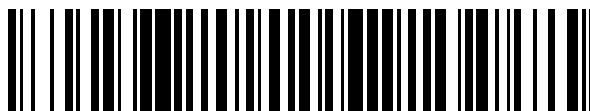


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 617 258**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

C12Q 1/70 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA
TRAS OPOSICIÓN

T5

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.07.2011 PCT/EP2011/062958**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.02.2012 WO12013733**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.07.2011 E 11735891 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **02.08.2023 EP 2598654**

54 Título: **Preparación de muestras genéricas**

30 Prioridad:

07.09.2010 EP 10175533
29.07.2010 US 368970 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente modificada:
15.11.2023

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

EICKHOFF, MEIKE;
RUSSMANN, EBERHARD;
ZIMMERMANN, DIRK;
WÖLFELSCHNEIDER, ANDREAS;
NEWHOUSE, CHRISTOPHER;
SMITH, EDWARD S. y
BOYLE, SEAN F.

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 617 258 T5

DESCRIPCIÓN

Preparación de muestras genéricas

5 Sector de la invención

La presente invención, pertenece al sector de los diagnósticos in vitro. Dentro de este sector, ésta se refiere, de una forma particular, a la preparación de ácidos nucleicos, para propósitos de diagnóstico. De una forma más precisa, la presente invención, proporciona un procedimiento para aislar, de una forma simultánea, un primer y un segundo ácido nucleicos, a partir de una pluralidad de diferentes tipos de muestras de fluidos.

Antecedentes y trasfondo de la invención

El aislamiento de materiales biológicos, tales como el consistente en los ácidos nucleicos o proteínas, procedentes de mezclas biológicas, tales como, por ejemplo, muestras clínicas, han venido siendo de una importancia considerable, para los propósitos de diagnóstico.

Los ejemplos para las aplicaciones de diagnóstico, de muestras de ácidos nucleicos, comprenden la preparación y la subsecuente detección de virus, tales como los consistentes en el Virus del Papiloma Humano (HPV) - [de sus iniciales, en idioma inglés, correspondientes a Human Papilloma Virus] - , en el Virus del Nilo Occidental (WNV - [de sus iniciales, en idioma inglés, correspondientes a West Nile Virus] -) o en la exploración de rastreo, de rutina, de las donaciones de sangre, para la presencia del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV - [de sus iniciales, en idioma inglés, correspondientes a Human Immunodeficiency Virus (HIV)], de los virus de la Hepatitis-B (HBV), y/o de la Hepatitis C Virus (HCV). De una forma adicional, tales tipos de técnicas de amplificación, son apropiadas para dianas bacterianas, tales como las consistentes en las microbacterias o Chlamydia trachomatis y Neisseria gonorrhoeae, o el análisis de marcadores oncológicos.

Se han venido desarrollando numerosos y diferentes procedimientos, en el arte de la técnica especializada, tales como, por ejemplo, la desnaturalización, la precipitación y la eliminación de componentes no deseados, en una muestra, con la subsecuente precipitación y aislamiento del analito en cuestión (tal como, por ejemplo, la precipitación, basada en alcohol, de ácido nucleico). Otra propuesta de procedimiento es la consistente en la unión del respectivo material biológico, a un material de soporte sólido, el cual puede proporcionarse, por ejemplo, en forma de columnas cromatográficas. Para los propósitos de diagnóstico, y especialmente, para la cuestión de aislamientos automatizados de materiales biológicos, para el subsiguiente análisis de alto rendimiento o de rendimiento medio, se utilizan, a menudo, partículas de enlace o unión. Tales tipos de partículas, pueden tener superficies funcionalizadas, es decir que, éstas, se encuentran recubiertas con anticuerpos, pueden tener superficies no modificadas, sondas de captura de ácido nucleico, o por el estilo, con objeto de unir o enlazar el analito deseado. De una forma alternativa, éstas pueden tener superficies no modificadas, tales como las consistentes en superficies de vidrio, de una forma particular, para el aislamiento de ácidos nucleicos.

Sin embargo, no obstante, los ácidos nucleicos diana a ser analizados para propósitos de diagnóstico, pueden encontrarse presentes, en una gran variedad de diferentes fuentes. En la práctica, el procedimiento de preparación de muestras para ácidos nucleicos, en diferentes fuentes, se adapta, de una forma usual, a

1. el tipo de muestra de fluido
2. el tipo de ácido nucleico.

Deben también tenerse en cuenta otros criterios, cuando se procede al aislamiento de diferentes ácidos nucleicos. El arte anterior de la técnica especializada, se de aislamiento, aborda esta diversidad, procediendo a proporcionar diversos procedimientos de preparación, para estos diferentes tipos de muestras.

Así, por ejemplo, Reischl *et al.* (http://www.roche-applied-science.com/wcsstore/RASCatalogAssetStore/Articles/BIOCHEMICA_2_05_p12-15.pdf) y Kirchgesser *et al.* (http://www.roche-applied-science.com/wcsstore/RASCatalogAssetStore/Articles/BIOCHEMICA_4_03_p12-14.pdf), da a conocer tales tipos de protocolos de aislamientos optimizados individuales, utilizados en el sistema "Roche MagNA Pure Compact System"

El test de ensayo "cobas® TaqScreen MPX Test", para su uso en el sistema "cobas® s201 System" de Roche Molecular Systems, tal y como se encuentra documentado en el prospecto adjunto de fecha 11 de Noviembre del 2009, aborda el tema de la exploración de rastreo de muestras de sangre agrupadas, en las cuales, la incidencia de los virus, HBV, HCV, y HIV, es de una importancia relevante, para asegurar la no infectividad de la sangre designada, por ejemplo, a utilizarse en transfusiones, mientras que, Meng *et al.* (2001, J.Clin.Microbiol., vol. 39 (8), pp. 2937 - 2945) describen un ensayo comparable, el cual involucra un mayor grado de intervención manual.

El documento de patente internacional WO 01/37 291, se refiere a la producción de unas partículas de vidrio, magnéticas, y a su uso para el aislamiento de ácidos nucleicos, procediendo a su unión a las superficies de vidrio de

las partículas, bajo unas condiciones caotrópicas.

5 Quan *et al.* (2008, Antivir.Res., vol. 79 (1), páginas 1 - 5), proporcionan una visión de conjunto de los procedimientos apropiados para una rápida diagnosis basada en la secuencia, de infección viral, incluyendo una evaluación de análisis de PCR "singleplex" versus "multiplex".

Watzinger *et al.* (2004, J.Clin.Microbiol., vol. 42 (11), páginas 5189 - 5198), describen un procedimiento de PCR a tiempo real, cuantitativo, para un panel de 16 dianas diferentes.

10 Nagy *et al.* (2005, Forensic Sci. Int., vol. 152 (1), páginas 13-22), da a conocer un procedimiento de purificación de DNA, automatizado, basado en perlas recubiertas de sílice, para muestras forense.

Mediante la presente invención, se proporciona un procedimiento mejorado para el aislamiento de por lo menos un primer y un segundo ácido nucleicos diana, procedentes de una pluralidad de diferentes muestras de fluidos.

15 Descripción de la invención

La presente invención, proporciona un procedimiento para aislar por lo menos un primer y un segundo ácido nucleico diana, a partir de una pluralidad de diferentes tipos de muestras de fluidos.

20 En un primer aspecto, la presente invención, se refiere a un procedimiento para aislar y determinar, de una forma simultánea, la presencia o la no presencia y/o la cantidad, de por lo menos un primer y un segundo ácido nucleico diana, seleccionado de entre bacterias, virus DNA y virus RNA, procedentes de una pluralidad de diferentes tipos de muestras de fluidos, comprendiendo, el citado procedimiento, las etapas automatizadas de

25 a. añadir un tampón de lisis, idéntico, el cual tiene un valor pH de 5,8, y el cual comprende un tiocianato de guanidinio 4 M, citrato de Na 50 mM, polidecanol al 5 % y DDT al 2 % p/v a los miembros de dicha pluralidad de diferentes tipos de muestras de fluidos, y así, de este modo, liberan muestras de ácido nucleico, a partir del entorno medioambiental celular y/o vírico, mediante el lisado de cápsidas víricas, potencialmente presentes en una pluralidad de diferentes tipos de muestras de fluidos, y combinar conjuntamente, partículas de vidrio magnéticas y la citada pluralidad de diferentes tipos de muestras de fluido, en un gran número de recipientes, correspondientes al número de muestras de fluido, durante un período de tiempo, y bajo unas condiciones suficientes, como para permitir que, los ácidos nucleicos los cuales comprenden los ácidos nucleicos diana, se inmovilicen, en las partículas de vidrio magnéticas.

30 b. aislar las partículas de vidrio magnéticas, del otro material presente en las muestras de fluido, en una estación de separación, la cual comprende uno o más imanes o magnetos,

35 c. purificar los ácidos nucleicos, en una estación de separación, mediante la separación de la muestra de fluido, de las partículas de vidrio magnéticas, y lavar las partículas de vidrio magnéticas, una o más veces, con un tampón de lavado, mediante la aspiración y la dispensación de la suspensión, la cual comprende el tampón de lavado y las partículas de vidrio magnéticas, una o más veces, mediante la utilización de una pipeta,

40 d. eluir los ácidos nucleicos procedentes de las partículas de vidrio magnéticas, mediante un tampón de elución,

45 e. transferir los ácidos nucleicos purificados y, opcionalmente, las citadas partículas de vidrio magnéticas, a una pluralidad de recipientes de reacción,

50 f. amplificar los ácidos nucleicos diana,

en donde, las condiciones físicas y el citado período de tiempo, son idénticos, para los miembros de la citada pluralidad de diferentes tipos de muestras de fluido, y en donde, el primer y/o el segundo ácido nucleico, es un ácido nucleico bacteriano.

55 De una forma especial, pero no únicamente para laboratorios clínicos, con un alto flujo de muestras, es altamente favorable el que éstos se encuentren provistos de un procedimiento mejorado de este tipo, para un rápido, fácil y fidedigno aislamiento simultáneo, de múltiples ácidos nucleicos diana, a partir de una pluralidad de diferentes tipos de muestras de fluido.

60 El procedimiento el cual comprende las etapas automáticas mencionadas anteriormente, arriba, exhiben varias desventajas.

65 En primer lugar, la combinación del procedimiento de la preparación de muestras en concordancia con la presente invención, con, por ejemplo, la transcripción inversa de RNA y la amplificación de los ácidos nucleicos diana, de una forma automatizada, reduce, de una forma significativa, la necesidad de una intervención manual, y así, de este modo, el riesgo potencial de contaminación.

De una forma adicional, la posibilidad de proporcionar un procedimiento individual, en el cual, una gran variedad de diferentes muestras, es decir, de diferentes fuentes de ácidos nucleicos, contribuye, de una forma significativa, a la reducción de la complejidad en su conjunto, del diagnóstico de los ácidos nucleicos. Así, por ejemplo, si deben aplicarse diferentes procedimientos, a cada tipo de muestra de fluido, tal y como es éste el caso, en el arte anterior de la técnica especializada, entonces, la preparación de muestras, es mucho más compleja, con una mayor cantidad del tiempo a emplear y más intensiva, en cuanto a lo referente a los recursos necesarios. Principalmente, deben explotarse diferentes reactivos, conduciendo, con ello, a unos costes incrementados y a un impedimento del desarrollo de soluciones automatizadas, rápidas y no complicadas.

La preparación de muestras en concordancia con la presente invención, exhibe la apropiada flexibilidad y flujo de trabajo, para hacer frente a los diferentes tipos de muestras, los cuales contienen diferentes tipos de ácidos nucleicos, tales como, por ejemplo, los consistentes en el DNA y en el RNA

Diferentes fuentes, es decir, diferentes tipos de muestras, comprenden, entre otros, a la totalidad de fluidos del cuerpo humanos, tales como, por ejemplo, la sangre, el esputo, el hisopado nasal, la orina, la transpiración, u otros.

El procedimiento en concordancia con la presente invención, requiere una inversión de tiempo considerablemente menor, y la realización del test de ensayo, es mucho más sencillo de realizar, que los procedimientos de preparación de muestras utilizados en el arte anterior de la técnica especializada. El procedimiento en concordancia con la presente invención, ofrece una mayor ventaja, tal como, por ejemplo, en el sector de la virología clínica, ya que, ésta, permite una preparación de muestras en paralelo y, subsiguientemente, la preferible amplificación de varios virus, en experimentos paralelos. El procedimiento, es particularmente de utilidad, para la gestión y control de pacientes post-trasplantados, en los cuales, se requiere un seguimiento y control vírico frecuente. Así, de ese modo, el procedimiento en concordancia con la presente invención, facilita un diagnóstico efectivo, en cuanto a lo referente al coste, y éste contribuye a una disminución del uso de agentes antivirales, y en cuanto a lo referente a las complicaciones víricas y hospitalizaciones. Este se aplica, igualmente, también, al sector de la microbiología clínica. De una forma general, las eficiencias, se consiguen mediante unos plazos de tiempo más cortos, y una flexibilidad mejorada de los test de ensayo. Así, por consiguiente, este hecho, conduce a una disminución del número de series requeridos en un paciente, para realizar una diagnosis, y unas estancias en el hospital, las cuales son potencialmente más cortas (así, por ejemplo, si una diagnosis puede proporcionarse más pronto, los pacientes los cuales requieren una terapia antimicrobiana, recibirán ésta última, más pronto, y así, de este modo, se recuperarán más pronto). De una forma adicional, los pacientes, muestran una menor morbilidad, y así, por lo tanto, éstos provocan unos inferiores niveles de coste, con relación a la terapia de soporte o ayuda (tal como, por ejemplo, la consistente en unos cuidados intensivos, relacionados con un retraso en la diagnosis de una sepsis o septicemia). El hecho de proporcionar un resultado negativo más pronto, puede tener unas importantes implicaciones para la sobreprescripción de antibióticos. Así, por ejemplo, si un resultado de un test de ensayo obtenido durante el procedimiento en concordancia con la presente invención, es apto, para la descartar el patógeno, de una forma más rápida, que con otro procedimiento de preparación de muestras estándar, seguido, por ejemplo, de PCR a tiempo real, entonces, el médico clínico, no se verá forzado al uso de antibióticos empíricos. De una forma alternativa, en el caso en el que se utilicen antibióticos empíricos, la duración del respectivo tratamiento, podrá acortarse.

Con respecto al diseño de un ensayo, incluyendo a la preparación de las muestras, mediante el procedimiento en concordancia con la presente invención, la persona experta en el arte de la técnica especializada, se beneficiará, de una forma particular, pero no únicamente, de las siguientes ventajas.

- una reducción de la complejidad del programa de "software" informático (conduciendo a un riesgo reducido de los errores de programación)
- una centralización de los esfuerzos de desarrollo del ensayo, en la optimización de la química, en lugar de en la química más los parámetros de control de los instrumentos
- un sistema mucho más fidedigno, puesto que se utiliza siempre un procedimiento individual y, el "hardware" informático, puede diseñarse de una forma óptima, para realizar este protocolo.
- la persona experta en el arte especializado de la técnica, el cual lleve a cabo el procedimiento en concordancia con la presente invención, se encuentra provisto de la flexibilidad para llevar a cabo diferentes aislamientos múltiples, en paralelo, como parte del mismo proceso
- reducción de costes.

En el sentido de la presente invención, los términos "purificación", "aislamiento" o ácidos nucleicos, se refieren a lo siguiente: Antes de que los ácidos nucleicos puedan analizarse en un ensayo de diagnóstico, tal como, por ejemplo, mediante amplificación, de una forma típica, éstos deben purificarse, analizarse, o extraerse, a partir de muestras biológicas, las cuales contengan mezclas complejas de diferentes componentes. Para las primeras etapas, pueden utilizarse procedimientos, los cuales permitan el enriquecimiento de los ácidos nucleicos.

A menudo, los ácidos nucleicos a analizar, no se encuentran libres, en solución, en la muestra de fluidos en cuestión, sino que, éstos, se encuentran localizados en el interior de estructuras cerradas, tales como, por ejemplo, las consistentes en células o en virus. En ensayos de diagnóstico, el objetivo, es a menudo el de identificar, de una forma especial, células patógenas o virus, en las muestras de fluidos, tales como las consistentes en muestras clínicas. Tales tipos de patógenos, pueden comprender, por ejemplo, a los RNA virus, tales como, por ejemplo, los consistentes en el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (HIV - [de sus iniciales en idioma inglés] -), el Virus de la Hepatitis C (HVC - [de sus iniciales en idioma inglés] -), el Virus del Nilo Occidental (WNV - [de sus iniciales en idioma inglés] -), el Virus del Papiloma Humano (HPV - [de sus iniciales en idioma inglés] -), el Virus de la Encefalitis Japonesa (JEV - [de sus iniciales en idioma inglés, correspondientes Japanese Encephalitis Virus] -), el Virus de la Encefalitis de San Luis (SLEV), - [de sus iniciales en idioma inglés, correspondientes a St. Louis Encephalitis Virus] -), y otros, o los DNA virus, tales como, por ejemplo, el Virus de la Hepatitis B (HBC - [de sus iniciales en idioma inglés] -), - el Citomegalovirus (CMV), y otros, o las bacterias, tales como, por ejemplo, la Chlamydia trachomatis (CT), la Neisseria gonorrhoeae (NG) y otras.

Así, por lo tanto, en el procedimiento en concordancia con la presente invención, el cual se ha descrito anteriormente, arriba, en la etapa a, comprende ácidos nucleicos de liberación, a partir de sus entornos medioambientales celulares y/o víricos, mediante lisis de células y/o cápsidas víricas, potencialmente presentes en la pluralidad de diferentes muestras de fluidos.

Para liberar los contenidos de las células o partículas víricas, éstas pueden tratarse con enzimas o con agentes químicos, para disolver, degradar o desnaturalizar las paredes celulares o partículas víricas. A este proceso, se le hace referencia, de una forma común, como lisis. A la solución resultante, la cual contiene tales tipos de materiales lisados, se le hace referencia como lisado.

Los agentes apropiados para lisar células y/cápsidas víricas, o estructuras similares, se encuentran provistos, de una forma usual, en un tampón de lisis. Así, de este modo, el procedimiento el cual se ha descrito anteriormente, arriba, comprende, en la etapa a., la adición de un tampón de lisis, a la pluralidad de las diferentes muestras de fluido.

Puesto que, el procedimiento en concordancia con la presente invención, es especialmente ventajoso, con respecto al alto rendimiento, la eficacia y la paralelización, el citado tampón de lisis, es idéntico, para los miembros de la citada pluralidad de diferentes tipos de muestras de fluido.

Así, de este modo, la complejidad del procedimiento de preparación de muestras, se reduce, de una forma adicional, puesto que no es necesario proporcionar diferentes reactivos de lisis, de una forma individual, para las diferentes muestras a tratar. De una forma adicional, el procedimiento, puede controlarse de una forma más fácil, cuando se trabaja con un tampón de lisis individual. El tampón de lisis, puede por ejemplo retirarse, mediante una multipipeta, de un recipiente individual, y subsiguientemente, dispensarse al interior de diferentes muestras, de una forma simultánea.

El tampón de lisis, en el procedimiento descrito anteriormente, arriba, en este documento de solicitud de patente, comprende:

- un agente caotrópico
- una sustancia tampón
- un alcohol
- un agente reductor, como se define adicionalmente en las reivindicaciones.

Los agentes caotrópicos, los cuales, generalmente, perturban la estructura ordenada de las moléculas de agua, en solución, y las fuerzas de unión no covalentes, en las moléculas y entre éstas, puede realizar diversas contribuciones al procedimiento de preparación de muestras. De una forma particular, pero no únicamente, éstos pueden aplicarse como inhibidores de RNasa, mediante la perturbación de la estructura terciaria de la nucleasa. De una forma usual, no es necesario aplicar un inhibidor de RNasa adicional, al tampón de lisis. Adicionalmente, además, los agentes caotrópicos, contribuyen a la ruptura de las membranas biológicas, tales como las consistentes en las membranas plasmáticas, o las membranas de organelas celulares, en el caso en el que éstas se encuentren presentes. Así mismo, también, éstos pueden jugar un rol interpretativo significativo, en la unión adhesiva de los ácidos nucleicos, a superficies tales como las consistentes en las superficies de vidrio (véase anteriormente, arriba). Los agentes caotrópicos son, por ejemplo, las sales de guanidinio, tales como las consistentes en el tiocianato de guanidinio o el clorhidrato de guanidinio, o el cloruro de guanidinio, o el isotiocianato de guanidinio, la urea, los percloratos, tales como, por ejemplo, los consistentes en perclorato de potasio, otros tiocianatos, o el yoduro potásico.

Las sustancias tampón son generalmente importantes, para mantener un cierto valor pH, o un rango de valores pH, en una solución. Éste es el requisito previo para la mayoría de los sistemas biológicos, y en su mayor parte, éstas son deseables, para las aplicaciones in vitro. Los tampones son, por ejemplo, los tampones citrato, tales como los consistentes en citrato sódico, si bien también lo son los tampones Tris (Tris-(hidroximetil)-aminometano), tal como el
 5 consistente en el Tris HCl, el fosfato, el N-(2-hidroxiethyl)-piperazin-N'-(ácido 2-etanosulfónico) (HEPES), si bien pueden también utilizarse otros tampones.

El uso de un alcohol, es un tampón de lisis, para la preparación de ácidos nucleicos, puede ser también ventajoso, tal y como es conocido por parte de aquellas personas expertas en el arte especializado de la técnica. El uso de polidecanol, para la preparación del ácido nucleico, se ha descrito, por ejemplo, en el documento de patente europea EP 1 932 913.
 10

Los agentes reductores, pueden también contribuir, así mismo, para la desnaturalización de componentes no deseados, tales como los consistentes en la RNasa A, la cual se ha mencionado anteriormente, arriba, en este documento de solicitud de patente. De una forma particular, los agentes reductores, tal y como es conocido, en el arte especializado de la técnica, segmentan los enlaces de disulfuro, intermoleculares e intramoleculares, los cuales son especialmente importantes, para la estructura terciaria de muchas proteínas.
 15

En vistas a lo anteriormente mencionado, arriba, se da a conocer un tampón de lisis que comprende los siguientes componentes:
 20

- Tiocianato de guanidinio,
- Citrato de Na,
- polidecanol
- DDT.

