaat	28
	<210> 7	
	<211> 29	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador/Sonda	
30	<400> 7	
	agtgggggga caccaggcag caatgcaaa	29
	<210> 8	
35	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
40	<223> Cebador/Sonda	
	<400> 8	
	catagcagga actactagta	20
45	<210> 9	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Cebador/Sonda	
	<400> 9	
55	ggtactagta gttcctgcta tgtcacttcc	30
	<210> 10	
	<211> 25	
60	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador/Sonda	

	<400> 10	
	ctatgtcact tccccttggt tctct	25
5	<210> 11 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Cebador/Sonda	
15	<400> 11	
	ggtactagta gttcctgcta taccacttcc	30
20	<210> 12 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Cebador/Sonda	
	<400> 12	
	tccttgcctt atgtccagaa	20
30	<210> 13 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Cebador/Sonda	
	<400> 13	
40	tttggtcctt gtcttatgtc cagaatgc	28
45	<210> 14 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Cebador/Sonda	
	<400> 14	
	tactagtagt tcctgctatg tcaacttcc	28
55	<210> 15 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Cebador/Sonda	
	<400> 15	

	tgtgttatga tgggttttaa atc	23
	<210> 16	
	<211> 20	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador/Sonda	
10	<400> 16	
	actctaaagg gttcctttgg	20
	<210> 17	
	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Cebador/Sonda	
	<400> 17	
25	tctgcagctt cctcattgat ggtatctttt aac	33
	<210> 18	
	<211> 29	
	<212> ADN	
30	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador/Sonda	
35	<400> 18	
	tcagcattat cagaaggagc caccccaca	29
	<210> 19	
40	<211> 32	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
45	<223> Cebador/Sonda	
	<400> 19	
	tctgcagctt cctcattgag gtatctttta ac	32
50	<210> 20	
	<211> 41	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
55	<220>	
	<223> Cebador/Sonda	
	<400> 20	
60	atcctgggat taaataaaat agtaagaatg tatagcccta c	41
	<210> 21	

	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Cebador/Sonda	
	<400> 21	
10	accatcaatg agggaagctg cagaatggg	29
	<210> 22	
	<211> 26	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador/Sonda	
20	<400> 22	
	tgactctggt aactagagat ccctca	26
	<210> 23	
25	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> Cebador/Sonda	
	<400> 23	
	tgttcaaccc tggtatctag agatccctca	30
35	<210> 24	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Cebador/Sonda	
	<400> 24	
45	ggctaactag ggaccactg	20
	<210> 25	
	<211> 18	
50	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador/Sonda	
55	<400> 25	
	actaggaac ccactgct	18
60	<210> 26	
	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	

	<220>		
	<223> Cebador/Sonda		
	<400> 26		
5	tcagcaagcc gagtcctgcg tcgaga		26
	<210> 27		
	<211> 27		
10	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador/Sonda		
15	<400> 27		
	ccgctaagcc gagccctttg cgtcgga		27
20	<210> 28		
	<211> 17		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
25	<220>		
	<223> Cebador/Sonda		
	<400> 28		
30	ggtctgaggg atctcta		17
	<210> 29		
	<211> 24		
	<212> ADN		
35	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador/Sonda		
40	<400> 29		
	ctgctagaga ttttccacac tgac		24
45	<210> 30		
	<211> 23		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
50	<223> Cebador/Sonda		
	<400> 30		
	ggctccacgc ttgcttgctt aaa		23
55	<210> 31		
	<211> 18		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
60	<220>		
	<223> Cebador/Sonda		
	<400> 31		

	ggctccacgc ttgcttgc	18
5	<210> 32 <211> 31 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Cebador/Sonda	
	<400> 32	
15	ttcccaaagc aagaagggtc ctaacagacc a	31
20	<210> 33 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Cebador/Sonda	
	<400> 33	
30	tctctagcag tggcgcccga acagggac	28
35	<210> 34 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador/Sonda	
	<400> 34	
40	accagagtca cacaacagac gggcacacac tact	34
45	<210> 35 <211> 31 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Cebador/Sonda	
	<400> 35	
55	tcctagtcgc cgcttggtca ttcggtgttc a	31
60	<210> 36 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador/Sonda	
	<400> 36	
	catgcaactt tttcacctct gccta	25
	<210> 37	