En la invención, la concentración de los componentes anteriormente mencionados, arriba, del tampón de lisis, son como sigue
 25

- Tiocianato de guanidinio: 4 M
- Citrato de Na: 50 mM
- polidecanol: 5 % en peso (referido a peso/volumen)
- DTT: 2 % en peso (referido a peso/volumen)

El tampón de lisis el cual se ha descrito anteriormente, arriba, tiene un pH ácido de 5,8.
 30

Un problema el cual se encuentra de una forma frecuente, durante la lisis, es el consistente en que, otras enzimas, la cuales degradan al componente de interés, tales como, por ejemplo, las consistentes en las desoxirribonucleasas o las ribonucleasas, las cuales degradan a los ácidos nucleicos, tales como la RNasa, mencionada anteriormente, arriba, en este documento de solicitud de patente, entran en contacto con el componente de interés, durante el proceso de lisis. Estas enzimas degradantes, pueden también encontrarse presentes fuera de las células, o éstas pueden encontrarse presentes, espacialmente separadas, en diferentes compartimientos celulares, previamente a la lisis. En el momento en que tiene lugar la lisis, el componente de interés, pasa a ser expuesto a las citadas enzimas degradantes. Otros componentes los cuales se liberan durante este proceso, pueden ser, por ejemplo, las endodextrinas, la cuales pertenecen a la familia de los lipopolisacáridos, los cuales son tóxicos para las células, y éstas pueden provocar problemas, para los productos los cuales se pretende utilizar en terapias para los humanos o para los animales.
 35
 40

Existen una variedad de medios para abordar y solucionar el problema el cual se ha mencionado anteriormente, arriba, en este documento de solicitud de patente. Es usual, el hecho de utilizar agentes caotrópicos (tales como los que se han descrito anteriormente, arriba, en este documento de solicitud de patente), o detergentes aniónicos, catiónicos, híbridos o no iónicos, cuando se pretende el hecho de liberar los ácidos nucleicos.
 45

Es así mismo, también, una ventaja, el hecho de utilizar proteasas, las cuales degradan rápidamente a las enzimas las cuales se han descrito, o a las proteínas no deseadas. Sin embargo, no obstante, esto puede producir otros problemas, ya que, las citadas sustancias, o enzimas, pueden interferir con reactivos o componentes, en las etapas subsiguientes.
 50

Las enzimas, las cuales se utilizan, de una forma preferible, en tales tipos de procesos de lisis, o de preparación de muestras, los cuales se han mencionado anteriormente, arriba, en este documento de solicitud de patente, son
 55

enzimas, las cuales segmentan a los enlaces de amida, en los sustratos de proteínas, y las cuales se clasifican como proteasas o (de una forma intercambiable), como peptidasas (véase, a dicho efecto, Walsh, 1979, *Enzymatic Reaction Mechanisms*, - Mecanismos de reacción de enzimática -. W. H. Freeman and Company, San Francisco, Capítulo 3). Las proteasas utilizadas en el arte anterior de la técnica especializada, comprenden a las proteasas alcalinas (WO 98/04 730) o las proteasas ácidas (US 5. 386. 024). Una proteasa, la cual se ha venido utilizando, de una forma muy generalizada, para la preparación de muestras, en el aislamiento de ácidos nucleicos, en el arte anterior de la técnica especializada, es la proteínaasa K, procedente de *Tritirachium album* (véase, a dicho efecto, por ejemplo, Sambrook J. *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, - Clonación molecular: Un manual de laboratorio -, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989), el cual es activo, a un valor pH aproximadamente neutro, y que pertenece a la familia de las proteasas, las cuales son conocidas, por parte de aquellas personas expertas en el arte especializado de la técnica, como subtilisinas. Es especialmente preferida, para su uso en los procesos de lisis o de la preparación de muestras, mencionados anteriormente, arriba, la enzima esperasa, una robusta proteasa, la cual retiene su actividad, en ambas, una alta alcalinidad y a altas temperaturas (EP 1 201 753).

En las etapas de la preparación de las muestras, a continuación de la etapa de lisis, el componente de interés, se enriquece de una forma adicional. Si los componentes no proteínicos de interés, son por ejemplo ácidos nucleicos, éstos se extraen, normalmente, a partir de complejas mezclas de lisis, antes de que éstos se utilizan en un ensayo basado en una sonda.

Existen varios procedimientos, para la purificación de ácidos nucleicos:

- los procedimientos dependientes de las secuencias o bioespecíficos, tales como, por ejemplo:

- la cromatografía de afinidad
- la hibridación a sondas inmovilizadas

- los procedimientos independientes de la secuencia o físico - químicos, tales como, por ejemplo:

- la extracción líquido - líquido con, por ejemplo, fenol - cloroformo
- la precipitación con, por ejemplo, etanol puro
- la extracción con papel de filtro
- la extracción con agentes que forman micelas, tales como el bromuro de cetil-trimetil-amonio
- la unión a colorantes intercalantes, inmovilizados, tales como, por ejemplo, los derivados de la acridina
- la adsorción en gel de sílice o tierras de diatomeas
- la adsorción en partículas de vidrio magnéticas (MGP - [de sus siglas en idioma inglés] -) o partículas de silanos orgánicos bajo unas condiciones caotrópicas.

Son particularmente interesantes, para los propósitos de purificación, la adsorción de ácidos nucleicos, en superficies de vidrio, si bien son también posibles, así mismo, otras superficies. Se han venido propuesto muchos procedimientos, para el aislamiento de ácidos nucleicos, a partir de su entorno medioambiental natural, en años recientes, mediante la utilización de su comportamiento de unión a las superficies de vidrio. Si los ácidos nucleicos, son la diana que se objetiviza, entonces, se prefiere una unión directa de los ácidos nucleicos al material con una superficie de sílice, debido, entre otras razones, al hecho de que, los ácidos nucleicos, no necesitan modificarse, y pueden incluso unirse enlazarse ácidos nucleicos nativos. Estos procedimientos, se describen, de una forma detallada, mediante 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, a partir de geles de agarosa, en presencia de yoduro de sodio, a vidrio de roca esmerilado. La purificación del DNA plasmídico, a partir de bacterias sobre vidrio en polvo, en presencia de perclorato sódico, se describe en Marko M. A. *et al.*, *Anal. Biochem.* 121 (1982) 382 - 387. En el documento de solicitud de patente alemana E-A 37 34 442, se describe el aislamiento del DNA del fago M13, de hebra individual, sobre fibra de vidrio, procediendo a hacer precipitar las partículas del fago, mediante la utilización de 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, a continuación, éstos se lavan, y después, se eluyen, con un tampón Tris/EDTA, con contenido de metanol. Un procedimiento similar, para la purificación del DNA, a partir de los fagos lambda, es el que se describe en Jakobi R. *et al.*, *Anal. Biochem.* 175 (1988) 196 - 201. El procedimiento en cuestión, implica la unión selectiva de ácidos nucleicos, a superficies de vidrio, en soluciones de sal caotrópicas, y la separación selectiva de los ácidos nucleicos, de agentes contaminantes, tales como los consistentes en agarosa, proteínas, o residuos de células. Para separar las partículas de vidrio, de los contaminantes, las partículas en cuestión, pueden, o bien ya sea centrifugarse, o bien, se hacen pasar fluidos, a través de los filtros de fibra de vidrio, extrayéndolos. Esta es una

etapa límite, pero, sin embargo, no obstante esta previene o evita el hecho de que, el procedimiento, se utilice para procesar grandes cantidades de muestras. El uso de partículas magnéticas, para la inmovilización de ácidos nucleicos, después de la precipitación, procediendo a la adición de sal y de etanol, es más ventajoso, y ello se describe, por ejemplo, en Alderton R. P. *et al.*, S., Anal. Biochem. 201 (1992) 166 - 169 y en el documento de patente prioritario PCT GB 91/00 212. En este procedimiento, los ácidos nucleicos, se aglutinan, conjuntamente con las partículas magnéticas. El aglutinado, se separa del disolvente original, procediendo a aplicar un campo magnético, y llevando a cabo una etapa de lavado. Después de una etapa de lavado, los ácidos nucleicos, se disuelven en un tapón Tris. Sin embargo, no obstante, este procedimiento, tiene la ventaja consistente en que, la precipitación, no es selectiva, para ácidos nucleicos. Más bien, se aglutinan, así mismo, también, una gran variedad de sustancias sólidas y disueltas. Como resultado de ello, este procedimiento, no puede utilizarse para eliminar cantidades significativas de cualesquiera inhibidores, de reacciones enzimáticas específicas, las cuales puedan encontrarse presentes. Se encuentra también comercialmente disponible en el mercado, vidrio poroso magnético, el cual contiene partículas magnéticas, en una matriz porosa, de una forma particular, de vidrio, y ésta se encuentra recubierta con una capa la cual contiene estreptavidina. Este producto, puede utilizarse para aislar materiales biológicos, tales como, por ejemplo, proteínas o ácidos nucleicos, si éstos se modifican en una etapa de preparación compleja, de tal forma que, éstos se unen a de una forma covalente a la biotina. Los adsorbentes particulares magnetizables, han probado ser muy eficientes y apropiados, para la preparación de muestras automática. Para este propósito, se utilizan pigmentos ferrimagnéticos y ferromagnéticos, así como, también, pigmentos superparamagnéticos. Las partículas de vidrio magnéticas mayormente preferidas, y los procedimientos que las utilizan, son aquéllas, las cuales se encuentran descritas en el documento de patente internacional, WO 01/37 291. Es particularmente de utilidad, para el aislamiento de ácidos nucleicos, en el contexto de la presente invención, el procedimiento en concordancia con R. Boom *et al.* (J Clin Microbiol. 28 (1990), 495 - 503).

La flexibilidad del procedimiento en concordancia con la presente invención, puede mejorarse, de una forma adicional, procediendo a adaptar el volumen, a la respectiva muestra de fluido, utilizada en el procedimiento. Este procedimiento, se centra en la diversidad de los diferentes tipos de muestras de fluido y de una forma posible, en los tipos de organismos y de ácidos nucleicos presentes en éstas. Así, por ejemplo, determinados virus, en una muestra de sangre entera, pueden requerir más material de partida, que el correspondiente a otras muestras, si se conoce el hecho de que, de una forma usual, sólo se encuentran presentes pequeñas cantidades de copias, en estos casos específicos.

Así, de este modo, un aspecto preferido de la presente invención, es el procedimiento descrito anteriormente, arriba, en donde, por lo menos una muestra de fluido de la citada pluralidad de diferentes fluidos, tiene un volumen diferente que el correspondiente a otras muestras de fluido.

Se prefiere así mismo, también, de una forma alternativa, o de una forma adicional, el hecho de que, se añadan diferentes volúmenes de tampón de lisis, a la citada pluralidad de diferentes muestras de fluido.

En una forma de presentación, adicionalmente preferida, cuando por lo menos una muestra de fluido, de la citada pluralidad de diferentes muestras de fluido, tiene un volumen diferente, con respecto a las otras muestras de fluido, se añade entonces tampón de lisis, a las muestras, de tal forma que, todas las muestras, tengan el mismo volumen, después de la adición.

En esta forma de presentación, en concordancia con la presente invención, es incluso más conveniente, el proceder a llevar a cabo un proceso automatizado, en diferentes muestras, de una forma simultánea. Las ventajas de ser capaces de elegir un volumen de partida apropiado, en dependencia del tipo muestra, y de tener unos volúmenes idénticos, para llevar a cabo el aislamiento y, de una forma opcional, en esta propuesta de procedimiento, se combinan, por ejemplo, la amplificación y la detección.

El término "material de soporte sólido", tal y como éste se utiliza, aquí, en este documento de solicitud de patente, comprende cualesquiera de los materiales sólidos, los cuales se han mencionado anteriormente, arriba, conjuntamente con la inmovilización de ácidos nucleicos, tales como, por ejemplo, las partículas de vidrio magnéticas, la fibras de vidrio, los filtros de fibras de vidrio, el papel de filtro, etc., mientras que, el material de soporte, sólido, no se encuentra limitado a estos materiales.

El material de soporte sólido, comprende partículas de unión al ácido nucleico, de una forma preferible, uno o más de los materiales seleccionados de entre la sílice, el metal, los óxidos metálicos, el plástico, los polímeros, y los ácidos nucleicos. En la invención, el material de soporte sólido, es el consistente en partículas de vidrio magnéticas.

"Inmovilizar", en el contexto de la presente invención, significa capturar objetos, tales como, por ejemplo ácidos nucleicos, de una forma reversible o de una forma irreversible. De una forma particular, "inmovilizado sobre el material de soporte sólido", significa el hecho consistente en que, el objeto o los objetos de la presente invención, se encuentran asociados con el material de soporte sólido, para el propósito de su separación, de cualquier medio circundante, y que puede(n) recuperarse, por ejemplo, mediante la separación del material de soporte sólido, en un punto ulterior. En este contexto, "inmovilización", puede comprender, por ejemplo, la adsorción de ácidos nucleicos, en vidrio, u otras superficies apropiadas de materiales sólidos, de la forma la cual se describe anteriormente, arriba,

en este documento de solicitud de patente. De una forma adicional, los ácidos nucleicos, pueden "inmovilizarse", de una forma específica, mediante el enlace o unión a sondas de captura., en donde, los ácidos nucleicos, se unen a ácidos nucleicos esencialmente complementarios, unidos a un soporte sólido, mediante apareamiento de bases. En el último caso, tal tipo de inmovilización específica, conduce a una unión predominante de ácidos nucleicos
5 objetivizados como diana.

"Simultáneamente" (o "de una forma simultánea"), en el sentido de la presente invención, significa el hecho de que, dos acciones, tales como las consistente en amplificar un primer, un segundo, o más ácidos nucleicos, se llevan a cabo al mismo tiempo, y bajo las mismas condiciones físicas. En una forma de presentación, en concordancia con la
10 presente invención, la amplificación simultánea de por lo menos un primer y un segundo ácidos nucleicos diana, se realiza en un recipiente. En otra forma de presentación, en concordancia con la presente invención, la amplificación simultánea, se lleva a cabo con por lo menos un ácido nucleico, en un recipiente, y por lo menos un segundo ácido nucleico, en un segundo recipiente, al mismo tiempo, y bajo las mismas condiciones físicas, de una forma particular, con respecto a la temperatura y al tiempo de incubación.

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

Una "muestra de fluido", es cualquier material fluido, el cual pueda someterse a ensayos de diagnóstico que objetivicen ácidos nucleicos como diana, y que se derive, de una forma preferente, de una fuente biológica. Así mismo, también, de una forma preferible, la citada muestra de fluido, se deriva de un humano, y ésta es un líquido
20 corporal. En una forma preferida de presentación de la presente invención, la muestra de fluido, es la consistente en la sangre humana, en la orina, en el esputo, en la sudoración, en las muestras de hisopados, en las heces pipeteables, o en el fluido espinal. De la forma mayormente preferible, la muestra de fluido, es la sangre humana.

25 El término "recipiente de reacción", tal y como éste se utiliza aquí, en este documento de solicitud de patente, comprende, si bien no de una forma limitativa en cuanto a éstos, a los tubos, o los pozos de placas, tales como las consistentes en las placas de micropozos, de pozos hondos, u otros tipos de placas de múltiples pozos, en los cuales tiene lugar una reacción, para el análisis de la muestras de fluido, tales como las consistentes en, por ejemplo, la transcripción inversa, o la reacción en cadena de la polimerasa. Los límites exteriores o paredes de tales
30 tipos de recipientes, son químicamente inertes, de tal forma que, éstos, no interfieren con la reacción analítica la cual tiene lugar en su interior. De una forma preferible, el aislamiento de los ácidos nucleicos, tal y como éste se describe anteriormente, arriba, se lleva también a cabo, en una placa de múltiples placas.

35 En este contexto, las placas de múltiples pozos, en sistemas analíticos, permiten la separación paralela y análisis o almacenaje de múltiples muestras. Las placas múltiples, pueden optimizarse para una captura máxima de líquido, o para una transferencia de calor máxima. Una placa de múltiples pozos preferida, para su uso en el contexto de la presente invención, se optimiza, para incubar o separar un analito, en un analizador automático. De una forma preferible, la placa de múltiples pozos, se construye y se organiza en un orden de disposición, para contactar con un dispositivo magnético y/un dispositivo de calentamiento.

40 La citada placa de múltiples pozos preferida, a la cual se la denomina, de una forma intercambiable, como "placa de procesado", en el contexto de la presente invención, comprende:

45 - una superficie superior, la cual comprende múltiples pozos, con aperturas, en la parte superior, organizadas en un orden de disposición consistente en filas. Los recipientes, comprenden una parte superior, una parte central, y una parte del fondo. La parte superior, se encuentra unida a la superficie superior de la placa de múltiples pozos, y comprende dos lados más largos y dos lados más cortos. La parte central, tiene una sección transversal, substancialmente rectangular, con dos lados más largos, y dos lados más cortos.

50 - dos paredes laterales, más cortas, opuestas, y dos paredes laterales, más largas, opuestas, y

- una base, en donde, la citada base, comprende una apertura construida y organizada en un orden de disposición, para emplazar la placa de múltiples pozos, en contacto con el citado dispositivo magnético y/o dispositivo de calentamiento.

55 En una forma preferida de presentación de la placa de múltiples placas, los pozos contiguos, en una fila, se encuentran unidos, en el lado más largo, de la citada forma casi rectangular.

60 De una forma preferible, la placa de múltiples pozos, comprende un espacio continuo, el cual se encuentra localizado entre filas contiguas de recipientes. Dicho espacio continuo, se encuentra construido y organizado en un orden de disposición, para acomodar un dispositivo magnético en forma de placa. En una forma preferida de presentación, en concordancia con la presente invención, la parte del fondo de los recipientes, comprende un fondo esférico. En una forma más preferida de presentación, la parte del fondo, de los citados recipientes, comprende una parte cónica, la cual se encuentra localizada entre la citada parte central y el citado fondo esférico.

65 En una forma preferida de presentación, en concordancia con la presente invención, la superficie de la parte

superior, comprende nervaduras, en donde, las nervaduras en cuestión, rodean a las aperturas de los recipientes. De una forma preferible, un lado más corto de la parte superior de los recipientes, comprende una cavidad, comprendiendo, la cavidad en cuestión, una superficie curvada, la cual se extiende desde la nervadura al interior del recipiente.

5 De una forma adicional, en una forma preferida de presentación, en concordancia con la presente invención, los recipientes comprenden una forma redondeada de su parte interior.

10 Para la fijación de las estaciones de procesado o de incubación, la base, comprende, de una forma preferible, un reborde que comprende cavidades. Pinzas de enganche en una estación, de un analizador, pueden engranar con las citadas cavidades, para fijar la placa en una estación.

15 En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, los recipientes, comprenden un espesor de pared, esencialmente constante.

20 La placa de procesado (101) preferida, en el contexto de la presente invención, es una placa de 1-componente. Su superficie superior (110), comprende múltiples recipientes (103). (Fig. 5, Fig. 6). Cada uno de los recipientes, tiene una apertura (108), en la parte superior, y se encuentra cerrada, en el fondo (112). La superficie superior (110), comprende nervaduras (104), las cuales de una forma preferible, se encuentran elevadas, con relación a la superficie superior (110), y que rodean a las aperturas (108) de los recipientes (103). Esto previene o evita la contaminación de los contenidos de los recipientes (108), con gotas de líquido, los cuales puedan caer sobre la superficie superior (110) de la placa (101). Las vistas de una placa de procesado preferida, se muestran en las figuras 3 a 8.

25 La ocupación de espacio de la placa de procesado (101), comprende una longitud y una anchura de la base, correspondiente al formato de ocupación de espacio ANSI SBS. De una forma más preferible, la longitud, es de 127,76 mm +/- 0,25 mm, y la anchura, es de 85,48 mm +/- 0,25 mm. Así, de este modo, la placa (101), tiene dos paredes laterales opuestas más cortas (109), y dos paredes laterales opuestas, más largas (118). La placa de procesado (101), comprende elementos de bloqueo de forma (106), para interactuar con un dispositivo de manipulación (500, Fig. 12). La placa de procesado (101), puede sujetarse, transportarse, y posicionarse, de una forma rápida y segura, a una alta velocidad, al mismo tiempo que mantiene una correcta orientación y posición. De una forma preferible, los elementos de fijación de la forma (106), para la sujeción, se encuentran localizados en el ámbito de la parte central superior, de una forma preferible, en el tercio central superior de la placa de procesado (101). Esta configuración, tiene la ventaja consistente en que, una potencial distorsión de la placa de procesado (101), tiene únicamente un efecto menor sobre los elementos de fijación de forma (106), y que, el manejo de la placa (101), es más sólido.

40 La placa de procesado (101), comprende, de una forma preferible, identificadores de "hardware" informático (102) y (115). Los identificadores de "hardware" informático, (102) y (115), son únicos, para la placa de procesado (101), y diferentes, con respecto a los identificadores de "hardware" informático de otros consumibles (materiales de consumo) utilizados en el mismo sistema. Los identificadores de "hardware" informático, (102) y (115), de una forma preferible, comprenden crestas (119) y/o cavidades (125), en las paredes laterales de los consumibles, en donde, el modelo patrón de las crestas (119) y/o cavidades (125), es único, para un tipo específico de consumible, de una forma preferible, la placa de procesado (101). A este modelo patrón único, se le hace así mismo, referencia, también, aquí, en este documento de solicitud de patente, como "geometría de superficie" única. Los identificadores de "hardware" informático, (102) y (115), aseguran el hecho de que, el usuario, pueda únicamente cargar la placa de procesado (101), en la apropiada posición apiladora, de un instrumento analítico, en la orientación apropiada. En los lados de la placa de procesado (101), se encuentran comprendidos elementos de guiado (116, 117), (Fig. 3, Fig. 4). Éstos previenen o evitan la inclinación de la placa de procesado (101). Los elementos de guiado (116, 117), permiten, al usuario, el cargar las placas de procesado (101), con elementos de guiado (116, 117), como un apilado, en, en un instrumento analítico, el cual, subsiguientemente, se transfiere verticalmente, en el interior de una apiladora, sin inclinar o ladear las placas. La parte central (120) de los recipientes (103), tiene una sección transversal, la cual tiene una forma casi rectangular (Fig. 6, Fig. 7). Éstas se encuentran separadas, a lo largo del lado más largo (118), de la forma casi rectangular, mediante una pared común (113) (Fig. 3). La fila de recipientes (103), formada de este modo, tiene la ventaja consistente de que, a pesar el limitado espacio disponible, éstos tienen un mayor volumen, siendo éste, de una forma preferible, de 4 ml. Otra ventaja de esta configuración, es la consistente en que, debido al hecho del espesor esencialmente constante, la producción, es muy económica. Una ventaja adicional de esta configuración, reside en el hecho de que, los recipientes (103), se refuerzan y fortalecen, conjuntamente, entre ellos y, así, de este modo, puede obtenerse una alta estabilidad de la forma.

60 Entre las filas de recipientes (103), se encuentra localizado un espacio continuo (121), (Fig. 6, Fig. 7). El espacio (121) en cuestión, puede acomodar imanes (202, 203), o dispositivos de calentamiento (128), (Fig. 11). Estos imanes (202, 203), y dispositivos de calentamiento (128), de una forma preferible, son dispositivos sólidos. Así, es de este modo, las partículas magnéticas (216), las cuales se encuentran comprendidas en líquidos (215), y las cuales pueden encontrarse sostenidas en los recipientes (103), pueden separarse del líquido (215), ejerciendo un campo magnético sobre los recipientes (103), cuando los imanes (202, 203), en cuestión, se llevan a las proximidades de

los recipientes (103). Así, de este modo, los contenidos de los recipientes (103), pueden incubarse a una temperatura elevada, y controlada, cuando la placa de procesado (101), se emplaza sobre el dispositivo de calentamiento (128). Puesto que, los imanes (202, 203), o los dispositivos de calentamiento (128), pueden ser sólidos, puede alcanzarse una alta densidad de energía. La forma casi rectangular de la parte central (120), de los recipientes (103), (Fig. 10), optimiza así mismo, también, el contacto entre la pared del recipiente (109) y el imán de forma plana (202) del dispositivo de calentamiento (128), mediante la optimización de la superficie de contacto entre el recipiente (103), y el imán (202), o el dispositivo de calentamiento (128), y así, de este modo, mejora e intensifica la transferencia de energía al interior del recipiente.

En el área del fondo cónico (111) de los recipientes, el espacio (121), es incluso más pronunciado, y ése puede acomodar imanes adicionales (203). La combinación de los imanes grandes (202) y el área superior de los imanes más pequeños (203), en el área cónica de los recipientes, permite la separación de las partículas magnéticas (216), en volúmenes pequeños o en volúmenes más grandes de líquido (215). Los imanes pequeños (203), posibilitan así, de este modo, el hecho de que sea más fácil, el secuestrar las partículas magnéticas (216), durante el pipeteado del eluido. Esto hace posible el pipetear el eluido, con una mínima pérdida, mediante la reducción del volumen muerto del gránulo de partículas magnéticas (216). De una forma adicional, se minimiza la presencia de partículas magnéticas (216), en el eluido transferido.

En el extremo superior de los recipientes (103), una de las paredes laterales más cortas (109) del recipiente (103), comprende un canal de salida del reactivo (105), el cual se extiende a la nervadura circunferencial (104) (Figuras 3, 4, 7). Los reactivos, se pipetean en canal de entrada de reactivos, (105), y se drenan hacia fuera del canal (105), hacia el interior del recipiente (103). Así, de este modo, se previene o evita el contacto entre la aguja o punta de la pipeta, (3, 4), y el líquido contenido en el recipiente. De una forma adicional, se previenen y evitan las salpicaduras resultantes del hecho consistente en que, el líquido, se dispense directamente al interior de otro líquido (215) contenido en los recipientes (103, el cual podría provocar la contaminación de la aguja o punta de pipeta (3, 4), o de los recipientes vecinos (103). El pipeteado secuencial al interior del canal de entrada del reactivo, (105), de pequeñas cantidades de reactivos, seguido del mayor volumen de otro reactivo, asegura el hecho de que, los reactivos, los cuales se añaden únicamente en pequeñas cantidades, se drenen completamente al interior del recipiente (103). Así, de este modo, el pipeteado de pequeños volúmenes de reactivos, es posible, sin pérdidas de precisión o de fiabilidad del test de ensayo a realizar.

En el interior, sobre el fondo de los recipientes (111, 112), la forma se convierte en cónica (111), y finaliza con un fondo esférico (112) (Fig. 6, Fig. 7). La forma del interior del recipiente, (114), incluyen la parte central particular, (120), es redondeada. La combinación del fondo esférico (112), de la forma interior redondeada (114), de la parte cónica (111), y de la superficie refinada de los recipientes (103), conduce a flúidicos, lo cual facilita una separación y purificación efectiva de los analitos, en la placa de procesado (101). El fondo esférico (112), permite un uso esencialmente completo del eluido separado y de una reducción del volumen muerto, los cual reduce el remanente por arrastre de los reactivos, o una contaminación cruzada de las muestras.

El ribete o borde, sobre la base (129) de la placa de precipitado (101), comprende cavidades (107), para el engrane con pinzas de enganche (124), sobre la estación de procesado (201) o dispositivo de calentamiento (128) o instrumento analítico (126) (Fig. 5, Fig. 9). El engrane de las pinzas de enganche (124) con las cavidades (107), permite la fijación de la placa de procesado (101), sobre la estación de procesado (201). La presencia de las cavidades (107), permite el hecho de que, la fuerza de enganche, actúe sobre la placa de procesado (101), casi verticalmente, con respecto a la base (129). Así, de ese modo, solamente pueden acontecer pequeñas fuerzas, las cual actúen de una forma oblicua. Este hecho, reduce el que acontezcan esfuerzos de tensión, y así, de este modo, una deformación de la placa de procesado, (101). Las fuerzas verticales de enganche, pueden también neutralizar, así mismo, cualesquiera deformaciones de la placa de procesado (101), conduciendo así, de este modo, a un posicionamiento más preciso de los fondos esféricos (111), en el ámbito de la estación de procesado (201). De una forma general, el interfaz o interrelación entre la placa de procesado (101) y la estación de procesado (201) o el dispositivo de calentamiento (128), en el ámbito de un analizador, reduce los volúmenes muertos y, reduce así mismo, también, el riesgo de una contaminación cruzada de las muestras.

Una "estación de separación", es un dispositivo o un componente de un sistema analítico, el cual permite el que se realice el aislamiento de un material de soporte sólido, procedente de otro material presente en la muestra de fluido. Dicha estación de separación, puede comprender, por ejemplo, si bien no de una forma limitativa en cuanto a éstos, una centrifugadora, un bastidor con tubos de filtrado, un imán, u otros componentes apropiados. La estación de separación, comprende uno o más imanes. El uno o más imanes, se utilizan para la separación de partículas de vidrio magnéticas, como un soporte sólido. En el caso de que, por ejemplo, la muestra de fluido, y el material de soporte sólido, se encuentren combinados conjuntamente, en los pozos de una placa de múltiples pozos, entonces, uno o más imanes, comprendidos mediante la estación de separación, pueden por ejemplo ponerse en contacto con la muestra de fluido, en sí misma, mediante la introducción de imanes en el interior de los pozos, o bien, los citados uno o más imanes, pueden llevarse a las cercanías de las paredes exteriores de las paredes, con objeto de atraer las partículas magnéticas y, a continuación, separarlas del líquido circundantes.

En una forma preferida de presentación, en concordancia con la presente invención, la estación de separación, es

un dispositivo, el cual comprende una placa de múltiples pozos, la cual comprende recipientes con una apertura en la superficie superior de la placa de múltiples pozos en cuestión, y un fondo cerrado. Los recipientes, comprenden una parte superior, una parte central, y una parte del fondo, en donde, la parte superior, se encuentra unida a la superficie de la parte superior y, de una forma preferible, ésta comprende dos lados más largos y dos lados más cortos. La parte central, tiene una sección transversal substancialmente rectangular, con dos lados más largos, en donde, los citados recipientes, se encuentran alineados en filas. Entre dos filas contiguas, se encuentra localizado un espacio continuo, para contactar, de una forma selectiva, por lo menos un imán, montado sobre un elemento o accesorio, con las paredes laterales, en por lo menos dos posiciones Z. El dispositivo en cuestión, comprende, de una forma adicional, una estación de separación magnética, la cual comprende por lo menos un elemento o accesorio. El elemento o accesorio en cuestión, comprende por lo menos un imán, el cual genera un campo magnético. Se encuentra presente un mecanismo de avance, el cual mueve verticalmente el citado por lo menos un elemento o accesorio, el cual comprende por lo menos un imán, por lo menos entre las primera y segunda posiciones, con respecto a los recipientes de la placa de s múltiples pozos. De una forma preferible, las citadas por lo menos dos posiciones Z, de los de los recipientes, comprenden las paredes laterales y la parte del fondo de los citados recipientes. El campo magnético del citado por lo menos un imán, de una forma preferible, atrae a las partículas magnéticas, a una superficie interior del recipiente, contigua al por lo menos un imán, cuando el citado por lo menos un imán, se encuentra en la citada primera posición. El efecto del citado campo magnético, es inferior, cuando el citado por lo menos un imán, se encuentra en la segunda posición, que cuando, el citado por lo menos un imán, se encuentra en la citada primera posición. De una forma preferible, el elemento o accesorio, el cual comprende el citado por lo menos un imán, comprende un bastidor. Los recipientes, tienen unas características o rasgos distintivos preferidos, de la forma la cual se ha descrito anteriormente, arriba, en este documento de solicitud de patente, en el contexto de la placa de múltiples pozos/placa de procesado. Uno de dichos rasgos distintivos o características, reside en el hecho de que, por lo menos una parte de los citados recipientes, tiene una sección transversal substancialmente rectangular, ortogonal, con respecto al eje de los citados recipientes.

En la citada primera posición, el citado por lo menos un imán, es contiguo a la citada parte de los citados recipientes. El término contiguo, se entenderá como pretendiendo dar a entender, o bien ya sea en una estrecha proximidad, de tal forma que, se ejerza un campo magnético, sobre los contenidos del recipiente, o bien ya sea, en contacto físico con el recipiente.

La estación de separación, comprende un bastidor, para recibir la placa de múltiples pozos, y pinzas de agarre, para sujetar la placa de múltiples pozos. De una forma preferible, la estación de separación, comprende dos tipos de imanes. Esta forma preferida de presentación, en concordancia con la presente invención, se describe abajo, a continuación.

Una segunda forma de presentación, en concordancia con la presente invención, es la que se describe abajo, a continuación, la cual comprende un resorte, el cual ejerce una presión sobre el bastidor, el cual comprende los imanes, de tal forma que, los imanes en cuestión, se presionan contra los recipientes de la placa de múltiples pozos.

Los primeros imanes, de una forma preferible, se encuentran construidos y ordenadamente dispuestos, para interactuar con los recipientes de una placa de múltiples pozos, para ejercer un campo magnético, sobre un amplio volumen de líquido, imanes éstos, los cuales comprenden partículas magnéticas, sostenidas en los citados recipientes. Los citados segundos imanes, se encuentran construidos y ordenadamente dispuestos, de una forma preferible, para interactuar con los recipientes de una placa de múltiples pozos, para ejercer un campo magnético, sobre un pequeño volumen de líquido, los cuales comprenden partículas magnéticas sostenidas los citados recipientes. Los citados primer y segundo imanes, pueden moverse, a diferentes posiciones Z.

Es de utilidad, en el contexto de la presente invención, y de la citada estación de separación, de una forma adicional, un procedimiento para la purificación del ácido nucleico. El procedimiento, comprende las etapas de unir un ácido nucleico, a partículas magnéticas, en un recipiente de múltiples pozos. El recipiente, comprende una apertura superior, una parte central y una parte del fondo. El material enlazado o unido, se separa, a continuación, del material no enlazado o unido, contenido en un líquido, cuando la parte mayor del líquido, se encuentra localizada por encima de la sección, en donde, la parte cónica del recipiente, se reemplaza por la parte central, con la forma rectangular, procediendo a mover un imán, desde una segunda posición, a una primera posición y, en la citada primera posición, aplicando un campo magnético, a la parte central y, de una forma adicional, aplicando un campo magnético, a la parte del fondo del citado recipiente. Las partículas magnéticas se lavan con una solución de lavado. Un pequeño volumen de líquido, en donde, la mayor parte del líquido, se encuentra localizado por debajo de la sección, en donde, la parte cónica del recipiente, se encuentra reemplazada por la parte central, con la forma rectangular, se separa de las citadas partículas magnéticas, procediendo a aplicar, selectivamente, un campo magnético, a la parte del fondo del citado recipiente.

Es también de utilidad, en el contexto de la presente invención, así mismo, una estación de separación magnética, para separar el ácido nucleico unido a las partículas magnéticas, comprendiendo, la citada estación de separación, unos primeros imanes, los cuales se encuentran construidos y ordenadamente dispuestos, para interactuar con los recipientes de una placa de múltiples pozos, para ejercer un campo magnético, sobre un amplio volumen de líquido, que comprenden partículas magnéticas, sostenidas en los citados recipientes, y unos segundos imanes, construidos

y ordenadamente dispuestos, para interactuar con recipientes de una placa de múltiples pozos, para ejercer un campo magnético, sobre un pequeño volumen de líquido, que comprenden partículas magnéticas, sostenidas en los citados recipientes, y en donde, los citados primeros y segundos imanes, pueden moverse a diferentes posiciones Z. Las formas preferidas de presentación, en concordancia con la presente invención, de la estación de separación magnética, se describen abajo, a continuación.

Una primera forma de presentación, en concordancia con la presente invención, de una estación de separación, (201), de utilidad en la presente invención, es la que se describe abajo, a continuación. La primera forma de presentación, en concordancia con la presente invención, de la estación de separación (201), comprende por lo menos dos tipos de imanes (202, 203). El primer tipo de imán, largo, (202), se encuentra construido y ordenadamente dispuesto, para encajar en el interior del espacio (121) de la placa de procesado (101). El imán (202), ejerce así, de este modo, un campo magnético, sobre el líquido (215), en el recipiente (103), para secuestrar las partículas magnéticas (216), en el interior de la pared del recipiente. Esto permite la separación de las partículas magnéticas (216), en cualquier material unido a éstas y al líquido (215), en el interior del recipiente (103), cuando se encuentra presenta un gran volumen de líquido (215). El imán (202), tiene una estructura alargada, y éste se encuentra construido y ordenadamente dispuesto, para interactuar con la parte central, esencialmente rectangular (120), del recipiente. Así, de este modo, el imán (202), se utiliza, cuando la mayor parte del líquido (215), se encuentra localizada por encima de la sección, en donde, la parte cónica (111) del recipiente (103), se encuentra reemplazada por la parte central (120), con una forma rectangular. Tal y como se muestra en la figura 40, la construcción preferida de los imanes (202), comprende elementos o accesorios (204, 204 a), los cuales comprenden imanes (202), los cuales encajan en el espacio (121), entre las filas de recipientes (103), en la placa de procesado (101). Otra forma de presentación, en concordancia con la presente invención, de los imanes (202), comprende imanes (202), ordenadamente dispuestos en elementos o accesorios (204, 204 a). Los imanes (203) de la estación de separación preferida, (201), son más pequeños, y éstos pueden interactuar con la parte cónica (111) del recipiente (103). Esta configuración, se muestra en la figura 10. Los imanes (203), se encuentran ordenadamente dispuestos, sobre una base (205), la cual puede moverse al interior del espacio (121) de la placa de procesado (101). Cada imán, (202, 203), se encuentra construido, de una forma preferible, para interactuar con dos recipientes (103), en dos filas contiguas. En una forma preferida de presentación, en concordancia con la presente invención, la placa de procesado (101), tiene 6 filas de 8 recipientes (103). Una estación de separación (201), la cual puede interactuar con la placa preferida de procesado (101), tiene dos elementos o accesorios (204, 204 a), los cuales comprenden imanes (202) y cuatro bases (205), que comprenden imanes (203). Se encuentra también incluida, una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, en donde, la estación de separación, tiene cuatro elementos de accesorios magnéticos (204, 204 a), que comprende imanes (202) y tres bases magnéticas (205), las cuales comprenden imanes (203).

Los imanes (202, 203), son móviles. La estación de separación (201), comprende un mecanismo para mover los elementos o accesorios (204, 204 a), y la bases (205). La totalidad de los elementos o accesorios (204, 204 a), se encuentran interconectados mediante una base (217), y así, de este modo, éstos se mueven de una forma coordinada. La totalidad de los imanes (203), se encuentran unidos a una base (218), de tal forma que, y así, de este modo, se muevan de una forma coordinada. El mecanismo para mover las placas magnéticas (202) y (203), se encuentra construida y ordenadamente dispuesta, para mover los dos tipos de placas magnéticas (202, 203) a un total de cuatro posiciones finales:

En las figuras 40 a - c, los imanes (203), se encuentran localizados en las proximidades de la parte cónica de los recipientes (103), de la placa de procesado (101). Esta es la posición más superior (superior extrema) de los imanes (203), y es la posición de separación. En esa figura, los imanes (202), se encuentran localizados en la posición superior. Éstos no se encuentran involucrados en la separación, cuando éstos se encuentran en esta posición.

En la forma preferida de presentación, en concordancia con la presente invención, la cual se muestra en la figura 10, la base (217) de los imanes (202), se encuentra conectada a una de posicionamiento (206). La base (217), comprende un extremo del fondo (207), el cual es flexible, el cual se encuentra en contacto con elemento de conexión (208), mediante un elemento móvil (209). Tal tipo de elemento móvil, se encuentra construido y ordenadamente dispuesto, para mover el elemento de conexión (208), a lo largo de un rail (212), desde un lado hasta el otro lado. El citado elemento móvil (209), se encuentra fijado al elemento de conexión (208), mediante un perno o clavija (220). El citado elemento de conexión (208), se encuentra conectado, así mismo, también, a un eje (211). Tal tipo de elemento de conexión (208), de una forma preferible, es una etapa rectangular. Cuando la rueda de posicionamiento (206), se mueve excéntricamente, alrededor del eje (211), de tal forma que, el husillo helicoidal (210), se mueve desde un punto por encima del eje excéntrico, a un punto situado por debajo del eje excéntrico, entonces, el elemento móvil (209) y el final del fondo (207) de la base (204), con los imanes (202), unidos a éstos, se mueven entonces, desde la posición más superior, a la posición más inferior. La base (218), se encuentra montada sobre la parte del fondo (219), y su extremo inferior, con el perno (213), a un elemento de móvil (214), el cual, de una forma preferible, se trata de una rueda o volante, la cual interactúa con la rueda de posicionamiento (206). Cuando la rueda de posicionamiento (206), gira alrededor del eje (211), entonces, la rueda (214), se mueve a lo largo de la rueda de posicionamiento (206). Si la rueda (214), se encuentra localizada en una sección de la rueda de posicionamiento (206), en donde la distancia, desde el eje (211), es corta, entonces, los imanes (203), se encuentran en su posición más inferior (posición inferior extrema). Cuando la rueda (214), se encuentra localizada

(ubicada), en una sección de la rueda de posicionamiento (206), en donde, la distancia desde el eje (211), se encuentra en un máximo, entonces, los imanes (203), se encuentran en su posición más superior (posición superior extrema). Así, de este modo, en una forma preferida de presentación de la primera forma de presentación, en concordancia con la presente invención, de la estación de separación, los imanes de localización o ubicación (203), se controlan mediante la forma de la rueda o volante de posicionamiento (206). Cuando el elemento móvil (209), se mueve a lo largo de la parte central, redondeada, superior o inferior (212 a), del rail (212), entonces, el tipo pequeño de imanes (203), se mueven hacia arriba y hacia abajo. Cuando el elemento móvil (209), se encuentra localizado en el lado (212 b) del extremo del fondo (207), y éste se mueve hacia arriba o hacia abajo, entonces, los imanes (202), se mueven en dirección hacia arriba, o en dirección hacia abajo. La rueda de posicionamiento, puede hacerse girar, en sentido rotativo, mediante cualquier tipo de motor (224).

En una forma preferida de presentación, en concordancia con la presente invención, un resorte (225), se encuentra unido a la base (222), de la estación de separación y la base (218) de los imanes (203), para asegurar el hecho consistente en que, los imanes (203), se muevan a la posición más inferior, cuando éstos se mueven en dirección descendente.

El término "perno", tal y como éste se utiliza aquí, en este documento de solicitud de patente, se refiere a cualquier elemento de fijación, incluyendo a los tornillo o pernos.

En una segunda forma de presentación, en concordancia con la presente invención, la estación de separación (230), comprende por lo menos un elemento o accesorio (231), el cual comprende por lo menos un imán (232), comprendiendo ésta, de una forma preferible, un número de imanes, el cual es igual al número de recipientes (103), en una fila (123). De una forma preferible, la estación de separación (230), comprende un número de elemento o accesorios (231), igual al número de filas (123) de la placa de múltiples pozos (101), la cual se ha descrito anteriormente, arriba, en este documento de solicitud de patente. De una forma más preferible, se encuentran montados seis elementos o accesorios (231), en la estación de separación (230). Se encuentra montado por lo menos un imán (232), en un elemento o accesorio (231). De una forma preferible, el número de imanes (232), es igual al número de recipientes (103), en una fila (123). De la forma mayormente preferible, se encuentran montados ocho imanes (232), en un elemento o accesorio (231). De una forma preferible, se encuentra comprendido un tipo de imán (232), en el citado elemento o accesorio (231). De una forma más preferible, el imán (232), se encuentra montado en un lado orientado hacia los recipientes, con los cuales actúa el imán en cuestión.

El elemento o accesorio (231), se encuentra montado sobre una base (233). De una forma preferible, dicho montaje o montura, es flexible. La base (233), comprende resortes (234), montados sobre ésta. El número de resortes (234), es el correspondiente a por lo menos un resorte por elemento o accesorio (231), montados sobre la citada base (233). La base en cuestión, comprende, de una forma adicional, un bisel o chaflán (236), el cual limita el movimiento del muelle y, por consiguiente, el elemento a accesorio (231), comprende los imanes (232). De una forma preferible, uno cualquiera de los citados resortes 234), se encuentra construido y ordenadamente dispuesto, para interactuar con el elemento o accesorio (231). De una forma preferible, el citado resorte (234), es un resorte de estribos o yugos. Dicha interacción, controla el movimiento de interacción de los elementos o accesorios (231). De una forma adicional, la estación de separación (230), comprende un bastidor (235). La base (233) con los elementos o accesorios (231), se encuentra conectada al bastidor (235), mediante un mecanismo móvil, tal y como se encuentra descrito, anteriormente, arriba, en este documento de solicitud de patente, para los imanes (232), de la primera forma de presentación, en concordancia con la presente invención.

De una forma preferible, la citada base (233), y elemento o accesorio (231), se encuentra construido y ordenadamente dispuesto, para moverse verticalmente (en la dirección Z).

La placa de múltiples pozos (101), la cual se ha descrito anteriormente, arriba, aquí, en este documento de solicitud de patente, se inserta en la estación de separación (230). El elemento o accesorio (231), el cual comprende los imanes (232), se mueve verticalmente. Cada uno de los elementos o accesorios (232), se mueve así, de este modo, en el ámbito de un espacio (121), entre las filas (123) de recipientes (103). El movimiento vertical, lleva a los imanes (232), montados sobre un elemento o accesorio (231), a ponerse en contacto con los recipientes (103). La posición Z, se elige en dependencia del volumen de líquido (215) existente en el interior de los recipientes (103). Para grandes volúmenes, los imanes (232), contactan con los recipientes (103), en una posición central (120), en donde, los recipientes (103) en cuestión, son de una forma casi rectangular. Para pequeños volúmenes de líquido (215), en donde, la mayor parte del líquido (215), se encuentra localizado por debajo de la parte central (120) de los recipientes (103), los imanes (232), contactan, de una forma preferible, con la parte cónica (111) de los recipientes (103).

Se encuentra montado un resorte, a la base (233) de cualquier bastidor (231) (Fig. 9 a), b). El resorte, presiona sobre los imanes (232), contra los recipientes (103). Esto asegura un contacto entre los imanes (232) y los recipientes (103), durante la separación magnética. De una forma preferible, los imanes (232), contactan con el recipiente (103), sobre la pared lateral (109), localizada por debajo de la entrada (105). Esta configuración, tiene la ventaja consistente en que, el líquido el cual se añade mediante un pipeteado, fluye sobre las partículas magnéticas secuestradas, y asegura el hecho de que, las partículas, se vuelvan a suspender, y que, la totalidad de las muestras,

en los recipientes, se traten de una forma idéntica.

Esta forma de presentación, en concordancia con la presente invención, es particularmente apropiada para separar un líquido (215), el cual se encuentre comprendido en la placa de múltiples pozos (101), tal y como se ha descrito anteriormente, arriba, en este documento de solicitud de patente, de las partículas magnéticas (216), cuando se encuentran contenidos diferentes niveles de líquido (215), en los recipientes (103) de la citada placa de múltiples pozos (101).

Un "tampón de lavado", es un fluido, el cual se encuentra concebido para eliminar o retirar componentes no deseados, de una forma especial, en un procedimiento de purificación. Tales tipos de tampones, son bien conocidos, en el arte especializado de la técnica. En el contexto de la purificación de ácidos nucleicos, el tampón de lavado, es apropiado para lavar el material de soporte sólido, con objeto de separar el ácido nucleico inmovilizado, de cualesquiera componentes no deseados. El tampón de lavado en cuestión, puede contener, por ejemplo, etanol y/o agentes caotrópicos, en una solución tamponada, o soluciones con un valor pH ácido, sin etanol y/o agentes caotrópicos, de la forma la cual se ha descrito anteriormente, arriba, aquí, en este documento de solicitud de patente. A menudo, la solución de lavado, u otras soluciones, se proporcionan como soluciones stock (soluciones madre), las cuales deben diluirse antes de proceder a su uso.

El lavado, en el procedimiento en concordancia con la presente invención, requiere un contacto más o menos intensivo, del material de soporte sólido, y de los ácidos nucleicos inmovilizados en éste, con el tampón de lavado. Son posibles diferentes procedimientos, con objeto de conseguir este objetivo, tales como, por ejemplo, la acción de agitar el tampón de lavado, con el material de soporte sólido, en los respectivos recipiente o recipientes, o conjuntamente con éstos. El procedimiento el cual se utiliza en el procedimiento el cual se describe aquí, en este documento de solicitud de patente, es el consiste en aspirar y dispensar la suspensión que comprende el tampón de lavado y el material de soporte sólido, una o más veces. Este procedimiento se lleva a cabo mediante la utilización de una pipeta, en donde, la pipeta en cuestión, comprende, de una forma preferible, una punta o boquilla desechable, en cuyo interior, se aspira la citada suspensión, y a partir de la cual, ésta se dispensa de nuevo. Tal tipo de punta o boquilla de la pipeta, puede utilizarse varias veces, antes de proceder a desecharla y a reemplazarla. Las puntas o boquillas desechables de las pipetas, las cuales son de utilidad para la presente invención, tienen, de una forma preferible, un volumen de por lo menos 10 µl, teniendo éstas, de una forma más preferible, un volumen de por lo menos 15 µl, de una forma todavía más preferible, un volumen de por lo menos 100 µl, de una forma aún todavía más preferible, un volumen de por lo menos 500 µl, de una forma aún todavía mucho más preferible, un volumen de por lo menos 1 ml, y de una forma mayormente preferible, un volumen de aproximadamente 1 ml. Las pipetas utilizadas en el contexto de la presente invención, pueden también ser, así mismo, agujas de pipeteado.