ES 2 640 522 T3

	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Cebador/Sonda	
	<400> 37	
10	aactccacag tagctccaaa ttcttta	27
	<210> 38	
	<211> 33	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador/Sonda	
20	<400> 38	
	ccaagctgtg ccttgggtgg ctttggggca tgg	33
	<210> 39	
25	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> Cebador/Sonda	
	<400> 39	
	gggattcctg taacaacaag tca	23
35	<210> 40	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Cebador/Sonda	
	<400> 40	
45	tcttccccag aacaataaga acac	24
	<210> 41	
	<211> 26	
50	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador/Sonda	
55	<400> 41	
	ggccttcaga gttctatagt gctatg	26
60	<210> 42	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	

	<220>		
	<223> Cebador/Sonda		
	<400> 42		
5		ttgatagcaa tccgctatcg actaa	25
	<210> 43		
	<211> 28		
10	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador/Sonda		
15		<400> 43	
		gcttcgatac tcagtcacat cggtataa	28
20	<210> 44		
	<211> 27		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
25	<220>		
	<223> Cebador/Sonda		
	<400> 44		
30		tctctcgcca tctcctaccg cattggc	27
	<210> 45		
	<211> 269		
	<212> ADN		
35	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Ácido nucleico de control interno		
40	<400> 45		
		aattcaagct tagatctagc tttgcctgct tgatagcaat cggctatcga ctaatgactg	60
		tcctggcggg ctctcgccat ctctaccgc attggctcat aggtaagctc gctgtcacc	120
		agtacggagg tgccagtaga ttattagaga cagtcgcaa tcgatcgta taccgagatg	180
		actgagtatc gaagctacat tgtagccgca cataggacca cccatcttca tgttgaaaca	240
		tgaggattac ccatgtggat ccaagcttg	269
45	<210> 46		
	<211> 235		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
50	<223> Ácido nucleico de control interno		
	<400> 46		

ES 2 640 522 T3

gggctgcagg tgcactctag attctaagaa tttgatgggc tttttctact aattactatt 60
 agtatattgc catctttaac acttagaccg aagtgtgctg aagttccagt ggccggccca 120
 gacctgggaa gttgcaagga cttaaacgaa tgcaagcgat catatcttga aaaattataa 180
 ccagaggatc gatgaaaaaa atttcttaga gctttggatc cccgggagag ctccc 235

5 <210> 47
 <211> 350
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Ácido nucleico de control interno

<400> 47

cgactctaga tgaagggagc cttagaacgg ggctgcgcta gctggcatca aagtccgtca 60
 gagctcaacc ctccaacgag gattcctgaa tactcgaaag tcagtgtgca gttactaaca 120
 acagctgctc gacctcgggg tctcgaacaa tccatacctg ctatcgctgc cttcagacat 180
 acggatgggc taggaggcaa gagctacctg tctcaacgaa ctatcggagt gggacccgat 240
 gaagctgtca gcgccacttc cggcggtaag gctttaaacc gcgccgccc gttatcacgc 300
 gcggggagca cagcgcggac tgacgtgctg ggaagcaccg gttaaggatc 350

15 <210> 48
 <211> 470
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Ácido nucleico de control interno

<400> 48

cgactctaga aactgggtag taactgcggg ggcgaatgat gcaggcttca gaaattaaac 60
 tcaatagtat ccggtgtctc aatctttttc gggccaggcg gcggtggacg acagacaatt 120
 ttacgatttt ggttccggtc acaaccgcgc catacatgtc aagaatgaag tgggcgaacg 180
 ctagaaaact gacgccagca attaagtgag tcggggcgtg gtgactcca cgtaaaaagc 240
 ccctaccccg caccgttacg aagtatcaaa acgggacgcg cacgaaccga cgattggtac 300
 tgtataagcg gcccgacgaa ctcaaaatcc caagtgaatc tatgaaatct acatcgcggt 360
 tataatctac ggggtgtaaa cggatgagaa ttggccaaac ggaggcacac acgcgtgcaa 420
 25 tgcgccgacc ctgagaaaag tatcatgtgc gtcggccaca ggatccccgg 470

30 <210> 49
 <211> 350
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 640 522 T3