Así, por lo tanto, el citado proceso de lavado, en la etapa c, comprende la aspiración y la dispensación del tampón de lavado, el cual comprende el material de soporte sólido.

En vistas a la consecución de un fácil uso y de facilitar la automatización, es preferible el hecho de combinar los recipientes los cuales se han mencionado anteriormente, arriba, en este documento de solicitud de patente, en un orden de disposición integral, de tal forma que, éstos, puedan manipularse conjuntamente.

Así, por consiguiente, un aspecto preferido de la presente invención, es el consistente en el procedimiento el cual se ha descrito anteriormente, arriba, en este documento de solicitud de patente, en donde, los recipientes, se encuentran combinados en un orden de disposición integral.

Los órdenes de disposición integral, pueden ser, por ejemplo, viales o tubos, unidos de una forma reversible, o unidos de una forma irreversible, los unos con los otros, u ordenadamente dispuestos en un bastidor. De una forma preferible, el orden de disposición integral, es el consistente en una placa de múltiples pozos. De una forma más preferible, la placa de múltiples pozos, es una placa de pozos profundos.

El procedimiento en concordancia con la presente invención, es particularmente de utilidad, cuando se procede a preparar diferentes tipos de ácidos nucleicos, ya que, la disposición de un proceso de trabajo individual, en los mismos reactivos, anula la necesidad de aislar diferentes tipos de ácidos nucleicos, tales como los consistentes en el DNA y el RNA, de una forma individual, debido a sus diferentes propiedades.

Así, por lo tanto, un aspecto preferido de la presente invención, es el consistente en procedimiento el cual se ha mencionado arriba, en este documento de solicitud de patente, en donde, el primer ácido nucleico objetivizado como diana, comprende RNA y, el segundo ácido nucleico objetivizado como diana, comprende DNA.

De una forma adicional, múltiples muestras de muestras de fluidos, pueden comprender diferentes organismos, o bien, éstas se derivan de diferentes organismos. Así mismo, también, es entonces ventajoso, el hecho de proporcionar los respectivos ácidos nucleicos, de una forma simultánea, con el mismo proceso de trabajo y los mismos reactivos. La presente invención, permite, para tal tipo de preparación simultánea de ácidos nucleicos, tales como, por ejemplo, las bacterias, los virus DNA, y los virus RNA, a pesar de sus diferentes estructuras y sus diferentes propiedades.

Así, de este modo, un aspecto preferido de la presente invención, es procedimiento el cual se ha descrito anteriormente, arriba, aquí, en este documento de solicitud de patente, en donde, el primer ácido nucleico objetivizado como diana, y el segundo ácido nucleico objetivizado como diana, son de diferentes organismos.

5 Un aspecto adicionalmente preferido de la presente divulgación, es el procedimiento el cual se ha descrito anteriormente, arriba, aquí, en este documento de solicitud de patente, en donde, el primer y/o el segundo ácido nucleico, es un ácido nucleico, no vírico.

10 Así mismo, también, en el procedimiento el cual se ha descrito anteriormente, arriba, aquí, en este documento de solicitud de patente, el primer y/o el segundo ácido nucleico objetivizado como diana, es un ácido nucleico bacteriano.

15 Un "organismo", tal y como éste se utiliza aquí, en este documento de solicitud de patente, significa una forma de vida multicelular o de célula individual, viva. En el contexto de la presente invención, el virus, es un organismo.

La presente invención, es también de utilidad, cuando diferentes ácidos nucleicos, deben ser de una procedencia correspondiente a una pluralidad de diferentes tipos de muestras de fluido. Así, de este modo, pueden aislarse diferentes ácidos nucleicos, en extracciones simultáneas, paralelas, bajo las mismas condiciones físicas, y pueden entonces, por ejemplo, procesarse de una forma adicional, analíticamente, en diferentes recipientes.

20 Así, por lo tanto, un aspecto preferido de la presente invención, es el consistente en el procedimiento el cual se ha descrito anteriormente, arriba, en este documento de solicitud de patente, en donde, el primer ácido nucleico, se encuentra presente en una primera muestra de fluido, y el segundo ácido nucleico, se encuentra presente en una segunda muestra de fluido.

25 Tal tipo de forma de presentación, es particularmente de utilidad, cuando, los citados diferentes ácidos nucleicos, no se encuentran en contacto, el uno con el otro, y éstos pueden procesarse por separado. Así, por lo tanto, un aspecto preferido de la presente invención, es el procedimiento el cual se ha descrito anteriormente, arriba, en donde, el segundo ácido nucleico, se encuentra ausente de la primera muestra de fluido.

30 Sin embargo, no obstante, puede también encontrarse presentes, así mismo, diferentes ácidos nucleicos, en el ámbito de la misma muestra, si bien, no obstante, no necesariamente la totalidad de éstos, deben procesarse de una forma adicional, después del aislamiento. La presente invención, es también de utilidad, así mismo, en esos casos.

35 Así, de este modo, un aspecto preferido de la presente invención, es el procedimiento el cual se ha descrito anteriormente, arriba, aquí, en este documento de solicitud de patente, en donde, el segundo ácido nucleico, se encuentra también presente, así mismo, en la primera muestra de fluido.

40 En el caso de un procesado posterior, especialmente, cuando se utilizan técnicas de diagnóstico, tales como las consistentes en los procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos, es entonces a menudo deseable, o incluso se requiere, el hecho de incluir uno más ácido nucleicos de control. Así, de este modo, o bien la reacción analítica, puede contralarse, cuando se añade el control, al ácido nucleico purificado, o bien, así mismo, también, la preparación de la muestra, puede controlarse, cuando se procede a añadir el control, previamente a la extracción del ácido nucleico, o bien durante la extracción del ácido nucleico en cuestión. Es también usual, y preferible, el incluir ambos tipos de controles.

45 En este respecto, un aspecto de la presente invención, es el procedimiento el cual se ha descrito anteriormente, arriba, en este documento de solicitud de patente, en donde, un ácido nucleico de control, se añade a la muestra de fluido y/o, al ácido nucleico purificado, en una cualquiera de las etapas.

50 Para la unión de los ácidos nucleicos, al material de soporte sólido, y en el caso de que ésta sea aplicable, la lisis de células y virus, ha probado ser ventajoso, el hecho de incubar, a una temperatura correspondiente a un valor de hasta 50 °C.

55 Así, de este modo, un aspecto de la presente invención, es el procedimiento el cual se ha descrito anteriormente, arriba, aquí, en este documento de solicitud de patente, en donde, la etapa a., se lleva a cabo a una temperatura correspondiente a un valor de hasta 50 °C, de una forma preferible, a una temperatura comprendida dentro de unos márgenes situados entre los 35 °C y los 45 °C, de una forma más preferible, a una temperatura de 40 °C.

60 Para el procesado posterior de los ácidos nucleicos aislado, puede ser ventajoso el hecho de separarlos del material de soporte sólido, antes de someterlos, por ejemplo, a amplificación.

65 Así, por lo tanto, el cual se ha descrito anteriormente, arriba, aquí, en este documento de solicitud de patente, en donde, el procedimiento, comprende, de una forma adicional, después de la etapa c., la siguiente etapa:

d. eluir los ácidos nucleicos del material de soporte sólido, con un tampón de elución. Un "tampón de elución", en el contexto de la presente invención, es un líquido apropiado para separar los ácidos nucleicos, del soporte sólido. Tal tipo de líquido, puede consistir, por ejemplo, en agua destilada o en soluciones de sales, acuosas, tales como, por ejemplo, las consistentes en los tampones Tris, como el Tris HCl o el HEPES, u otros tampones apropiados, los cuales son conocidos, por parte de aquellas personas expertas en el arte especializado de la técnica. El valor pH de tal tipo de tampón de elución, de una forma preferible, es alcalino o neutro. Tal tipo de tampón de elución, puede contener, así mismo, también, otros componentes, tales como los consistentes en, por ejemplo, quelatos, tales como el EDTA, el cual estabiliza a los ácidos nucleicos, mediante la inactivación de las enzimas de degradación.

La elución, se lleva a cabo, de una forma preferible, a temperaturas elevadas, de tal forma que, una forma preferida de presentación de la presente invención, es el procedimiento el cual se ha descrito anteriormente, arriba, aquí, en este documento de solicitud de patente, en donde, la etapa d, se lleva a cabo a una temperatura correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes, los cuales van desde los 70 °C hasta los 90 °C, de una forma preferible, a una temperatura correspondiente a un valor de 80 °C.

Tal y como se ha mencionado arriba, aquí, en este documento de solicitud de patente, es a menudo deseable, el hecho de analizar los ácidos nucleicos aislados mediante el procedimiento el cual se ha descrito anteriormente, arriba, aquí, en este documento de solicitud de patente. Para llevar a cabo este cometido, puede resultar ventajoso, el hecho de incrementar la cantidad de material de partida, para el análisis.

Así, por lo tanto, el procedimiento el cual se ha descrito anteriormente, arriba, aquí, en este documento de solicitud de patente, comprende, después de la etapa d., las siguientes etapas:

e. transferir los ácidos nucleicos purificados y, de una forma opcional, el citado material de soporte sólido, a una pluralidad de recipientes de reacción

f. amplificar los ácidos nucleicos diana.

En este contexto, es especialmente ventajoso, el hecho de emplear procedimientos de amplificación y de detección, los cuales permitan la amplificación y la detección simultáneas, de múltiples ácidos nucleicos diferentes, en dos o más recipientes de reacción, bajo las mismas condiciones físicas, y utilizando los mismos reactivos. Una combinación de tal tipo de técnica, con la rápida y eficiente preparación de muestras, la cual se dado a conocer anteriormente, arriba, en este documento de solicitud de patente, puede ser muy ventajoso, para proporcionar, por ejemplo, soluciones integradas automatizadas, en las cuales, el proceso de trabajo, se lleva a cabo en una pluralidad de diferentes tipos de muestras, las cuales contienen diferentes ácidos nucleicos. Estas muestras, pueden procesarse en paralelo, para aislar de una forma simultánea, los diferentes ácidos nucleicos que éstas contienen y, el análisis de los citados diferentes ácidos nucleicos aislados, puede entonces llevarse también a cabo, de una forma simultánea. La combinación de estos procedimientos propuestos, reduce, de una forma significativa, la complejidad y el tiempo de resolución, para tales tipos de experimentos, los cual es de una considerable ventaja, de una forma particular, para los laboratorios de diagnóstico, en un ámbito clínico.

Así, de este modo, un aspecto preferido de la presente invención, es el procedimiento descrito anteriormente, aquí, en este documento de solicitud de patente, en donde, la etapa f, comprende las siguientes etapas:

i. contactar los ácidos nucleicos purificados, con uno o más reactivos de purificación, que comprenden una polimerasa con una actividad transcriptasa inversa, en por lo menos dos recipientes de reacción, en donde, por lo menos un primer recipiente de reacción, comprende por lo menos el citado primer ácido nucleico objetivado como diana, y por lo menos un segundo recipiente de reacción, comprende por lo menos el citado ácido nucleico diana, y en donde, el segundo ácido nucleico diana, se encuentra ausente del primer recipiente de reacción,

ii. incubar, en los citados recipientes de reacción, los citados ácidos nucleicos purificados, con los citados uno o más reactivos de amplificación, durante un período de tiempo, y bajo unas condiciones apropiadas, para que acontezca la transcripción de RNA, mediante la citada polimerasa, con actividad transcriptasa inversa.

iii. incubar, en los citados recipientes de reacción, los citados ácidos nucleicos purificados, con los citados uno o más reactivos de amplificación, durante un período de tiempo, y bajo unas condiciones apropiadas, para que acontezca una reacción de amplificación, indicativa de la presencia o ausencia de los citados primer y segundo ácido nucleicos,

en donde, las condiciones para las etapas de transcripción y de amplificación, en las etapas i a iii, son idénticas, para los por lo menos un primer y segundo ácidos nucleicos.

En cuanto a lo referente al procedimiento de amplificación, ha representado un reto, en el arte anterior de la técnica especializada, el hecho consistente en que, el número de diferentes ácidos nucleicos, en ensayo multiplex llevado a cabo en un recipiente de reacción individual, se encuentre limitado por el número de marcajes apropiados. En un ensayo de PCR a tiempo real, por ejemplo, el solapamiento potencial del espectro del fluorocromo, tiene un gran

impacto sobre el resultado del ensayo, en cuanto a lo referente a su interpretación (riesgo de resultados positivos falsos, una menor precisión, etc.). Así, por lo tanto, los respectivos fluoróforos, tienen que seleccionarse de una forma cuidadosa, y separarse bien, espectralmente, con objeto de asegurar el deseado resultado, de un test de ensayo de diagnóstico. De una forma típica, el número de diferentes fluoróforos susceptibles de poderse utilizar, corresponden un número de un dígito individual, de los canales de fluorescencia del instrumento de PCR.

Como contraste de ello, en el procedimiento el cual se ha descrito anteriormente, arriba, aquí, en este documento de solicitud de patente, de amplificación de por lo menos un primer y un segundo ácido nucleico diana, tiene lugar en por lo menos dos recipientes de reacción diferentes, permitiendo el hecho de que se produzca una amplificación simultánea, de un mayor número de diferentes ácidos nucleicos objetivados como diana, ya que, las señales, en diferentes recipientes de reacción, pueden detectarse de una forma independiente, las una con respecto a las otras. Aún todavía, en el ámbito de la presente invención, se encuentran formas de presentación, en donde, se llevan a cabo una o más de las reacciones multiplex, de los múltiples recipientes de reacción, multiplicando, con ello, el número de dianas las cuales pueden amplificarse simultáneamente, y bajo las mismas condiciones.

"Reactivos de amplificación", en el contexto de la presente invención, son compontes químicos o bioquímicos, los cuales permiten la amplificación de ácidos nucleicos. Tales tipos de reactivos, comprenden, si bien no de una forma limitativa en cuanto a éstos, a los ácidos nucleicos polimerasas, a los tampones, a los mononucleótidos, tales como los consistentes en los nucleósidos trifosfatos, los oligonucleótidos, tales como, por ejemplo, los oligonucleótidos cebadores, las sales, y sus respectivas soluciones, sondas de detección, colorantes, y más.

Tal y como es conocido, en el arte de la técnica especializada, un "nucleósido"; es una combinación base - azúcar. La porción consistente en la base del nucleósido es, normalmente, una base heterocíclica. Las dos bases más comunes de bases heterocíclicas, son las purinas y las pirimidinas.

"Nucleótidos", son nucleósidos, los cuales incluyen, de una forma adicional, un grupo fosfato, unido, de una forma covalente, a la porción consistente en el azúcar, del nucleósido. Para aquellos nucleósidos, los cuales incluyen un azúcar de pentafuranosilo, el grupo fosfato, puede encontrarse enlazado, bien ya sea a la porción 2'-hidroxilo, a la porción 3'-hidroxilo, o la porción 5'-hidroxilo del azúcar. Un nucleótido, es la unidad monomérica de un oligonucleótido, a la cual se le puede denominar, de una forma general, como un "compuesto oligomérico", o un "polinucleótido", la cual se le puede denominar, de una forma general, como un "compuesto polimérico". Otra expresión general, para el anteriormente mencionado, es el ácido desoxirribonucleico (DNA), o el ácido ribonucleico (RNA).

En concordancia con la presente invención, un "compuesto oligomérico", es un compuesto consistente en "unidades monoméricas", las cuales puede ser nucleótidos solos, o compuestos no naturales (véase, posteriormente, abajo), de una forma más específicas, nucleótidos modificados (o análogos de nucleótidos), o compuestos no nucleótidos, solos, o combinaciones de entre éstos.

Los "oligonucleótidos", y los "oligonucleótidos modificados" (o análogos de oligonucleótidos), son subgrupos de compuestos oligoméricos. En el contexto de la presente invención, el término "oligonucleótido", se refiere a compuestos formados a partir de una pluralidad de nucleótidos, como sus unidades monoméricas. A los grupos fosfato, se les hace referencia, de una forma usual, como formando una cadena de internucleósidos, del oligonucleótido. El enlace o cadena de RNA y DNA, es un enlace fosfodiéster 3' a 5'. Los oligonucleótidos y los oligonucleótidos modificados (véase más abajo, a continuación) los cuales son de utilidad para la presente invención, puede sintetizarse tal y como se encuentra descrito, principalmente, en el arte especializado de la técnica, y es conocido, por parte de aquellas personas expertas en dicho arte especializado de la técnica. Los procedimientos para la preparación de compuestos oligoméricos de secuencias específicas, son bien conocidos, en el arte especializado de la técnica, y éstos incluyen, por ejemplo, a la clonación y a la restricción de secuencias apropiadas y síntesis clínicas, directas. Los procedimientos de síntesis químicas, pueden incluir, por ejemplo, al procedimiento del fosfodiéster, el cual se describe por parte de Narang S. A. *et al.*, en *Methods in Enzymology*, - *Procedimientos en enzimología* -, 68 (1979) 90 - 98, al procedimiento del fosfodiéster, el cual se da a conocer por parte de Brown E. L., *et al.*, en *Methods in Enzymology*, *Procedimientos en Enzimología* -, 68 (1979) 109 - 151, al procedimiento de la fosforamidita, dada a conocer por parte de Beaucage *et al.*, en *Tetrahedron Letters* 22 (1981) 1859, al procedimiento del H-fosfonato, dado a conocer por parte de Garegg *et al.*, en *Chem. Scr.* 25 (1985) 280 - 282, y al procedimiento de soportes sólidos, dado a conocer en el documento de patente estadounidense U S 4. 458. 066.

En el procedimiento en concordancia con la presente invención, los oligonucleótidos, pueden modificarse químicamente, es decir que, la primera y/la segunda sonda, comprenden un nucleótido modificado o un compuesto no nucleótido. La sonda del cebador es, entonces, un oligonucleótido modificado.

Los "nucleótidos modificados" (o "análogos de nucleótidos"), difieren de un nucleótido natural, en algunas modificaciones, pero éstos todavía consisten en una base, un azúcar de pentafuranosilo, una porción fosfato, un grupo semejante a una base, un grupo semejante a un azúcar de pentafuranosilo, una porción semejante al fosfato, o combinaciones de entre éstos. Así, por ejemplo, un marcador, puede encontrarse unido a la porción de base de un

nucleótido, con lo cual se obtiene un nucleótido. Una base natural, en un nucleótido, puede también reemplazarse, así mismo, mediante, por ejemplo, una 7-deazapurina, mediante la cual, se obtiene así mismo, también, un nucleótido.

5 Un "oligonucleótido modificado" (o "análogo de oligonucleótido"), perteneciente a otro subgrupo específico de compuestos, posee uno o más nucleótidos, y uno o más nucleótidos modificados, como unidades monoméricas. Así, de este modo, el término "oligonucleótido modificado" (o "análogo de oligonucleótido"), se refiere a estructuras las cuales funcionan de una forma substancialmente similar a los oligonucleótidos y, éstos, puede utilizarse, de una forma intercambiable, en el contexto de la presente invención. Desde un punto de vista sintético, un oligonucleótido modificado (o un análogo de oligonucleótido), puede por ejemplo encontrarse constituido mediante la modificación química de oligonucleótidos, mediante la apropiada modificación de la cadena de fosfato, la unidad ribosa, o las bases de nucleótidos (véase, a dicho efecto, Uhlmann y Peyman, Chemical Reviews 90 (1990) 543; Verma S., y Eckstein F., Annu. Rev. Biochem. 67 (1998) 99 - 134). Las modificaciones representativas, incluyen a los enlaces internucleósidos fósforotioato, fósforoditioato, fosfonato de metilo, fosfotriéster, o fosforamidato, en lugar de los enlaces de internucleósidos de fosforodiéster; a las deaza- o azpurinas y -pirimidinas, en lugar las bases de purina y de pirimidinas naturales, las cuales tienen grupos sustituyentes en la posición 5 o 6; a las a las bases las cuales tienen grupos sustituyentes modificados, en las posiciones 2, 6 u 8, o en la posición 7, como 7-deazapurinas, a las bases, las cuales portan porciones alquilo, alquilo, alquinilo, o arilo, tales como, por ejemplo, los grupos alquilo inferior, tales como los consistentes en los grupos metilo, etilo, propilo, butilo, tert.-butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo o arilo, tales como fenilo, bencilo, naftilo; a los azúcares, los cuales tienen grupos sustituyentes en, por ejemplo, su posición 2'; o a los análogos de azúcares carboxílicos o acíclicos. Otras modificaciones en conformidad con la presente invención, son aquéllas las cuales son conocidas por parte de aquéllas personas expertas en el arte especializado de la técnica. Tales tipos de oligonucleótidos modificados (o análogos de oligonucleótidos), se describen, de la mejor forma, como siendo funcionalmente intercambiables con, los oligonucleótidos naturales, si bien, no obstante, éstos son estructuralmente diferentes de éstos últimos. De una forma más detallada, las modificaciones ejemplares, se dan a conocer en el trabajo publicado por parte de Verma S., y Eckstein F., en Annu. Rev. Biochem. 67 (1998) 99 - 134, o en el documento de publicación de patente internacional WO 02/12 263. De una forma adicional, puede efectuarse una modificación, en donde, las unidades de nucleósido, se encuentran unidas vía grupos los cuales sustituyen a los enlaces fosfato del internucleósido, o fosfato del azúcar. Tales tipos de enlaces, incluyen a aquéllos los cuales se dan a conocer por parte de Verma S. y Eckstein F., en Annu. Rev. Biochem. 67 (1998) 99 - 134. Cuando se procede a utilizar otros tipos de enlaces, distintos de los enlaces de fosfato, para unir las unidades de nucleósidos, entonces, tales tipos de estructuras, se describen como siendo "oligonucleótidos".

35 Un "ácido nucleico", así como el "ácido nucleico diana" (o el "ácido nucleico objetivizado como diana"), es un compuesto polimérico o nucleótido, de la forma la cual es conocida por parte de aquellas personas expertas en el arte especializado de la técnica. "Ácido nucleico diana (o "ácido nucleico objetivizado como diana"), tal y como este término se utiliza aquí, en este documento de solicitud de patente, significa un ácido nucleico, en una muestra, la cual debe analizarse, a saber, en donde debe determinarse la presencia, a la no presencia y/o a la cantidad de éste, en una muestra.

45 El término "cebador", tal y como éste se utiliza aquí, en este documento de solicitud de patente, y tal como es conocido por parte de aquéllas personas expertas en el arte especializado de la técnica, se refiere a compuestos oligoméricos, principalmente, a oligonucleótidos, pero, así mismo, también, a oligonucleótidos modificados, los cuales son aptos para cebar la síntesis del DNA, mediante una DNA polimerasa, dependiente de un molde, a saber el extremo 3' y o 3' de, por ejemplo, un cebador, proporciona un grupo 3'-OH, al cual se le pueden unir nucleótidos adicionales, mediante una DNA polimerasa, dependiente de un molde, estableciendo el enlace 3' a 5'-fosfodiéster, a cuyo efecto se utilizan los desoxinucleótidos trifosfatos, y mediante el cual se libera el pirofosfato.

50 Una "sonda", significa así mismo, también, un oligonucleótido natural o modificado. Tal y como es conocido en el arte especializado de la técnica, una sonda, sirve para el propósito de detectar un analito o un "amplificado" (producto de amplificación). En el caso del procedimiento en concordancia con la presente invención, pueden también utilizarse sondas, para detectar los amplificados de los ácidos nucleicos diana. Para este propósito, las sondas, de una forma preferible, portan marcadores.

55 Los "marcadores", a los cuales se les hace frecuentemente referencia como "grupos reporteros", de una forma general, son grupos, los cuales convierten a un ácido nucleico, de una forma particular, oligonucleótidos, u oligonucleótidos modificados, así como, también, a cualquier ácido nucleico unido a éstos, en distinguibles con respecto al resto de la muestra (los ácidos nucleicos los cuales tienen unidos un marcador, pueden también denominarse como compuestos de unión de ácidos nucleicos, marcados, como sondas marcadas, o sencillamente, como sondas). Los marcadores preferidos en concordancia con la presente invención, son los marcadores fluorescentes, los cuales son, por ejemplo, los colorantes fluorescentes, tales como los consistentes en el colorante de fluoresceína, en el colorante de rodamina, en el colorante de cianina, y el colorante de cumarina. Los colorantes fluorescentes preferidos, en concordancia con la presente invención, son los consistentes en los FAM, HEX, JA 270, CAL 635, Coumarin 343, Quasar 705, Cyan 500, CY5.5, LC - Red 640, LC - Red 705.

En el contexto de la presente invención, cualquier cebador y/o sonda, puede modificarse químicamente, a saber, el cebador y/o la sonda, comprende un nucleótido modificado, o un compuesto no nucleótido. La sonda o el cebador es, entonces, un oligonucleótido modificado.

- 5 Un procedimiento preferido de la amplificación de ácidos nucleicos, es la reacción en cadena de polimerasa (PCR - [de sus iniciales, en idioma inglés, correspondientes Polymerase Chain Reaction] -), el cual se da a conocer, entre otras referencias, en las patentes estadounidenses U S n.º 4. 683. 202, U S n.º 4. 683. 195, U S n.º 4. 800. 159, y U S n.º 4. 965. 188. El procedimiento de PCR, emplea, de una forma típica, uno o más cebadores oligonucleótidos, los cuales se unen al molde del ácido nucleico seleccionado (tal como, por ejemplo, el DNA o el RNA). Los cebadores
 10 los cuales son de utilidad para el análisis de ácidos nucleicos, incluyen, a los oligonucleótidos los cuales sean capaces de actuar como un punto de iniciación de la síntesis de ácidos nucleicos, en el ámbito de las secuencias de ácidos nucleicos de los ácidos nucleicos objetivizados como diana. Un cebador, puede purificarse a partir de una digestión de restricción, mediante procedimientos convencionales, o éste puede producirse de una forma sintética. El cebador, de una forma preferible, es un del tipo de hebra individual, para la máxima eficacia en la amplificación, pero, el cebador en cuestión, puede ser del tipo de doble hebra. Un procedimiento para la desnaturalización de ácidos nucleicos, es el consistente en un proceso término o de aplicación de calor. Una "polimerasa termoestable", es una enzima polimerasa, la cual sea estable al calor, a saber, ésta se trata de una enzima, la cual cataliza la formación de los productos de extensión de los cebadores, de una forma complementaria a un molde, y que no se desnaturalice, de una forma irreversible, cuando ésta se somete a elevadas temperaturas, durante el tiempo
 20 necesario para efectuar la desnaturalización de ácidos nucleicos de moldes estándar. De una forma general, la síntesis, se inicia en el extremo 3' de cada cebador, y ésta procede en la dirección 3' a 5', conjuntamente con la hebra del molde. Las polimerasas termoestables, se han aislado, por ejemplo, a partir de los *Thermus flavus*, *T. ruber*, *T. thermophilus*, *T. aquaticus*, *T. lacteus*, *T. rubens*, *Bacillus stearothermophilus*, y *Methanothermus fervidus*. Sin embargo, no obstante, las polimerasas las cuales no son termoestables, pueden también emplearse, así mismo, en ensayos de PCR, siempre y cuando, se reabastezca la enzima.

En el caso en el que, el ácido nucleico molde, se trate de un ácido nucleico de doble hebra, es entonces necesario el separar las dos hebras, antes de que, éste, pueda utilizarse como un molde, en la PCR. La separación de las hebras, puede llevarse a cabo mediante cualquier tipo de desnaturalización, el cual sea apropiado, incluyendo a
 30 medios físicos, químicos, o enzimáticos. Un procedimiento para la separación de las hebras del ácido nucleico, involucra el calentamiento del ácido nucleico, hasta que éste se encuentre predominantemente desnaturalizado (tal como, por ejemplo, un 50 % desnaturalizado, un 60 % desnaturalizado, un 70 % desnaturalizado, un 80 % desnaturalizado, un 90 % desnaturalizado, o un 95 % desnaturalizado). La condiciones del calentamiento, las cuales son necesarias para desnaturalizar el ácido nucleico molde, dependerán, por ejemplo, de la concentración de la sal tampón, y de la longitud de la composición de los nucleótidos de los ácido nucleicos que se estén desnaturalizando, pero, de una forma típica, ésta es la correspondiente a un rango comprendido dentro de unos márgenes, los cuales van desde los 90 °C hasta los 105 °C, durante un transcurso de tiempo dependiente de las características de la reacción, tales como las consistente en la temperatura y en y en la longitud del ácido nucleico. La desnaturalización, se lleva a cabo, de una forma típica, durante un transcurso de tiempo que va desde los aproximadamente 5
 40 segundos, hasta los aproximadamente 9 minutos. Con objeto de no exponer la respectiva polimerasa, tal como, por ejemplo, la Z05 DNA Polimerasa, a tales tipos de altas temperaturas, durante un transcurso de tiempo demasiado prolongado, y arriesgar así, de este modo, la pérdida de enzima funcional, es preferible la utilización de cortas etapas de desnaturalización.

- 45 En una forma preferida de presentación, en concordancia con la presente invención, la etapa de desnaturalización, es de un transcurso de tiempo de hasta 30 segundos, siendo éste, de una forma preferible, de un transcurso de tiempo de hasta 20 segundos, de una forma adicionalmente preferible, de un transcurso de tiempo de hasta 10 segundos, de una forma aún todavía más preferible, de un transcurso de tiempo de hasta 5 segundos, y de una forma mayormente preferible, de un transcurso de tiempo de aproximadamente 5 segundos.

50 En el caso de que, el ácido nucleico molde de doble hebra, se desnaturalice mediante calor, entonces, la mezcla de reacción, se deja enfriar a una temperatura, la cual fomente la reasociación de cada cebador, a su secuencia objetivizada como diana, en los ácidos nucleicos diana.

- 55 La temperatura para la reasociación, de una forma preferible, es la correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van desde los aproximadamente 35 °C, hasta los aproximadamente 70 °C, siendo dicha temperatura, de una forma preferible, la correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes los cuales van desde los aproximadamente 45 °C hasta los aproximadamente 65 °C, de una forma más preferible, la correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes los cuales van desde los aproximadamente 50 °C hasta los aproximadamente 60 °C, y de una forma mayormente preferible, la correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes los cuales van desde los aproximadamente 55 °C hasta los aproximadamente 58 °C. Los tiempos de reasociación, pueden ser de un transcurso de tiempo que va desde los aproximadamente 10 segundos, hasta aproximadamente 1 minuto (tal como, por ejemplo, de un transcurso de tiempo que va desde los aproximadamente 20 segundos hasta los aproximadamente 50 segundos; desde los
 65 aproximadamente 30 segundos hasta los aproximadamente 40 segundos). En este contexto, puede resultar ventajoso, el hecho de utilizar diferentes temperaturas de reasociación, con objeto de incrementar la inclusividad del

respectivo ensayo. En resumen, esto significa el hecho de que, a temperaturas de reasociación relativamente reducidas, los cebadores, pueden también enlazarse a dianas objetivadas, las cuales tengan desajustes individuales, de tal forma que puedan amplificarse así mismo, también, variantes de determinadas frecuencias. Esto puede ser deseable, en el caso de que, determinados organismos, tengan variantes genéticas conocidas o no conocidas, las cuales deben también detectarse. Por otro lado, relativas temperaturas de reasociación, aportan la ventaja de proporcionar una alta especificidad, puesto que a medida que se utilizan mayores temperaturas, decrece continuamente la probabilidad de que, la unión a los cebadores, no coincida de una forma exacta con secuencias objetivadas como diana. Con objeto de beneficiarse de ambos fenómenos, en algunas formas de presentación, en concordancia con la presente invención, es preferible el hecho de que, el procedimiento anteriormente descrito, arriba, en este documento de solicitud de patente, comprenda la reasociación a diferentes temperaturas, de una forma preferible, en primer lugar, a una baja temperatura y, después, a una alta temperatura. En el caso en el que tenga lugar una primera incubación, a una temperatura de 55 °C, durante aproximadamente 5 ciclos, pueden (pre)amplificarse secuencias diana que no coincidan exactamente. A este proceso, le puede seguir por ejemplo, una serie de aproximadamente 45 ciclos, a una temperatura de 58 °C, proporcionando una especificidad más alta, durante la mayor parte del experimento. Así, de este modo, no se pierden variantes genéticas potencialmente importantes, al mismo tiempo que, la especificidad, permanece relativamente alta.

Se procede, a continuación, a ajustar la mezcla de reacción a la temperatura a la cual se fomenta o se optimiza, la actividad de la polimerasa, a saber, a una temperatura la cual sea suficiente como para que acontezca la extensión, a partir del cebador reasociado, para generar productos complementarios al ácido nucleico a ser analizado. La temperatura, debe ser lo suficientemente alta, como para sintetizar el producto de extensión, a partir del cebador el cual se esté reasociando, a un molde de ácido nucleico, pero, ésta, no debe ser tan alta como para desnaturalizar un producto de extensión procedente de su molde complementario (así, por ejemplo, la temperatura la extensión, es generalmente la correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes, los cuales van desde los aproximadamente 40 °C hasta los aproximadamente 80 °C - [tal como, por ejemplo, desde los aproximadamente 50 °C, hasta los aproximadamente 70 °C; como por ejemplo, una temperatura de 60 °C] -). Los tiempos de extensión, pueden ser los correspondientes a un rango comprendido dentro de unos márgenes que van desde los 10 segundos hasta los 5 minutos, siendo dicho rango, de una forma preferible, el correspondiente a un tiempo comprendido dentro de unos márgenes, los cuales van desde los aproximadamente 15 segundos hasta los aproximadamente 2 minutos, de una más preferible, el correspondiente a un tiempo comprendido dentro de unos márgenes, los cuales van desde los aproximadamente 20 segundos hasta los aproximadamente 1, y de una forma mucho más preferible, el correspondiente a un tiempo comprendido dentro de unos márgenes, los cuales van desde los aproximadamente 25 segundos hasta los aproximadamente 35 segundos. Las hebras nuevamente sintetizadas, forman una molécula de doble hebra, la cual puede utilizarse en las etapas sucesivas de la reacción. Las etapas de la separación de las hebras, de la reasociación y del alargamiento, pueden repetirse tantas veces como sea necesario, para producir la deseada cantidad de los productos de amplificación, correspondientes a los ácidos nucleicos objetivados como diana. Los factores limitativos, en la reacción, son los correspondientes a las cantidades de cebadores, la enzima termoestable, y los nucleósidos trifosfatos los cuales se encuentran presentes en la reacción. Las etapas de ciclación (a saber, la desnaturalización, la reasociación y la extensión), de una forma preferible, se repiten por lo menos una vez. Para su 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, de una forma suficiente, para la detección. Generalmente, las etapas de ciclación, se repiten por lo menos un número de 20 veces, pero éstas, pueden repetirse, tantas veces como las correspondientes a un número de 40 veces, de 60 veces, o incluso de 100 veces.

En el ámbito de la presente invención, puede llevarse a cabo una PCR, en la cual, las etapas de reasociación y de extensión, se llevan a cabo en la misma etapa (PCR de una etapa) o, tal y como se ha descrito anteriormente, arriba, en este documento de solicitud de patente (PCR de dos etapas). La realización de la reasociación y de la extensión, conjuntamente, y así, de este modo, bajo las mismas reacciones físicas y químicas, con una enzima apropiada, tal como, por ejemplo, la consistente en la Z05 DNA polimerasa, aporta la ventaja consistente en el ahorro de tiempo, para una etapa adicional, en cada ciclo, y así mismo, también, de abolir la necesidad para un ajuste adicional de la temperatura, entre la reasociación y la extensión. Así, de este modo, la PCR de una etapa, reduce la complejidad total del ensayo respectivo.

En general, se prefieren reducidos tiempo para la amplificación total, ya que, así, de este modo, se reduce el tiempo para la obtención de los resultados, y ello conduce a una diagnosis posiblemente más temprana.

Otros procedimientos de amplificación de ácido nucleicos, los cuales se utilizan en el contexto de la presente invención, comprenden a los consistentes en los Reacción en cadena de la ligasa (LCR, de sus iniciales en idioma inglés, correspondientes a Ligase Chain Reaction; Wu D. Y. y Wallace R. B., *Genomics* 4 (1989) 560 - 69; y Barany F., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 (1991) 189 - 193); Reacción en cadena de la polimerasa ligasa - Polymerase Ligase Chain Reaction - (Barany F., *PCR Methods and Applic.* 1 (1991) 5 - 16); Gap-LCR (documento de patente internacional WO 90/01 069); Reacción en cadena de reparación - Repair Chain Reaction - (documento de patente europea EP 0 439 182 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 de patente internacional WO 92/08 808), y NASBA (documento de patente estadounidense U S 5. 130. 238). Adicionalmente, existe la Amplificación de

desplazamiento de hebras (SDA - de sus iniciales, en idioma inglés, correspondientes a Strand displacement amplification); la Amplificación mediatizada por transcripción (TMA - de sus iniciales, en idioma inglés, correspondientes a Transcription mediated amplification), y la (TMA), and Qb-amplification, - Amplificación de la replicasa Qb -, (para una revisión, véase, por ejemplo, Whelen A. C. y Persing D. H., Annu. Rev. Microbiol. 50 (1996) 349 - 373; Abramson R. D. y Myers T. W., Curr Opin Biotechnol 4 (1993) 41 - 47).

Una "polimerasa con actividad transcriptasa inversa", es una ácido nucleico polimerasa, capaz de sintetizar DNA, en base a un molde de RNA. Ésta es así mismo, también capaz de la formación de un DNA de doble hebra, una vez que, el RNA, se haya transcrito inversamente, convirtiéndose en un cDNA de hebra individual. En una forma preferida de presentación de la presente invención, la polimerasa con actividad transcriptasa inversa, es termoestable.

En una forma preferida de presentación, el procedimiento de la presente invención, comprende incubar una muestra la cual comprende un molde de RNA, con un cebador oligonucleótido, lo suficientemente complementario al citado molde de RNA, como para hibridar con éste último, y una DNA polimerasa, preferiblemente termoestable, en presencia de por lo menos todos los cuatro desoxirribonucleótidos trifosfatos naturales, o modificados, en un tampón apropiado, el cual comprenda un tampón de ion metálico, el cual, en una forma preferida de presentación, tapona a ambos, el valor pH y la concentración del ion metálico. La incubación, se lleva a cabo a una temperatura suficiente como para que, el citado cebador, hibride al citado molde de RNA, y que la citada DNA polimerasa, catalice la polimerización de los citados desoxirribonucleótidos trifosfatos, para forma una secuencia de cDNA polimerasa, complementaria a la secuencia del citado molde de RNA.

Tal y como éste se utiliza aquí, en este documento de solicitud de patente, el término "cDNA", se refiere a una molécula de DNA, complementaria (es decir, un DNA complementario), la cual se ha sintetizado mediante la utilización de una hebra de ácido ribonucleico (RNA), como un molde. El RNA, puede ser, por ejemplo, el consistente en un mRNA, en un tRNA, en un cRNA, o en cualquier otra forma de RNA, tal como la consistente en un RNA vírico. El cDNA, puede ser de hebra individual, de doble hebra, o éste puede ser de tipo de hidrógeno unido a una molécula de RNA complementario, tal como en un híbrido de RNA/cDNA.

Un cebador apropiado para reasociación a un molde de RNA, puede también ser así mismo apropiado para la amplificación mediante PCR. Para la PCR, un segundo cebador, complementario a la hebra de DNA, inversamente transcrita, proporciona un sitio de iniciación, para la síntesis de un producto de extensión.

En la amplificación a una molécula de RNA, mediante una DNA polimerasa, la primera reacción de extensión, es una transcripción inversa, mediante la utilización de un molde de RNA, y se produce una hebra de DNA. La segunda reacción de extensión, mediante la utilización de un molde de DNA, produce una molécula de DNA de doble hebra. Así, de este modo, la síntesis de una hebra de DNA complementaria, a partir de un molde de RNA, mediante una DNA polimerasa, proporciona un material de partida, para la amplificación.

Las DNA polimerasas termoeestables, pueden utilizarse en una reacción de amplificación/transcripción inversa de enzimas, acoplada. El término "homogéneo", en este contexto, se refiere a una reacción de adición individual, de dos etapas, para la transcripción inversa y la amplificación del RNA objetivizado como diana. Mediante el término homogéneo, tal y como éste se utiliza aquí, en este documento de solicitud de patente, se pretende dar a entender el hecho consistente en que, a continuación de la etapa de la transcripción inversa (RT - [de sus siglas, en idioma inglés, correspondientes a reverse transcription] -), no hay ninguna necesidad de abrir el recipiente de reacción, o de otro modo, de ajustar los componentes de reacción, previamente a la etapa de amplificación. En una reacción de RT/PCR, no homogénea, a continuación de la transcripción inversa, y previamente a la amplificación de uno o de más componentes de reacción, tales como los consistentes en los reactivos de amplificación, por ejemplo, se ajustan, se añaden o se diluye, para lo cual, el recipiente de reacción, debe abrirse, o por lo menos, debe procederse a la manipulación de sus contenidos. Mientras que, ambas formas de presentación, en concordancia con la presente invención, la homogénea, y la no homogénea, se encuentran comprendidas en el ámbito de la presente invención, el formato homogéneo, para la RT/PCR, es la que forma de presentación la cual se prefiere.

La transcripción inversa, es una etapa importante, en un procedimiento de RT/PCR. Se conoce, por ejemplo, en el arte especializado de la técnica, el hecho consistente en que, los moldes de RNA, muestran una tendencia hacia formación de estructuras secundarias, la cuales pueden impedir o dificultar la unión y/o el alargamiento de los cebadores, de la hebra de cDNA, mediante la respectiva transcriptasa inversa. Así, de este modo, unas temperaturas relativamente altas, para una reacción de RT, son ventajosas, con respecto a la eficacia de la transcripción. Por otro lado, el aumento de la temperatura de incubación, implica así mismo, también, un alta especificidad, a saber, los cebadores de RT, no se reasociarán, a las secuencias las cuales exhiben una discrepancia o desajuste, con respecto a la secuencia o a las secuencias esperadas. De una forma particular, en el caso de múltiples RNAs diana diferentes, puede ser deseable, así mismo, también, el transcribir y, subsiguientemente, amplificar y detectar, secuencias con discrepancias individuales, tal como, por ejemplo, en el caso de una posible presencia de subhebras no conocidas o raras, o subespecies de organismos, en la muestra de fluido.

Con objeto de beneficiarse de ambas ventajas las cuales se han descrito anteriormente, arriba, a saber, de la reducción de estructuras secundarias, y de la transcripción inversa de moldes con discrepancias, es un aspecto de la presente invención, el llevar a cabo la incubación de la RT (transcriptasa inversa), a más de una diferente temperatura.

5 Así, por lo tanto, un aspecto preferido de la presente invención, es el procedimiento el cual se ha descrito anteriormente, arriba, en este documento de solicitud de patente, en donde, en la etapa ii, la incubación de la polimerasa, con actividad transcriptasa inversa, se lleva a cabo a diferentes temperaturas, correspondientes a un rango comprendido dentro de unos márgenes, los cuales van desde los 30 °C hasta los 75 °C, llevando a cabo, de una forma preferible en un rango de temperaturas comprendido dentro de unos márgenes, los cuales van desde los 45 °C hasta los 70 °C, y de una forma más preferible, en un rango de temperaturas comprendido dentro de unos márgenes, los cuales van desde los 55 °C hasta los 65 °C.

15 Como un importante aspecto adicional de la transcripción inversa, las etapas de RT prolongadas, pueden dañar los moldes de DNA, los cuales puedan encontrarse presentes en la muestra de fluido. Si la muestra de fluido contiene ambas, las especies de RNA y de DNA, es entonces favorable, el hecho de mantener la duración de las etapas de RT, tan reducida como sea posible, pero, al mismo tiempo, asegurando la síntesis de suficientes cantidades de cDNA, para la subsiguiente amplificación y la opcional detección de los amplificados (productos de amplificación).

20 Así, de este modo, un aspecto preferido de la presente invención es el procedimiento el cual se ha descrito anteriormente, arriba, en donde, en la etapa ii, el período de tiempo, es de hasta 30 minutos, de hasta 20 minutos, de hasta 15 minutos, de hasta 12,5 minutos, de hasta 10 minutos, de hasta 5 minutos, o de hasta 1 minuto.

25 Un aspecto adicionalmente preferido de la presente invención, es el procedimiento el cual se ha descrito anteriormente, arriba, en donde, la polimerasa con actividad transcriptasa inversa, y que comprende una mutación, se selecciona de entre el grupo consistente en

a a. una CS5 DNA polimerasa

30 b. a una CS6 DNA polimerasa

c. a una Thermotoga maritima DNA polimerasa

35 d. a una Thermus aquaticus DNA polimerasa

e. a una Thermus thermophilus DNA polimerasa

f. a una Thermus flavus DNA polimerasa

40 g. a una Thermus filiformis DNA polimerasa

h. a una Thermus sp. sps17 DNA polimerasa

i. a una Thermus sp. Z05 DNA polimerasa

45 j. a una Thermotoga neapolitana DNA polimerasa

k. a una Termosipho africanus DNA polimerasa

50 l. a una Thermus caldophilus DNA polimerasa

Son particularmente apropiados, para estos requerimientos, las enzimas las cuales portan una mutación en el dominio de la polimerasa, la cual mejore e intensifique la eficacia de la transcripción inversa, en una tasa de extensión más rápida.

55 Así, por lo tanto, un aspecto de la presente invención, es el consistente en el procedimiento el cual se ha descrito anteriormente, arriba, en este documento de solicitud de patente, en donde, la polimerasa con actividad transcriptasa inversa, es una polimerasa la cual comprende una mutación, la cual confiere una tasa de extensión de ácido nucleico incrementada y/o una actividad transcriptasa inversa mejorada, con relación a la respectiva polimerasa del tipo salvaje.

60 En una forma más preferida de presentación, en el procedimiento descrito anteriormente, en concordancia con la presente invención, la polimerasa con actividad transcriptasa inversa, es una polimerasa, la cual comprende una mutación que confiere actividad transcriptasa inversa incrementada, con relación a la respectiva polimerasa del tipo salvaje.

65

Las polimerasas las cuales portan mutaciones puntuales, para convertirla en particularmente de utilidad, en el contexto de la presente invención, se dan a conocer en el documento de patente internacional WO 2008/046 612. De una forma particular, las polimerasas preferidas a ser utilizadas en el contexto de la presente invención, son DNA polimerasas mutadas, las cuales comprenden por lo menos el siguiente motivo o formación, en el dominio de la polimerasa:

T-G-R-L-S-S-X_{b7}-X_{b8}-P-N-L-Q-N; en donde, X_{b7}, es un aminoácido, seleccionado de entre S o T, y en donde, X_{b8}, es un aminoácido, seleccionado de entre G, T, R, K, o L, y en donde, la actividad exonucleasa 3'-5', tiene una tasa de extensión del ácido nucleico incrementada y/o una eficacia de la actividad transcriptasa inversa mejorada, con relación a la respectiva polimerasa del tipo salvaje, y en donde, en la citada DNA polimerasa del tipo salvaje, X_{b8}, es un aminoácido, seleccionado de entre D, E o N.