<223> Ácido nucleico de control interno

<400> 49

cgactctaga tgaagggagc cttagaacgg ggctgcgcta gctggcatca aagtccgtca 60
gagctcaacc ctccaacgag gattcctgaa tactcgaaag tcagtgtgca gttactaaca 120
acagctgctc gacctcgggg tctcgaacaa tccatacctg ctatcgctgc cttcagacat 180
acggatgggc taggaggcaa gagctacctg tctcaacgaa ctatcggagt gggacccgat 240
gaagctgtca gcgccacttc cggcggtaag gctttaaacc gcgccgccg gttatcacgc 300
gcggggagca cagcgcggac tgacgtgctg ggaagcaccg gttaaggatc 350

5

<210> 50

<211> 25

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador/Sonda

15 <400> 50

acaaccgctc catacatgtc aagaa 25

<210> 51

20 <211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Cebador/Sonda

<400> 51

gtcgggccgc ttatacagta ccaa 24

30

<210> 52

<211> 32

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Cebador/Sonda

<400> 52

40

gccagcaatt aagtgagtcg gggcgtggtg ac 32

<210> 53

45 <211> 52

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador/Sonda

50

<400> 53

caacaaaaca gcatattgac acctgggagt agactaggag atcttctgct ct 52

ES 2 640 522 T3

5	<210> 54 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador/Sonda	
	<400> 54	
10	tctcctagtc tttcccaggt gtcaatatgc	30
	<210> 55 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Cebador/Sonda	
	<400> 55	
20	ctgccccagg aggactgggt taacaaa	27
25	<210> 56 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador/Sonda	
	<400> 56	
30	tcctagtcta tcccaggtgt caa	23
35	<210> 57 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador/Sonda	
	<400> 57	
40	gtaagccctc agaaccgtct cggaa	25
45	<210> 58 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador/Sonda	
	<400> 58	
50	ggactagagg ttagaggaga ccccgagg	28
55	<210> 59 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Cebador/Sonda	
	<400> 59	
65		

	<220>		
	<223> Cebador/Sonda		
	<400> 59		
5		aaggactaga ggtagagga gaccccg	28
	<210> 60		
	<211> 21		
10	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador/Sonda		
15		<400> 60	
		aaaccactc tatgtccggt c	21
20	<210> 61		
	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
25	<220>		
	<223> Cebador/Sonda		
	<400> 61		
30		gtacgccgga attgccgga a	21
	<210> 62		
	<211> 21		
	<212> ADN		
35	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador/Sonda		
40	<400> 62		
		cctcaaagaa aaaccaaaag a	21
	<210> 63		
45	<211> 26		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
50	<223> Cebador/Sonda		
	<400> 63		
		gcagaaagcg tctagccatg gcgta	26
55	<210> 64		
	<211> 24		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
60	<220>		
	<223> Cebador/Sonda		
	<400> 64		

	gcagaaagcg tctagccatg gcgt	24
5	<210> 65 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Cebador/Sonda <400> 65	
15	tggcgtctcc cacgcggctg g	21
20	<210> 66 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Cebador/Sonda <400> 66	
30	ctttccccag gacctgccgg t	21
35	<210> 67 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador/Sonda <400> 67	
40	gcaagcacc tataggcagt accac	25
45	<210> 68 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador/Sonda <400> 68	
50	ctcgcaagca ccctatcagg cagt	24
55	<210> 69 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Cebador/Sonda <400> 69	
	gcaagcacc tatcaggcag taccacaa	28
	<210> 70	

ES 2 640 522 T3

	<211> 27 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
5	<220> <223> Cebador/Sonda <400> 70	
10	gcaagcaccc tatkaggcag taccaca	27
	<210> 71 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Cebador/Sonda	
20	<400> 71 ttgccggaaa gactgggtcc tttc	24
	<210> 72 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Cebador/Sonda	
30	<400> 72 ttgccggaaa gactgggtcc tttc	24
35	<210> 73 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Cebador/Sonda	
45	<400> 73 ccagcccatc ccgaaagatc ggcg	24
	<210> 74 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Cebador/Sonda	
55	<400> 74 tgtccggtca tttgggcg	18
60	<210> 75 <211> 33 <212> ADN <213> Secuencia artificial	