Un ejemplo particularmente preferido, en concordancia con la presente invención, es el consistente en los mutantes de DNA polimerasa termoestable, de la especie *Thermus* Z05 (especie ésta, la cual se encuentra descrita, por ejemplo, en el documento de patente estadounidense U S 5. 455. 170), comprendiendo, las citadas variaciones, mutaciones en el dominio de la polimerasa, si se compara con la respectiva enzima Z05 del tipo salvaje. Se prefiere, de una forma especial, en el procedimiento en concordancia con la presente invención, una DNA polimerasa Z05, mutante, en donde, el aminoácido, en la posición 580, se selecciona de entre el grupo consistente en G, T, R, K y L.

Para la transcriptasa inversa, mediante la utilización de una polimerasa termoestable, se prefiere el Mn²⁺, como el catión diferente, y éste se incluye, de una forma típica, como una sal, tal como, por ejemplo, una sal consistente en el cloruro de manganeso (MnCl₂), el acetato de manganeso (Mn(OAc)₂), o el sulfato de manganeso (MnSO₄). En el caso en el que se incluya MnCl₂, en una reacción en una reacción, la cual contenga un tampón Tricina 50 mM, por ejemplo, el MnCl₂, se encuentra generalmente presente en una concentración correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes situados entre 0,5 mM - 7,0 mM; prefiriéndose una concentración correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes situados entre 0,8 mM - 1,4 mM, cuando se utilizan 200 mM de cada uno de los dGTP, dATP, dUTP, y dCTP; y prefiriéndose, de una forma mayormente preferible, una concentración de MnCl₂, correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes situados entre 2,5 mM - 3,5 mM. De una forma adicional, se prefiere así mismo, también, en el contexto de la presente invención, el uso de Mg²⁺, como un catión divalente, para la transcripción inversa.

Puesto que, en el ámbito de la presente invención, para transcribir inversamente los ácidos nucleicos RNA diana, en cDNA, preservando los ácidos nucleicos DNA diana, de tal forma que, ambos, el cDNA y el DNA, puedan utilizarse, para la subsiguiente amplificación, el procedimiento en concordancia con la presente invención, es particularmente de utilidad, para la amplificación de ácidos nucleicos diana, derivados de ambos organismos, los cuales tengan un RNA, u organismos que tienen el mismo genoma. Esta ventaja, incrementa, de una forma considerable, el espectro de diferentes organismos, especialmente, patógenos, los cuales pueden analizarse bajo unas condiciones físicas idénticas.

Así, por lo tanto, un aspecto preferido de la presente invención es el consistente en el procedimiento el cual se encuentra descrito anteriormente, arriba, en este documento de solicitud de patente, en donde, por lo menos dos ácidos nucleicos diana, comprenden RNA y DNA.

Especialmente, debido a una óptima temperatura apropiada, las enzimas, tales como la consistente en la Tth polimerasa o, de una forma preferible, la polimerasa DNA Z05 mutante, la cual se ha mencionado anteriormente, arriba, la cual se ha mencionado anteriormente, arriba, en este documento de solicitud de patente, son apropiada, para llevar a cabo la subsiguiente etapa de la amplificación de los ácidos nucleicos objetivados como diana. El aprovechamiento de la misma enzima, para ambas, la transcripción inversa, y la amplificación, contribuye a una fácil realización del proceso, y ello facilita su automatizado, puesto que, las muestras de fluido, no necesitan ser manipulados, entre la RT y la etapa de amplificación.

Así, por lo tanto, en una forma preferida de presentación, en concordancia con la presente invención, en el procedimiento el cual se ha descrito anteriormente, arriba, en este documento de solicitud de patente, se utiliza la misma polimerasa, con la misma actividad transcriptasa inversa, en la etapa ii, y en la etapa iii. De una forma preferible, la enzima, es la consistente en una DNA polimerasa Z05, mutante, la cual se ha descrito anteriormente, arriba, en este documento de solicitud de patente.

Con objeto de no exponer a la polimerasa y otros componentes de la mezcla de reacción, los cuales se utilizan en el contexto de la presente invención, a elevadas temperaturas, durante unos transcurros de tiempo, los cuales sean más prolongados que lo necesario, en una forma preferida de presentación, en concordancia con la presente invención, las etapas en las cuales se somete a la polimerasa y otros componentes de la mezcla de reacción en cuestión, a unas temperaturas que se encuentren por encima de un valor de 90 °C, se realizan durante un transcurso de tiempo de hasta 20 segundos, realizándose éstas, de una forma preferible, durante un transcurso de tiempo de hasta 15 segundos, realizándose, de una forma más preferible, durante un transcurso de tiempo de hasta 10 segundos, de una forma mucho más preferible, durante un transcurso de tiempo de hasta 5 segundos, y de una mayormente preferible, durante un transcurso de tiempo de hasta 5 segundos. Esto reduce el tiempo necesario para

la obtención de resultados, y reduce así mismo, también, el tiempo global requerido para la realización del ensayo.

En esta configuración homogénea, puede ser considerablemente ventajosa, el hecho de sellar herméticamente los recipientes de reacción, para iniciar la RT (transcripción inversa) y la amplificación, reduciéndose, mediante ello, la contaminación. El sellado hermético, puede llevarse a cabo, por ejemplo, procediendo a aplicar un folio, el cual, de una forma preferible, se trate de un folio transparente, aplicando un tapón de obturación, o mediante la adición de aceite, a los recipientes de reacción, y formando así, de este modo una fase lipofílica, como capa de sellado, en la parte superior del fluido.

Así, de este modo, un aspecto preferido de la presente invención, es el procedimiento el cual se ha descrito anteriormente, arriba, en este documento de solicitud de patente, el cual comprende, de una forma adicional, entre la etapa i y la etapa ii, la etapa de sellar de una forma hermética, por lo menos dos recipientes de reacción.

La diana de la etapa de amplificación, puede ser una molécula híbrida de RNA/DNA. La diana, puede un ácido nucleico de hebra individual, o bien, ésta puede ser un ácido nucleico de doble hebra. Si bien el procedimiento de PCR más ampliamente utilizado, utiliza una diana de doble hebra, ello no es no obstante necesario. Después del primer ciclo de amplificación, de un DNA diana de hebra individual, la mezcla de reacción, contiene una molécula de DNA de doble hebra, consistente en la diana de hebra individual diana, y una nueva hebra complementaria sintetizada. De una forma similar, a continuación del primer ciclo de amplificación de un RNA/cDNA diana, la mezcla de reacción, contiene una molécula de cDNA de doble hebra. En este punto, se desarrollan sucesivos ciclos de amplificación, tal y como se ha descrito anteriormente, arriba, en este documento de solicitud de patente.

Puesto que, la amplificación del ácido nucleico, de una forma especial, en el caso de la PCR, si bien no únicamente en cuanto a ésta, resulta muy eficiente, el que ésta se lleva a cabo como una reacción de ciclación, un aspecto preferido de la presente invención, es el procedimiento el cual se ha descrito anteriormente, arriba, en este documento de solicitud de patente, en donde, la reacción, en la etapa iii, consiste en múltiples etapas de ciclación.

Los procedimientos de detección del ácido nucleico, son conocidos, por parte de aquéllas personas expertas en el arte especializado de la técnica, y éstos se encuentran descritos en libros de texto estándar, tales como el de Sambrook J. *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, - Clonación molecular: Un manual de laboratorio -, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989, y el de Ausubel F. *et al.*: Current Protocols in Molecular Biology 1987, - Protocolos actuales en Biología Molecular, J. Wiley and Sons, NY. Puede también haber etapas de purificación adicionales, antes de la etapa de detección del ácido nucleico, tal como, por ejemplo, una etapa de precipitación. Los procedimientos de detección, pueden incluir, si bien no de una forma limitativa en cuanto a éstos, al enlace o unión o el intercalado de colorantes específicos, tales como los consistentes en el bromuro de yodo, el cual se intercala en el ámbito del DNA de doble hebra, y después de ello, cambia su fluorescencia. El ácido nucleico purificado, puede también separarse, así mismo, mediante procedimientos electroforéticos, de una forma opcional, después de la digestión de restricción, y visualizarse, después de ello. Existen así mismo, también, ensayos a base de cebadores, los cuales aprovechan la hibridación del oligonucleótido, a secuencias específicas y la subsiguiente detección del híbrido.

Es preferible, el hecho de detectar los ácidos nucleicos diana amplificados, durante o después de la reacción de amplificación, con objeto de evaluar el resultado del análisis. De una forma particular, para la detección a tiempo real, es ventajoso el hecho de usar sondas de ácido nucleico.

Así, de este modo, un aspecto preferido de la presente invención, es el procedimiento el cual se ha descrito anteriormente, arriba, en este documento de solicitud de patente, en donde, la etapa de ciclación, comprende una etapa de amplificación y una etapa de hibridación, comprendiendo, la citada etapa de hibridación, la hibridación de los ácidos nucleicos amplificados mediante sondas.

Puede ser favorable, el hecho de efectuar un seguimiento de control de la amplificación, a tiempo real, es decir, el detectar los ácidos nucleicos objetivados como diana/o sus amplificados (productos de amplificación), durante la amplificación en sí misma.

Así, por lo tanto, un aspecto de la presente invención, reside en el procedimiento el cual se ha descrito anteriormente, arriba, en este documento de solicitud de patente, en donde, las sondas, se marcan mediante porciones fluorescentes donantes, y una correspondiente porción fluorescente aceptora.

Los procedimientos los cuales se han presentado anteriormente, arriba, en este documento de solicitud de patente, se basan, de una forma preferible, en la Transferencia de Energía de Resonancia de la Fluorescencia (FRET - [de sus iniciales, en idioma inglés, correspondiente a Fluorescence Resonance Energy Transfer] -). Una porción fluorescente donador (donante), es la consistente en la fluoresceína, y sus correspondientes porciones fluorescentes aceptoras representativas, incluyen a las LC-Red 640, LC-Red 705, Cy5, y Cy5.5. De una forma típica, la detección, incluye la excitación de la muestra, a una longitud de onda absorbida mediante la porción fluorescente donante (donor), y la visualización y/la medición de la longitud de onda emitida por la correspondiente porción fluorescente aceptora. En el procedimiento en concordancia con la presente invención, la detección, de una forma preferible,

viene seguida de una cuantificación de la FRET. De una forma preferible, la detección, se lleva a cabo después de cada etapa de ciclación. De la forma mayormente preferible, la detección, se lleva a cabo a tiempo real. Mediante la utilización de una instrumentación de PCR a tiempo real, comercialmente disponible en el mercado (tal como, por ejemplo, la LightCycler™ o la TaqMan®), la amplificación mediante PCR y la detección del producto de amplificación, puede combinarse, en una cubeta cerrada individual, con un tiempo de ciclación notablemente reducido. Puesto que, la detección, acontece de una forma simultánea con la amplificación, los procedimientos de PCR a tiempo real, evitan la necesidad para la manipulación del producto de amplificación, y disminuyen el riesgo de contaminación cruzada, entre los productos de amplificación. La PCR a tiempo real, reduce de una forma considerable, el tiempo requerido para la realización del proceso de PCR, y es una atractiva alternativa, a las técnicas convencionales de PCR, en el laboratorio clínico.

Los siguientes documentos de solicitud de patente, describen procedimientos de PCR a tiempo real, tal y como éstos se utilizan en la tecnología LightCycler™ technology: documento de solicitud de patente internacional WO 97/46 707, documento de solicitud de patente internacional WO 97/46 714 y documento de solicitud de patente internacional WO 97/46 712. El instrumento LightCycler™, es un ciclador térmico rápido, combinado con un fluorómetro de microvolumen, utilizando ópticas de alta calidad. Esta técnica rápida de termociclación, utiliza cubetas de vidrio, como recipientes de reacción. Los procesos de calentamiento y de enfriamiento de la cámara de reacción, se controlan mediante la alternancia de aire caliente y de aire del ambiente. Debido a reducida masa de aire, y el alto factor de relación del área de superficie con respecto al volumen de las cubetas, pueden alcanzarse, muy rápidamente, tasas de intercambio de temperatura, en el interior de la cámara térmica.

La tecnología TaqMan®, utiliza una sonda de hibridación de hebra individual, marcada con dos porciones fluorescentes. Cuando una primera porción fluorescente, se excita mediante luz de una longitud de onda apropiada, entonces, la energía absorbida, se transfiere a una segunda porción fluorescente, en concordancia con los principios de la FRET (Transferencia de Energía de Resonancia de la Fluorescencia). La segunda porción fluorescente es, de una forma general, una molécula extintora. Las tinturas o colorantes fluorescentes típicos utilizados en este formato son, por ejemplo, entre otros, los FAM, HEX, CY5, JA270, Cyan y CY5.5. Durante la etapa de reasociación de la reacción de PCR, la sonda de hibridación marcada, se une al ácido nucleico objetivizado como diana (es decir, el producto de amplificación), y se degrada, mediante la actividad exonucleasa 5' a 3' de la polimerasa Taq, o de otra polimerasa apropiada, tal y como es conocido, por parte de aquellas personas expertas en el arte especializado de la técnica, tal como la preferida polimerasa Z05 mutante, durante la subsiguiente fase de elongación. Como resultado de ello, la porción fluorescente excitada, y la porción extintora, se convierten en espacialmente separadas, la una con respecto a la otra. Como consecuencia de ello, después de la excitación de la primera porción fluorescente, en la ausencia de la extintora, puede detectarse la emisión fluorescente, a partir de la primera porción fluorescente.

En ambos formatos de detección, los cuales se han descrito anteriormente, arriba, en este documento de solicitud de patente, la intensidad de la señal emitida, puede correlacionarse con el número de moléculas de ácido nucleico diana originales.

Como una alternativa a la FRET (Transferencia de Energía de Resonancia de la Fluorescencia), un producto de amplificación, puede detectarse mediante la utilización de una tintura o colorante de unión al DNA de doble hebra, tal como el consistente en una tintura o colorante fluorescente, de unión al DNA (tales como, por ejemplo, los consistentes en los SYBRGREEN I® o SYBRGOLD® (sondas moleculares)). Al producirse la interacción con el ácido nucleico de doble hebra, tales tipos de colorantes o tinturas fluorescentes de unión al DNA, emiten una señal de fluorescencia, después de la excitación mediante luz, a una longitud de onda apropiada. Puede también utilizarse una tintura o colorante de unión al ADN de doble hebra, tal como el consistente en un colorante o tintura intercalada en el ácido nucleico. Cuando se utilizan colorantes o tinturas de unión al ADN de doble hebra, entonces, se lleva a cabo, de una forma usual, un análisis de la curva de fusión, para la confirmación de la presencia del producto de amplificación.

Las balizas moleculares (u oligobalizas), en conjunción con la FRET (Transferencia de Energía de Resonancia de la Fluorescencia), pueden también utilizarse, para detectar la presencia de un producto de amplificación, mediante la utilización de procedimientos de PCR a tiempo real, de la presente invención. La tecnología de las balizas moleculares, utiliza una sonda de hibridación, marcada con una primera porción fluorescente, y una segunda porción fluorescente. La segunda porción fluorescente, de una forma general, se trata de una (porción) extintora, y los marcadores fluorescentes, se encuentran localizados, de una forma típica, en cada extremo de la sonda. La tecnología de las balizas moleculares, utiliza un oligonucleótido sonda, que tiene secuencias las cuales permiten una formación de estructuras secundarias (tal como, por ejemplo, una horquilla capilar). Como resultado de la formación de estructuras secundarias, en el ámbito de la sonda, ambas porciones fluorescentes, se encuentran en una proximidad espacial, cuando la sonda se encuentra en solución. Después de la hibridación a los productos de amplificación, la estructura de la sonda, se rompe y, las porciones fluorescentes, se separan, la una con la otra, de tal forma que, después de la excitación mediante luz de una longitud de onda apropiada, pueda detectarse la emisión de la primera porción fluorescente.

Así, de este modo, un procedimiento preferido, en concordancia con la presente invención, es el procedimiento el

cual se ha descrito anteriormente, arriba, en este documento de solicitud de patente, en el que se utiliza la FRET (Transferencia de Energía de Resonancia de la Fluorescencia), en donde, las citadas sondas, comprenden una secuencia de ácido nucleico, la cual permite la formación de estructuras secundarias, en donde, la citada formación de estructuras secundarias, tiene como resultado una proximidad espacial, entre las citadas primera y segunda porción fluorescente.

Una Transferencia de Energía de Resonancia de la Fluorescencia (FRET), la cual sea eficiente, puede tener únicamente lugar, cuando las porciones fluorescentes, se encuentran en una directa proximidad local directa, y cuando el espectro de emisión de la porción fluorescente, se solapa con el espectro de absorción de la porción fluorescente de la porción fluorescente aceptora.

Así, por lo tanto, en una forma preferida de presentación de la presente invención, las citadas porciones fluorescentes donante y aceptora, se encuentran en el ámbito de no más de 5 nucleótidos de cada una, en la citada sonda.

En una forma de presentación adicionalmente preferida, en concordancia con la presente invención, la citada porción fluorescente es una porción extintora.

Tal y como se ha descrito anteriormente, arriba, en este documento de solicitud de patente, en el formato TaqMan, durante la etapa de reasociación de la reacción de PCR, la sonda de hibridación marcada, se une al ácido nucleico objetivizado como diana (a saber, el producto de amplificación), y éste se degrada, mediante la actividad exonucleasa 5' a 3', de la polimerasa Taq, o de otra polimerasa la cual sea apropiada, tal y como se conoce por parte de aquéllas personas expertas en el arte especializado de la técnica, tal como la preferida polimerasa Z05 mutante, durante la subsiguiente fase de elongación.

Así, de este modo, en una forma preferida de presentación, en el procedimiento en concordancia con la presente invención, la amplificación, emplea una enzima polimerasa, la cual tiene actividad exonucleasa 5' a 3'.

Es adicionalmente ventajoso, en concordancia con la presente invención, el seleccionar de una forma cuidadosa, la longitud del amplicón el cual se obtiene, como resultado del procedimiento el cual se ha descrito anteriormente, arriba, en este documento de solicitud de patente. De una forma general, unos amplicones relativamente cortos, incrementan la eficacia de la reacción de amplificación. Así, de este modo, un aspecto preferido de la presente invención, es el consistente en el procedimiento el cual se ha descrito anteriormente, arriba, en este documento de solicitud de patente, en donde, los fragmentos amplificados, comprenden un número de hasta 450 bases, de una forma preferible, un número de hasta 300 bases, de una forma más preferible, un número de hasta 300 bases, y de una forma mucho más preferible, un número de hasta 150 bases.

En concordancia con la presente invención, puede ser adicionalmente ventajoso, el hecho de utilizar ácidos nucleicos de control. Se conoce, en el arte especializado de la técnica, el hecho consistente en que, ambos, los controles cualitativos y cuantitativos, son de una significancia considerable, de una forma particular, en un entorno de diagnóstico.

En este contexto, un ácido nucleico de control, que sirva como un "ácido nucleico estándar cuantitativo", es apto para ser utilizado, como referencia, con objeto de cuantificar, a saber, para determinar la cantidad de ácidos nucleicos diana. Para este propósito, uno o más ácidos nucleicos estándar, cuantitativos, experimentan la totalidad de las etapas posibles de preparación de las muestras, conjuntamente con los ácidos nucleicos diana. De una forma adicional, se procesa un ácido nucleico estándar, cuantitativo, durante la totalidad del procedimiento, en el ámbito de la misma reacción. Éste debe generar, de una forma directa o de una forma indirecta, una señal detectable, en ambas, la presencia o la ausencia del ácido nucleico diana. Para este propósito, la concentración del ácido nucleico estándar, cuantitativo, debe optimizarse de una forma cuidadosa, en cada test de ensayo, con objeto de no interferir con la sensibilidad, pero, con objeto de generar una señal detectable, también, por ejemplo, a unas concentraciones diana, muy altas. En términos del límite de detección (LOD, - [de sus iniciales, en idioma inglés, correspondientes a limit of detection] - véase posteriormente, más abajo), del respectivo ensayo, el rango de concentración para el "ácido nucleico estándar, cuantitativo" es, de una forma preferible, el correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes situados entre 20 - 5000 x LOD, siendo éste, de una forma preferible, el correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes situados entre 20 - 1000 x LOD, y de una forma mayormente preferible, el correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes situados entre 20 - 5000 x LOD. La concentración final del ácido estándar cuantitativo, en la mezcla de reacción, depende del rango de medición cuantitativo alcanzado. El ácido nucleico estándar cuantitativo, puede ser, por ejemplo, DNA, RNA o PNA, DNA o RNA blindados, y formas modificadas de éstos.

"Límite de detección", o "LOD" (de sus siglas en idioma inglés), significa la cantidad o concentración más baja detectable, de un ácido nucleico, en una muestra. Un reducido límite de detección (reducido "LOD"), corresponde a una alta sensibilidad, y viceversa. El "LOD", se expresa, de una forma usual, bien ya sea por mediación de la unidad "cp/ml", de una forma particular, si el ácido nucleico, es un ácido nucleico vírico, o bien a sea como UI/ml. "Cp/ml", significa "copias por mililitro", en donde, "copia", es una copia del respectivo ácido nucleico. UI/ml, significa

"Unidades internacionales/ml" (expresándose, así mismo, también, como IU/ml, - [de sus siglas, en idioma inglés, correspondientes a "International units/ml"] -), con referencia a los estándares de la OMS (Organización Mundial de la Salud - [o WHO, de sus siglas, en idioma inglés, correspondientes a World Health Organization] -).

5 Un procedimiento ampliamente utilizado, para calcular un "LOD" (límite de detección), es el consistente en el "Análisis probit", el cual se trata de un procedimiento de análisis de la relación entre un estímulo (dosis), y la respuesta cuantitativa (todo o nada). En un experimento típico de respuesta cuantitativa, a grupos de animales, se les proporciona diferentes dosis de fármaco. Se procede a registrar el porcentaje que se muere, a cada nivel de dosis. Estos datos, pueden entonces analizarse, mediante la utilización de un Análisis Probit. El Modelo Probit, asume el hecho consistente en que, el porcentaje de respuesta, se encuentra relacionado con la dosis log (logaritmo de la dosis), como la distribución normal acumulativa. Esto significa el hecho de que, las dosis log, pueden utilizarse como variables para leer el porcentaje que muere a partir del acumulativo normal. Mediante la utilización de la distribución normal, en lugar de otras distribuciones de probabilidad, se influye en la tasa de respuesta pronosticada, en los extremos alto y bajo, de las posibles dosis, pero ello tiene poca influencia, en las cercanías del valor medio o central.

15 El análisis Probit, puede aplicarse a distintos "hit rates" o porcentajes de éxito. Tal y como es conocido, en el arte de la técnica especializada, un "hit rate" o "porcentaje de éxito", se expresa, de una forma usual, en porcentaje (%), y éste indica el porcentaje de resultados positivos, a una concentración específica de un analito. Así, por ejemplo, un LOD o límite de detección, puede determinarse como siendo el 95 % de hit rate o porcentaje de éxito, lo cual significa el hecho de que, el LOD, se calcula para un ajuste, en el cual, un porcentaje del 95 % de resultados válidos, son positivos.

25 En una forma preferida de presentación, en concordancia con la presente invención, el procedimiento descrito anteriormente, arriba, en este documento de solicitud de patente, proporciona un LOD o límite de detección, correspondiente a un valor de copias por mililitro, comprendido dentro de unos márgenes, los cuales van desde 1 cp/ml hasta 100 cp/ml, o un LOD en unidades internacionales por mililitro, correspondiente a valor comprendido dentro de unos márgenes, los cuales van desde 0,5 UI/ml hasta las 50 UI/ml, siendo dichos valores de LOD o límite de detección, de una forma preferible, los correspondientes a un valor comprendido dentro de unos márgenes, los cuales van desde 1 cp/ml hasta 75 cp/ml, o desde 0,5 UI/ml hasta 30 UI/ml, y de una forma todavía más preferible, los correspondientes a un valor comprendido dentro de unos márgenes, los cuales van desde 1 cp/ml hasta 25 cp/ml, o desde 1 UI/ml hasta 20 UI/ml.

35 Con respecto a algunos ejemplos de posibles ácidos nucleicos diana, procedentes de determinados virus, el procedimiento en concordancia con la presente invención, proporciona, de una forma preferible, los siguientes LODs o límites de detección:

- 40 • HIV: hasta 60 cp/ml, de una forma preferible, hasta 50 cp/ml, de una forma aún más preferible, hasta 40 cp/ml, de una forma aún más preferible, hasta 30 cp/ml, de una forma aún más preferible, hasta 20 cp/ml, y de una forma aún más preferible, hasta 15 cp/ml.
- 45 • HBV: Hasta 10 IU/ml, de una forma más preferible, hasta 7,5 UI/ml, y de una forma aún más preferible, hasta 5 UI/ml
- HCV: Hasta 10 IU/ml, de una forma más preferible, hasta 7,5 UI/ml, y de una forma aún más preferible, hasta 5 UI/ml
- 50 • WNV I: hasta 20 cp/ml, de una forma preferible, hasta 15 cp/ml, y de una forma aún más preferible, hasta 10 cp/ml
- WNV II: hasta 20 cp/ml, de una forma más preferible, hasta 15 cp/ml, de una forma aún más preferible, hasta 10 cp/ml, y de una forma aún más preferible, hasta 5 cp/ml
- 55 • JEV: hasta 100 cp/ml, de una forma preferible, hasta 75 cp/ml, de una forma aún más preferible, hasta 50 cp/ml, y de una forma aún más preferible, hasta 30 cp/ml
- SLEV: hasta 100 cp/ml, de una forma preferible, hasta 75 cp/ml, de una forma aún más preferible, hasta 50 cp/ml, de una forma aún más preferible, hasta 25 cp/ml, y de una forma aún más preferible, hasta 10 cp/ml.

60 Un ejemplo de cómo realizar el cálculo de los resultados cuantitativos, en el formato TaqMan, basado en un ácido nucleico estándar, es el que se describe a continuación: un título, se calcula a partir del "input" o datos de entrada de los valores de fluorescencia corregidos en el instrumento, a partir de una carrera de PCR completa. Un conjunto de muestras, que contenga un ácido nucleico diana, y un ácido nucleico de control, que sirva como un ácido nucleico estándar cuantitativo, experimenta un una PCR, en un termociclador, mediante la utilización de un perfil de temperatura especificado. A tiempos y temperaturas seleccionadas, durante el perfil de la PCR, las muestras, se iluminan, mediante luz filtrada, y los datos de fluorescencia filtrada, se recolectan, para cada muestra, para el ácido nucleico objetivado como diana, y el ácido nucleico estándar, cuantitativo. Después de que se haya terminado la

carrera de la PCR, las lecturas de la fluorescencia, se procesan, para obtener un conjunto de datos de la concentración de la tintura o colorante, para el ácido nucleico estándar, cuantitativo, y conjunto de datos de la concentración de la tintura o colorante, para el ácido nucleico objetivizado como diana. Cada uno de los conjuntos de datos referentes a las concentraciones de tinturas o colorantes, se procesa del mismo modo. Después de
 5 diversos chequeos de plausibilidad o credibilidad, se procede a calcular los valores del punto umbral (CT - [de sus iniciales en idioma inglés, correspondientes a threshold point - también denominado "elbow" (codo)] -), para el ácido nucleico estándar, cuantitativo, y para el ácido nucleico objetivizado como diana. El valor del punto umbral ("elbow"), se define como el punto, en donde, la fluorescencia del ácido nucleico objetivizado como diana, o el ácido nucleico estándar, cuantitativo, cruza un umbral predefinido (concentración de la fluorescencia). La determinación del título,
 10 se basa en las presunciones o supuestos, consistentes en que, el ácido nucleico objetivizado como diana, y el ácido nucleico estándar cuantitativo, se amplifican con la misma eficiencia, y en que, el valor del punto umbral calculado, se amplifican cantidades iguales de copias de amplicones, de ácido nucleico objetivizado como diana, y de ácido nucleico estándar, cuantitativo. Así, por lo tanto, el (CTQS - CT diana), es lineal al log (conc. diana/conc. QS), en donde, "QS", se refiere al ácido nucleico estándar, cuantitativo, interno. El título T, puede entonces calcularse, por
 15 ejemplo, mediante la utilización de una fórmula de calibración polinomial, tal como en la siguiente ecuación:

$$T' = 10 (a/CTQS - CT \text{ diana})^2 + b(CTQS - CT \text{ diana}) + c$$

Las constantes polinomiales, y las concentraciones de ácido nucleico estándar cuantitativo, son conocidas, y así, por
 20 lo tanto, la única variable, en la ecuación, es la diferencia (CTQS - CT diana).

De una forma adicional a la mera detección de la presencia o de la ausencia de un ácido nucleico diana, en una muestra de fluido, es a menudo importante, el hecho de determinar la cantidad del citado ácido nucleico. Como ejemplo de ello, el estado o fase y la gravedad de una enfermedad vírica, puede evaluarse en base a la carga vírica.
 25 De una forma adicional, el seguimiento de control de cualquier tipo de terapia, requiere información sobre la cantidad de un patógeno presente en un individuo, con objeto de evaluar el éxito de la terapia.

En vistas de lo anteriormente mencionado, arriba, en este documento de solicitud de patente, un aspecto de la presente invención, es el procedimiento el cual se ha descrito anteriormente, arriba, en este documento de solicitud de patente, el cual comprende, de una forma adicional, la etapa de determinar la cantidad de ácido nucleico objetivizado como diana, después de la etapa iii.
 30

De una forma adicional, en el sentido de la presente invención, uno o más ácidos nucleicos de control, pueden servir como un "ácido nucleico de control, interno, cualitativo". La detección cualitativa de un ácido nucleico, en una muestra biológica, es crucial, por ejemplo, para reconocer una infección, en un individuo. Así, de este modo, un importante requerimiento, para un ensayo para la detección de una infección microbiana, es el hecho consistente en que se eviten resultados negativos falsos, o resultados positivos falsos, puesto que, tales tipos de resultados, conducirían, de una forma casi inevitable, a graves consecuencias, con respecto al tratamiento del respectivo paciente. Así, de este modo, especialmente, en los procedimientos basados en PCR, se procede a añadir un ácido nucleico de control interno, cualitativo, a la mezcla de detección. Este control, es importante, de una forma particular, para conformar la validez de un resultado del test de ensayo. Por lo menos en el caso de un resultado negativo, con respecto al respectivo ácido nucleico, la reacción de control interno, cualitativa, debe interpretarse como siendo reactiva, en el ámbito de determinados ajustes de configuración, es decir que, debe detectarse el control interno cualitativo, ya que, de otro modo, el test de ensayo en sí mismo, se considera como siendo inoperativo. Sin embargo, no obstante, en una configuración o ajuste cualitativo, el citado control interno cualitativo, no debe necesariamente detectarse, en el caso de un resultado positivo. Para tests de ensayo cualitativos, es especialmente importante, el hecho consistente en que, la sensibilidad de la reacción, se garantice, y que, por lo tanto, se controle estrictamente. Como consecuencia de lo anteriormente expuesto, la concentración del control interno cualitativo, debe ser relativamente bajo, de tal forma que, incluso en una situación consistente en, por ejemplo, una ligera inhibición, el control interno cualitativo, no se detecte y, así, por lo tanto, el test de ensayo se invalide. Ésta debe adaptarse, de una forma cuidadosa, al respectivo ensayo y a su sensibilidad. De una forma preferible, el rango de concentración, para el ácido nucleico interno, cualitativo, a saber, el segundo ácido nucleico de control, comprenderá un rango correspondiente a unos valores comprendidos dentro de unos márgenes, los cuales van desde 1 copia por reacción, hasta 1000 copias por reacción. Con relación al respectivo límite de detección del ensayo (LOD), su concentración es, de una forma preferible, la correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes situados entre el LOD de un ensayo, y 25 veces el valor del LOD, siendo ésta, de una forma preferible, la correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes situados entre el LOD y 10 x LOD. De una forma preferible, la concentración, es de un valor comprendido dentro de unos márgenes los cuales se encuentran situados entre 2 x LOD y 10 x LOD. De una forma todavía más preferible, la concentración, es de un valor comprendido dentro de unos márgenes los cuales se encuentran situados entre 5 x LOD y 10 x LOD. De la forma mayormente preferible, la concentración, es de un valor correspondiente a 5 x LOD, o a 10 x LOD.
 35
 40
 45
 50
 55
 60

Así, de este modo, un aspecto preferido de la presente invención, es el procedimiento el cual se ha descrito anteriormente, arriba, en este documento de solicitud de patente, en donde, la presencia de un producto de amplificación, del citado ácido nucleico de control interno, es indicativa para que acontezca la amplificación, en la mezcla de reacción, incluso en ausencia de productos de amplificación, para uno o más de los citados ácidos
 65

nucleicos objetivizados como diana.

La presente invención, es especialmente de utilidad, para el desarrollo de ensayos simultáneos, en una pluralidad de tipos de parámetros y/o de ácidos nucleicos, mientras que se utiliza la misma secuencia de ácidos nucleicos de control interno, para los citados diferentes tipos de parámetros y/o de ácidos nucleicos. Así, por lo tanto, ésta contribuye a reducir la complejidad global de los correspondientes experimentos, en diferentes modelos. Así, por ejemplo, sólo debe diseñarse una secuencia de ácido nucleico de control interno, y añadirse a las respectivas mezclas de amplificación, ahorrando así, de este modo, el tiempo de realización y los costes, para diseñar y sintetizar o adquirir múltiples secuencias de ácidos nucleicos de control. El ensayo o ensayos, pueden racionalizarse y optimizarse, de tal forma que se reduzca el riesgo de la manipulación de errores. De una forma adicional, cuantas más diferentes secuencias de ácidos nucleicos de control se utilicen, en un ensayo, o en ensayos paralelos, llevados a cabo de una forma simultánea, bajo las mismas condiciones, más complejo resultará, el hecho de ajustar las respectivas condiciones. De una forma adicional, con un control individual apropiado para una pluralidad de ácidos nucleicos, el citado control, puede dispensarse a partir de una fuente individual, tal como, por ejemplo, al interior de diferentes recipientes, los cuales contengan los citados diferentes ácidos nucleicos objetivizados como diana. En el ámbito de la presente invención, la secuencia de ácido nucleico de control, individual, puede también servir, así mismo, como un control cualitativo y como un control cuantitativo.

Así, de este modo, es de utilidad, para aislar y simultáneamente, amplificar, por lo menos un primer ácido nucleico diana, y un segundo ácido nucleico diana, los cuales puedan encontrarse presentes en una o más muestras de fluidos un procedimiento que comprende las etapas automatizadas de:

a. añadir un ácido nucleico de control interno, a cada una de las citadas muestras de fluido

b. combinar conjuntamente, una materia de soporte, sólido, y las citadas una o más muestras de fluido, en uno o en más recipientes, durante un transcurso de tiempo y bajo unas condiciones, suficientes como para permitir a los ácidos nucleicos los cuales contengan ácidos nucleicos diana, y al ácido nucleico de control interno, el que éstos se inmovilicen en el material de soporte, sólido

c. aislar el material de soporte, sólido, del otro material presente en las muestras de fluido, en una estación de separación

d. purificar los ácidos nucleicos, en la citada en la citada estación de separación, y lavar el material de soporte, sólido, una o más veces, con un tampón de lavado

e. contactar los ácidos nucleicos diana purificados, y el ácido nucleico de control interno, purificado, con uno o más reactivos de amplificación, que comprenden por lo menos un distinto conjunto de cebadores, para cada una de los citados ácidos nucleicos diana, y para el citado ácido nucleico de control interno, en por lo menos dos recipientes de reacción, en donde, por lo menos un primer recipiente de reacción, comprende por lo menos el citado primer ácido nucleico diana, y por lo menos un segundo recipiente de reacción, comprende por lo menos el citado ácido segundo ácido nucleico de control, y en donde, el segundo ácido nucleico diana, se encuentra ausente del primer recipiente de reacción

f. incubar, en el recitado recipiente de reacción, los citados ácidos nucleicos diana purificados, y el citado ácido nucleico de control interno, con los citados uno o más reactivos de amplificación, durante un período de tiempo y bajo unas condiciones, las cuales sean suficientes como para que acontezca una reacción de amplificación, indicativa de la presencia o de la ausencia del citado ácido nucleico diana

g. detectar y medir las señales generadas por los productos de amplificación de los citados ácidos nucleicos diana, y siendo proporcionales a la concentración de los citados ácidos nucleicos diana, y detectar y medir una señal generada por el citado ácido nucleico de control interno,

en donde, las condiciones para la amplificación y para la detección, en las etapas d. a g., son idénticas, para los citados por lo menos un primer y un segundo ácidos nucleicos diana, purificados, y el citado ácido nucleico de control, y en donde, la secuencia del citado ácido interno de control, es idéntica, para los citados primer y segundo ácidos nucleicos de control, purificados.

Como una ventaja adicional del procedimiento el cual se ha descrito anteriormente, arriba, en este documento de solicitud de patente, el test de ensayo de una muestra biológica particular, para otros ácidos nucleicos, en posibles experimentos subsiguientes, no necesita involucrar otro procedimiento de preparación de muestras, con la adición de un diferente ácido nucleico de control interno, puesto que, el control utilizado en la presente invención, puede utilizarse para controlar la amplificación de diferentes ácidos nucleicos. Así, de este modo, una vez que se haya añadido el ácido nucleico de control interno, puede procederse a someter a test de ensayo otros parámetros, en la misma muestra, bajo las mismas condiciones.

El ácido nucleico de control interno, puede ser competitivo, no competitivo, o parcialmente competitivo.

Un ácido nucleico de control interno, competitivo, porta, de una forma esencial, los mismos sitios de unión al cebador, que los de la diana, y así, de este modo, compiten, para los mismos cebadores con la diana. Mientras que, este principio, permite una buena imitación del respectivo ácido nucleico diana, debido a su estructura similar, éste puede no obstante reducir la eficacia de la amplificación, con respecto al ácido nucleico diana o los ácidos nucleicos diana, y así, de este modo, conducir a un ensayo menos sensible.

Un ácido nucleico de control interno, no competitivo, tiene diferentes sitios de unión al cebador, que la diana, y así, de este modo, se une a diferentes cebadores. Las ventajas de dicho ajuste o configuración, comprenden, entre otras, al hecho consistente en que pueden tener lugar casos de amplificación individual, de los diferentes ácidos nucleicos, en la mezcla de reacción, pueden de una forma independiente, los unos con respecto a los otros, sin ningunos efectos de competición. Así, de este modo, no pueden acontecer efectos adversos, en cuanto a lo referente al límite de detección del ensayo, tal como puede ser el caso, en una configuración o ajuste competitivo.

Finalmente, en una amplificación, en la cual se utilice una configuración o ajuste parcialmente competitivo, el respectivo ácido nucleico de control, y por lo menos uno de los ácidos nucleicos diana, compiten para los mismos cebadores, mientras que, por lo menos, otro ácido nucleico diana, se une a diferentes cebadores.

El hecho consistente en que, el procedimiento anteriormente descrito, arriba, aquí, en este documento de solicitud de patente, involucre un distinto conjunto de cebadores, para cada uno de los citados ácidos nucleicos diana, y para el citado ácido nucleico de control interno, convierte, al procedimiento, en considerablemente flexible. En esta configuración o ajuste no competitivo, no es necesario el hecho de introducir sitios de unión específica a la diana. En el ácido nucleico de control, tal como en el caso de una configuración o ajuste competitivo, y se evitan así, de este modo, las desventajas o inconvenientes de una configuración de ajuste competitivo, tal y como se ha mencionado anteriormente, arriba. En una configuración o ajuste no competitivo, el ácido nucleico de control interno, tiene una secuencia diferente, con respecto a cualesquiera secuencias dianas, con objeto de no competir para sus cebadores y/o sondas. De una forma preferible, la secuencia del ácido nucleico de control interno, es diferente con respecto a otras secuencias de ácido nucleico, en la muestra de fluido. Como un ejemplo de ello, en el caso en el que, la muestra de fluido, se derive de un humano, entonces el ácido nucleico de control interno, de una forma preferible, no tiene una secuencia, la cual acontece también, de una forma endógena, en el caso de los humanos. La diferencia en la secuencia, debe ser por lo menos lo suficientemente significativa, como para no permitir la unión de los cebadores y/o de las sondas, a los respectivos ácido o ácidos nucleico(s) endógeno(s), bajo unas condiciones rigurosas, y convertir así, de este modo, a la configuración o ajuste, en competitivo. Con objeto de evitar tal tipo de interferencia, la secuencia del ácido nucleico de control interno utilizada, en la presente invención, se deriva, de una forma preferible, de una fuente diferente, con respecto al origen de la muestra de fluido. De una forma preferible, ésta se deriva de un genoma de origen natural, de una forma preferible, un genoma de planta, de una forma preferible, un genoma de uva. En una forma muy preferible de presentación, en concordancia con la presente invención, se procede a codificar un ácido nucleico derivado de un genoma de origen natural. Tal y como es conocido, en el arte de la técnica especializada, "codificar", significa introducir mutaciones de bases, en una secuencia en una cierta extensión. De una forma preferible, la secuencia del ácido nucleico de control interno utilizada en la presente invención, se encuentra substancialmente modificada, con respecto al gen de origen natural, del cual se deriva ésta.

En el contexto de la presente invención, una "secuencia", es la estructura primaria o principal de un ácido nucleico, a saber, el orden de disposición específico de las nucleobases individuales, de la cuales se componen los respectivos ácidos nucleicos. Deberá entenderse el hecho de que, el término "secuencia", no significa un tipo específico de ácido nucleico, tal como el RNA o el DNA, sino que, éste, se aplica a ambos, así como también a otros tipos de ácidos nucleicos, tales como, por ejemplo, el PNA u otros. Allí en donde, las nucleobases, corresponden las unas con las otras, de una forma particular, en el caso del uracilo (presente en el RNA), y la timina (presente en el DNA), estas bases, pueden considerarse como equivalentes, entre las secuencias de RNA y DNA, tal y como se conoce en arte especializado de la técnica pertinente.

Los ácidos nucleicos clínicamente relevantes, son a menudo los DNA, los cuales puede derivarse de virus DNA, tales como, por ejemplo, el virus de la Hepatitis B (HBV - [de sus iniciales, en idioma, inglés, correspondientes a Hepatitis B Virus] -), el Citomegalovirus (CMV), y otros, o bien, los DNA, lo cuales pueden derivarse de las bacterias, tales como, por ejemplo, los consistentes en la Chlamydia trachomatis (CT), en la Neisseria gonorrhoeae (NG), y otras. En dichos casos, puede resultar ventajoso, el hecho de utilizar un ácido nucleico de control interno, consistente en un DNA, con objeto de reflejar las propiedades del ácido nucleico diana.

Así, por lo tanto, un aspecto de la presente invención, es el procedimiento el cual se ha descrito anteriormente, arriba, en este documento de solicitud de patente, en donde, el citado ácido nucleico de control interno, es DNA.

Por otro lado, un gran número de ácido nucleicos relevantes para las diagnosis clínicas, son los ácidos ribonucleicos, tales como, por ejemplo, los ácidos nucleicos procedentes de los virus RNA, tales como, por ejemplo, los consistentes en el Virus de la insuficiencia humana (HIV - [de sus siglas, en idioma inglés correspondientes a Human Immunodeficiency Virus] -), el Virus de la Hepatitis C (HCV - [de sus siglas, en idioma inglés, correspondientes a Hepatitis C Virus] -), el Virus del Nilo Occidental (WNV - [de sus siglas, en idioma inglés,

correspondientes a West Nile Virus] -), el Virus del Papiloma Humano (HPV - de sus siglas, en idioma inglés, correspondientes a Human Papilloma Virus] -), el Virus de la Encefalitis Japonesa (JEV - [de sus siglas, en idioma inglés, correspondientes a Japanese Encephalitis Virus] -), el virus de la encefalitis de San Luis (SLEV - [de sus siglas, en idioma inglés, correspondientes a St. Louis Encephalitis Virus (SLEV) y otros. La presente invención,
 5 puede aplicarse fácilmente, a tales tipos de ácidos nucleicos. En este caso, puede resultar ventajoso, el hecho de utilizar un ácido nucleico de control interno, consistente en RNA, con objeto de reflejar las propiedades del ácido nucleico diana. En el caso en el que deba procederse a analizar ambos, el RNA y el DNA, en procedimiento el cual se ha descrito anteriormente, arriba, en este documento de solicitud de patente, entonces, se prefiere el hecho de que, el ácido nucleico de control interno, sea el RNA, ya que, el ácido nucleico de control interno, se asemeja, de
 10 una forma preferible, al diana sensible la cual es sea la más sensible, en un ensayo el cual involucre múltiples dianas, y las dianas RNA, de una forma usual, deben controlarse de una forma más estrecha o cuidadosa.

Así, de este modo, un aspecto de la presente invención, es el procedimiento el cual se ha descrito anteriormente, arriba, en este documento de solicitud de patente, en donde, el citado ácido nucleico de control interno, es RNA.

Puesto que, el RNA, es más propenso a la degradación, que el DNA, debido a las influencias tales como las consistentes en un valor pH alcalino, las ribonucleasas, etc., los ácidos nucleicos de control interno, compuestos de RNA, se proporciona, de una forma preferible, como partículas blindadas. Las partículas blindadas, tales como,
 20 especialmente, los RNA blindados, se describen, por ejemplo, en el documento de solicitud de patente europea EP 910 643. En resumen, el RNA, el cual puede producirse químicamente o, de una forma preferible, de una forma heteróloga, tal como, por ejemplo, mediante bacterias, tales como las consistentes en, por ejemplo, en la E. coli, se encapsula, por lo menos parcialmente, en una proteína de envoltura vírica. Ésta última, confiere resistencia al RNA, frente a las influencias externas, de una forma particular, las ribonucleasas. Deberá entenderse el hecho de que, el DNA de control interna, puede también proporcionarse, como una partícula blindada ambos, el RNA y el DNA
 25 blindados, son de utilidad, como ácidos nucleicos de control interno, en el contexto de la presente invención. En una forma preferida de presentación, en concordancia con la presente invención, los ácidos nucleicos de control consistentes en RNA, se encuentran blindados con la proteína de envoltura MS2, en E coli. En una forma adicionalmente preferida de presentación, en concordancia con la presente invención, los ácidos nucleicos de control, consistentes en DNA se encuentran blindados, mediante la utilización de fago lambda GT11.

Así, por lo tanto, una forma preferida de presentación, en concordancia con la presente invención, es el procedimiento el cual se ha descrito anteriormente, arriba, en este documento de solicitud de patente, en donde, el citado ácido nucleico de control interno, es un ácido nucleico blindado.

Los resultados de los ensayos los cuales se han descrito anteriormente, arriba, en este documento de solicitud de patente, pueden encontrarse adulterados, mediante, por ejemplo, comprendiendo positivos falsos, en el caso de una contaminación cruzada, con ácidos nucleicos procedentes de fuentes distintas a la de la muestra de fluido. De una forma particular, los amplificadores de los experimentos anteriores, pueden contribuir a tales tipos de efectos no deseados. Un procedimiento particular para la minimización de los efectos de la contaminación cruzada de la
 40 amplificación de ácido nucleicos, es la que se describe en el documento de patente estadounidense U S n.º 5. 035. 996. El procedimiento en cuestión, involucra la introducción de bases de nucleótidos no convencionales, tal como el consistente en el dUTP, en el producto amplificado, y exponer los productos remanentes, a un tratamiento enzimático y/o físico-químico, para convertir el producto de DNA, en incapaz de servir como molde, para las subsiguientes amplificaciones. Las enzimas, para dichos tratamientos, son conocidos, en el arte especializado de la técnica. Así, por ejemplo, la uracil-DNA glicosilasa, a la cual se le conoce, así, mismo, también, con el nombre de uracil-glicosilasa, o UNG, elimina los residuos de uracilo, de los productos de PCR, los cuales contienen dicha base. El tratamiento enzimático, tiene como resultado la degradación del producto de PCR remanente contaminante, y ésta sirve para "esterilizar", la reacción de amplificación.

Así, de este modo, un aspecto preferido de presentación de la invención, es el proceso el cual se ha descrito anteriormente, arriba, en este documento de solicitud de patente, el cual comprende, de una forma adicional, entre la etapa i, y la etapa ii, las etapas de

- tratar la muestra de fluido, con una enzima, bajo unas condiciones, en las cuales, los productos procedentes de las amplificaciones, de los ácidos nucleicos de contaminación cruzada, procedentes de otras muestras, se degradan enzimáticamente;
- inactivar dicha enzima.

De una forma preferible, la enzima, es la uracil-N-glicosilasa.

En los procedimientos los cuales se han descrito anteriormente, arriba, en este documento de solicitud de patente, es preferible el hecho consistente en que, la totalidad de las etapas, se automaticen. Que se "automaticen", significa el hecho de que, la totalidad de las etapas de un proceso, sean apropiadas para que éstas se lleven a cabo, mediante un aparato o máquina, que sea capaz de operar o funcionar mediante un pequeño control o influencia
 65 externos, o sin ellos, por parte de un ser humano. Únicamente las etapas de preparación de para los

- procedimientos, deben realizarse a mano, tal como, por ejemplo, las etapas de proceder al llenado de los recipientes de almacenaje, y de colocarlos en el lugar previsto, la de elección de las muestras, la cual debe realizarse por parte de un ser humano, y otras etapas adicionales, las cuales son conocidas, por parte de aquéllas personas expertas en el sector correspondiente al arte especializado de la técnica, tal como, por ejemplo, la operación de una computadora u ordenador de control. El aparato o máquina en cuestión, puede, por ejemplo, añadir líquidos, mezclar las muestras, o llevar a cabo las etapas de incubación, a unas temperaturas específicas, de una forma automática. De una forma típica, tal tipo de máquina o aparato, es un robot, controlado por una computadora u ordenador, el cual lleva a cabo un programa, en el cual, las etapas individuales y las instrucciones, se encuentran especificadas.
- 5
- 10 Es de utilidad, en el contexto de la presente invención, un sistema analítico (440), para aislar y, de una forma simultánea, amplificar, por lo menos dos ácidos nucleicos diana, los cuales pueden encontrarse presentes en una muestra de fluido, comprendiendo, el sistema analítico, los siguientes módulos:
- una estación de separación (230), la cual comprende un material de soporte, sólido, encontrándose construida y ordenadamente dispuesta, la citada estación de separación, para separar y purificar un ácido nucleico diana, el cual se encuentre comprendido en una muestra de fluido
 - una estación de amplificación (405), la cual comprende por lo menos dos recipientes de reacción, comprendiendo, los citados recipientes de reacción, reactivos de amplificación, por lo menos un primer ácido nucleico purificado, en por lo menos un primer recipiente de reacción, y por lo menos un segundo ácido nucleico purificado, en por lo menos un segundo recipiente de reacción, en donde, el segundo ácido nucleico, se encuentra ausente del primer recipiente de reacción, y una polimerasa con actividad transcriptasa inversa, comprendiendo, dicha polimerasa, una mutación, la cual confiere una tasa de extensión de ácido nucleico, mejorada y/o una actividad transcriptasa inversa, mejorada, con relación a la respectiva polimerasa del tipo salvaje.
- 15
- 20
- 25

Un "sistema analítico", es una ordenada disposición de los componentes, tales como los instrumentos, los cuales interactúan los unos con los otros, con el objetivo final de analizar una muestra determinada.

- 30 El sistema analítico (440, Figura 11), el cual se ha descrito anteriormente, en el párrafo anterior, es un sistema (440), el cual comprende un módulo (401), para el aislamiento y/o la purificación de un analito. De una forma adicional, el sistema (440), comprende, de una forma adicional, un módulo (403), para analizar el citado analito, para obtener una señal detectable. La señal detectable, puede detectarse en el mismo módulo (401, 402, 403) o, de una forma alternativa, en un módulo separado. El término "módulo", tal y como éste se utiliza aquí, en este documento de solicitud de patente, se refiere a cualquier localización especialmente definida, en el ámbito del analizador (400). Dos módulos (401, 403), pueden encontrarse separados mediante paredes, o éstos pueden encontrarse en una relación abierta. Uno cualquiera de los módulos (401, 402, 403), puede controlarse, bien ya sea de una forma automática, o bien, el control del módulo (401, 402, 403) puede ser compartido con otros módulos. De una forma preferible, la totalidad de los módulos, se controlan centralmente. La transferencia entre los módulos (401, 402, 403), puede ser manual, pero, de una forma preferible, es automatizada. Así, de este modo, mediante la presente invención, se abarca un gran número de diferentes formas de presentación de analizadores automatizados (400).
- 35
- 40

La "estación de separación", se encuentra descrita, anteriormente, arriba, en este documento de solicitud de solicitud de patente.

- 45 Una "estación de amplificación", comprende una incubadora con temperatura controlada, para llevar a cabo la incubación de por lo menos dos recipientes de reacción. Ésta comprende, de una forma adicional, una gran variedad de recipientes de reacción, tales como los consistentes en tubos o placas, en los cuales tiene lugar una reacción, tal como la consistente en una PCR, para el análisis de una muestra. Los límites exteriores o paredes de tales tipos de recipientes, son químicamente inertes, de tal forma que, éstos, no interfieran con la reacción de amplificación, la cual tenga lugar en dicho recipiente de reacción. Para el caso de la manipulación y para facilitar una automatización, es preferible el hecho de combinar por lo menos dos recipientes de reacción, en una configuración en un orden de disposición integral, de tal forma que, éstos, puedan manipularse conjuntamente.
- 50

- 55 Así, por consiguiente, en el sistema analítico el cual se ha descrito anteriormente, arriba, en este documento de solicitud de patente, los por lo menos dos recipientes de reacción, pueden combinarse en una configuración correspondiente a un orden de disposición integral.

- 60 Las configuraciones en un orden de disposición integral, pueden ser, por ejemplo, las correspondientes a viales o tubos, los cuales se encuentren unidos, los unos con los otros, de forma reversible, o de una forma irreversible, o distribuidos en una ordenada disposición, en un bastidor. La configuración en un orden de disposición integral, puede ser, por ejemplo, una placa de múltiples pozos.

- 65 La citada placa de múltiples pozos, puede sujetarse en una estación de soporte o sujeción. Un elemento de manipulación, puede transportar un recipiente de múltiples pozos, desde una estación de soporte o sujeción, a un bloqueo de aire (460), y un segundo elemento de manipulación, puede transportar la citada placa de múltiples

pozos, desde el citado bloqueo de aire, a la citada estación de amplificación, en donde, ambos elementos de manipulación, interactúan con la citada placa de múltiples pozos, mediante una interacción forma - bloqueo.

El sistema analítico, puede automatizarse de una forma completa.

5 En un caso, por lo menos dos recipientes de reacción, combinados en una configuración en un orden de disposición integral, se transportan entre las estaciones del sistema.

10 En un segundo caso, el ácido nucleico purificado, se transfiere, desde la citada estación de separación, a la citada estación de amplificación. Un elemento de pipeteado, el cual comprende pipetas, con boquillas o puntas de pipeta unidas, pueden transferir el líquido, el cual comprende el ácido nucleico purificado.

15 En un tercer caso, el ácido nucleico purificado, se transfiere, desde la citada estación de separación, a un recipiente de reacción, en una configuración en un orden de disposición integral, sujetado en una estación de soporte o sujeción. El citado recipiente de reacción, es una configuración en un orden de disposición integral, puede transferirse, desde la citada estación de soporte o sujeción, a la citada estación de amplificación.

20 El sistema analítico, el cual se ha descrito anteriormente, arriba, en este documento de solicitud de patente, puede comprender, de una forma adicional, una unidad de pipeteado. La citada unidad de pipeteado, comprende, por lo menos, una pipeta, o múltiples pipetas. En un caso, las citadas múltiples pipetas, se combinan una o más configuraciones en un orden de disposición integral, en el ámbito de los cuales, las pipetas, en algunos casos, pueden manipularse individualmente. Las pipetas utilizadas en el contexto de la presente invención son, de una forma preferible, pipetas las cuales comprenden boquillas o puntas de pipeteas, tal y como se ha descrito anteriormente, arriba, en este documento de solicitud de patente. En otra forma preferida de presentación, en concordancia con la presente invención, las pipetas, son agujas de pipeteado.

30 De una forma alternativa, un recipiente de reacción, o una configuración en un orden de distribución, de recipientes de reacción, utilizados para la preparación de muestras, en la estación de separación, y contienen el fluido que comprende los ácidos nucleicos diana, puede transferirse, desde la estación de separación, a la estación de amplificación.

35 Con este propósito, el sistema analítico el cual se ha descrito anteriormente, arriba, en este documento de solicitud de patente, puede comprender, de una forma adicional, una unidad de transferencia, comprendiendo, la citada unidad de transferencia, en algunos casos, un dispositivo robótico, comprendiendo, dicho dispositivo, en algunos casos, un elemento de manipulación.

40 Por las razones las cuales se han expuesto anteriormente, arriba, en este documento de solicitud de patente, en el contexto del procedimiento en concordancia con la presente invención, los siguientes conceptos, son adicionalmente de utilidad, en conexión con la presente invención:

- El sistema analítico (440), el cual se ha descrito anteriormente, arriba, en este documento de solicitud de patente, en donde, por lo menos un recipiente de reacción, comprende un ácido nucleico DNA diana.
- El sistema analítico (440), el cual se ha descrito anteriormente, arriba, en este documento de solicitud de patente, en donde, por lo menos un recipiente de reacción, comprende un ácido nucleico RNA diana, y en donde, por lo menos un recipiente de reacción, comprende un ácido nucleico DNA diana.

50 En algunos casos, el sistema analítico (440), el cual se ha descrito anteriormente, arriba, en este documento de solicitud de patente, comprende, de una forma adicional, uno o más elementos, seleccionados de entre el grupo consistente en:

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

60 Un "módulo de detección" (403), puede ser, por ejemplo, una unidad de detección óptica, para detectar el resultado o el efecto de un procedimiento de amplificación. Una unidad de detección óptica, puede comprender una fuente de luz, tal como, por ejemplo, la consistente en una lámpara de xenón, ópticas tales como las consistentes en espejos, lentes, fibras ópticas, para guiar y filtrar la luz, uno o más canales de referencia, una cámara CCD, o una cámara diferente.

65 Un "sellante de estanqueidad" (410), se encuentra construido y ordenadamente dispuesto, para sellar de una forma

estanca, cualesquiera recipientes utilizados conjuntamente con el sistema analítico en concordancia con la presente invención. Tales tipos de sellantes de estanqueidad, puede consistir, por ejemplo, en tubos de sellado estanco, con apropiados tapones de obturación, o placas de múltiples pozos, con folios, u otros materiales apropiados para un sellado estanco.

5 Un "módulo de almacenamiento" (1008), almacena los reactivos necesarios para llevar a cabo una reacción química o biológica importante para el análisis de la muestra de fluido. Éste puede comprender, así mismo, también, otros componentes de utilidad para el procedimiento de la presente invención, tales como, por ejemplo, los consistentes en las puntas o boquillas de las pipetas o en los recipientes a ser utilizados como recipientes de reacción, en el
10 ámbito de la estación de separación y/o la estación de amplificación.

En algunos casos, el sistema analítico, el cual se ha descrito anteriormente, arriba, comprende, de una forma adicional, una unidad de control, para el control de los componentes del sistema.

15 Tal tipo de "unidad de control" (1006), puede comprender un "software" informático, para asegurar el hecho de que, los diferentes componentes de citado sistema analítico, trabajen para interactuar de una forma correcta, con la correspondiente sincronización de los tiempos programados tal como, por ejemplo, mover y manipular los componentes, tales como las pipetas, de una forma coordinada. La unidad de control, puede también comprender, así mismo, un procesador, el cual haga funcionar un sistema de operaciones de tiempo RTQS - [de sus siglas, en
20 idioma inglés, correspondientes a real - time operating system] -, el cual se trata de un sistema de operación de múltiples tareas, el cual está previsto para aplicaciones a tiempo real. En otras palabras, el procesador del sistema, es capaz de gestionar problemas o condicionamientos a tiempo real, es decir, plazos de ejecución operativa, procedentes de una respuesta del sistema a un evento, de una forma independiente de la carga del sistema. Éste controla, a tiempo real, el hecho de que, las diferentes unidades, del sistema, operen y respondan de una forma
25 correcta, en concordancia con las instrucciones dadas.

Es también de utilidad, en el contexto de la presente invención, un sistema analítico (440), para procesar un analito, el cual comprende

30 a. una primera posición, la cual comprende receptáculos (1001), en una configuración consistente en un orden de disposición lineal, los cuales comprenden muestras líquidas (1010), un placa de procesado (101), la cual comprende receptáculos (103), en una configuración correspondiente a un orden de disposición nxm, para sostener una muestra de líquido (1011), un primer dispositivo de pipeteado (700), el cual comprende por lo menos dos unidades de pipeteado (702), en una configuración consistente en un orden de disposición lineal, en
35 donde, la citadas unidades de pipeteado (702), se encuentran acopladas, a puntas o boquillas de pipetas (3, 4), y un bastidor de boquillas o puntas (70), que comprende las boquillas o puntas de pipeta (3, 4), en una configuración consistente en un orden de disposición ax(nxm);

40 b. una segunda posición, la cual comprende un soporte (201, 128), para la citada placa de procesado (101), un soporte (330), para una placa de múltiples pozos, un soporte (470), para el citado bastidor de boquillas o puntas (70), y un segundo dispositivo de pipeteado (35), comprendiendo, el citado dispositivo de pipeteado (35), unidades de pipeteado (702), en una configuración correspondiente a un orden de disposición nxm, para acoplarse a las boquillas o puntas (3, 4) (Figura 12). El término "soporte", tal y como éste se utiliza aquí, en este documento de solicitud de patente, se refiere a cualquier configuración correspondiente a un orden de
45 disposición capaz de recibir un bastidor o una placa de procesado.

Las ventajas del sistema analítico (440), el cual se ha descrito anteriormente, arriba, en este documento de solicitud de patente, son tal y como éstas se describen, anteriormente, arriba, para el procedimiento de la presente invención.

50 En algunos casos, la posición de las citadas unidades de pipeteado (702), del primer dispositivo de pipeteado (700), son variables. Las posibles configuraciones del citado dispositivo de pipeteado (700), se describen abajo, a continuación, en la parte que sigue, de este documento de solicitud de patente.

En un caso, el bastidor de boquillas o puntas (70), comprende boquillas o puntas de pipeta (3, 4) en una configuración correspondiente a un orden de disposición ax(nxm). Un primer tipo (4) y un segundo tipo (3) de boquillas o puntas de pipeta, pueden encontrarse comprendidas, en el bastidor de boquillas o puntas (70). En este caso, el primer tipo de boquillas o puntas de pipeta (4), se encuentra configurado en un orden de disposición nxm, y el segundo tipo de boquillas o puntas de pipeta (3), se encuentra configurado en el orden de disposición nxm. En este contexto, "n", significa un número de filas, y m, significa el número de columnas, en donde, n, puede ser 6, y m, puede ser 8. En algunos casos, el primer tipo de boquillas o puntas de boquilla (4), tiene un volumen diferente, que el correspondiente al segundo tipo de boquillas o puntas de pipeta (3), el volumen del primer tipo de boquillas o puntas de pipeta (4), puede ser de más de 500 μ l, y el volumen del segundo tipo de boquillas o puntas de pipeta (3), puede ser de menos de 500 μ l. En este caso, a = 2. Sin embargo, no obstante, las configuraciones con más de dos tipos de boquillas o puntas de pipeta, siendo así, de este modo, a > 2, son también posibles.

65 En un caso, el sistema analítico (440), el cual se ha descrito anteriormente, arriba, en este documento de solicitud de

patente (1006), para distribuir y asignar los tipos de muestras, y los tests de ensayo individuales, a posiciones individuales de la placa de procesado (101). En algunos casos, las citadas posiciones, son células separadas (401, 402).

5 En un caso, el sistema, comprende, de una forma adicional, un sistema de transferencia (480), para transferir la citada placa de procesado (101), y el citado bastidor (70), entre la primera posición (402) y la segunda posición (401). Las formas posibles del citado sistema de transferencia (480), son cintas de transporte, o uno o más elementos de manipulación.

10 De una forma adicional, en algunos casos, las citadas unidades de pipeta, del segundo dispositivo de pipeteado (35), se encuentran conectados a boquillas o puntas de pipeta (3, 4), las cuales se utilizan en la primera posición (402).

15 Una configuración del sistema (440), la cual se ha descrito anteriormente, arriba, en este documento de solicitud de patente, comprende una tercera estación (403), el cual comprende una incubadora con temperatura controlada, para la incubación de del citado analito, con reactivos necesarios para obtener una señal detectable. Otras configuraciones adicionales de este sistema, se describen abajo, a continuación, en la parte que sigue de este documento de solicitud de patente.

20 Un control más óptimo para la distribución y asignación de las muestras y de los tests de ensayo, a la configuración nxm, es la que se consigue mediante un primer procesador (1004), el cual se encuentra comprendido en la citada primera posición (402), a la cual, la primera unidad de control (1006), transfiere instrucciones, para distribuir y asignar tipos de muestras y tests de ensayo individuales, a posiciones específicas, en la configuración nxm de los recipientes (103) de la placa de procesado (101), y un segundo procesador (1005), el cual se encuentra
25 comprendido en la citada segunda posición (401), a la cual, la citada unidad de control (1006), transfiere instrucciones, para distribuir y asignar tipos de muestras, y tests de ensayo individuales, a posiciones específicas, en la configuración nxm de los recipientes (103), en la placa de procesado.

30 En algunos casos, el citado sistema, comprende, de una forma adicional, un primer procesador, el cual se encuentra localizado en la primera citada posición y un segundo procesador, el cual se encuentra localizado en la citada segunda posición.

35 En otros casos, el citado procesador (1004), controla el siguiente dispositivo de pipeteado (700), y el citado segundo procesador (1005), controla el segundo dispositivo de pipeteado (35).

La totalidad de las otras descripciones o configuraciones del sistema analítico, el cual se encuentra descrito anteriormente, arriba, en este documento de solicitud de patente, son según la forma preferida de presentación, la cual se encuentra descrita anteriormente, arriba, para el procedimiento en concordancia con la presente invención.

40 Descripción resumida de las figuras

Figura 1:

Descripción específica del proceso de trabajo, de la preparación de muestras, según se utiliza en una forma de presentación de la presente invención.

45 Las flechas las cuales apuntan hacia abajo, significan la adición de un componente o de un reactivo, a cada uno de los respectivos pozos de la placa provista de pozos hondos o profundos, los cuales se han mencionado anteriormente, arriba, en este documento de solicitud de patente, y las flechas las cuales apuntan hacia arriba, significan la eliminación o retirada de los citados componentes o reactivos. Estas acciones, se llevaron a cabo de
50 una forma manual, en las etapas 2, 3, 4, 21 y 22, mediante un control del aparato, en las etapas 10, 14, 16, 18 y 24, y mediante el control del reactivo del aparato, en las etapas 5, 6, 7, 11, 15 y 19.

Debería tomarse debida nota, en cuanto al hecho consistente en que, los volúmenes utilizados en el ámbito de la presente invención, pueden ajustarse, de una forma preferible, en un porcentaje de hasta un 30 % de los valores
55 los cuales se han expuesto. De una forma particular, en el caso de la etapa 2, el volumen de las muestras, de una forma preferible, es variable, con objeto de tener en cuenta diferentes tipos de muestras de fluido, las cuales pueden requerir mayor cantidad o menor cantidad del material de partida, para obtener unos resultados apropiados, tal y como es conocido por parte de aquellas personas expertas en el arte especializado de la técnica. De una forma preferible, el rango de valores, es el correspondiente a un valor comprendido dentro de
60 unos márgenes, los cuales van desde los aproximadamente 100 µl hasta los aproximadamente 850 µl. De una forma más preferible, dicha cantidad, es la correspondiente a un valor de aproximadamente 100 µl, de aproximadamente 500 µl o de aproximadamente 850 µl. De una forma preferible, el volumen, en los respectivos recipientes, se ajusta a un volumen total idéntico, con el diluyente, en la etapa 3. De una forma preferible, tal y como se muestra en la figura 1, el volumen total, llega hasta un nivel de aproximadamente 850 µl.

65

Figura 2:

Las curvas de crecimiento de las amplificaciones de los ácidos nucleicos diana, derivados de los HIV, HBV y CT, llevadas a cabo en el LightCycler480 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DE), se encuentran descritas en el Ejemplo 1. La "Señal" indicada en el eje de las y, es una señal fluorescente, normalizada. El eje de las x, muestra el número de los respectivos ciclos de la PCR.

5 Las curvas de crecimiento de los HIV y HBV, se muestran conjuntamente con las curvas de crecimiento de los correspondientes ácidos nucleicos de control interno. Las respectivas curvas de ácido nucleico diana, se encuentran representadas mediante líneas continuas, mientras que, las curvas del ácido nucleico de control, se encuentran representadas mediante líneas discontinuas.

10 Fig. 2a: Ensayo cuantitativo del HIV, medido en el canal para la detección de la sonda diana.

Fig. 2b: Ensayo cuantitativo del HIV, medido en el canal para la detección de la sonda de control.

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

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

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

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

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

25 Figura 3:

Vista en perspectiva de la placa de procesado.

Figura 4:

Vista en perspectiva de la placa de procesado, desde el ángulo opuesto.

30 Figura 5:

Vista superior de la placa de procesado.

Figura 6:

35 Vista en sección transversal, a lo largo del lado más largo de la placa de procesado.

Figura 7:

Vista parcial de la vista en sección transversal.

40 Figura 8:

Vista en perspectiva de lado más largo de la placa de procesado

Figura 9:

45 Las figuras 9 a) a 9 d), muestran diferentes vistas de una segunda forma de presentación, en concordancia con la presente invención, de la estación de separación magnética.

Figura 10:

50 Las figuras 10 a) a 10 c), muestran una segunda forma de presentación, en concordancia con la presente invención, de la estación de separación magnética, sujetando la placa de procesado, con el primer tipo de imanes, en la posición Z, más superior, y el segundo tipo de imanes, en la posición Z, más inferior.

Figura 11:

Dibujos específicos de un analizador, el cual comprende diferentes estaciones, módulos o células.

55 Figura 12:

Esta figura, muestra un sistema analítico de la presente invención.

Figura 13:

60 Linealidad del ensayo cuantitativo de HBV, en plasma con EDTA, en concordancia con los datos expuestos en el Ejemplo 2.

Figura 14:

Linealidad del ensayo cuantitativo de HBV, en suero, en concordancia con los datos expuestos en el Ejemplo 2.

65 Figura 15:

Linealidad del ensayo cuantitativo de HCV, en plasma con EDTA, en concordancia con los datos expuestos en el

Ejemplo 2.

Figura 16:

Linealidad del ensayo cuantitativo de HCV, en suero, en concordancia con los datos expuestos en el Ejemplo 2.

5

Figura 17:

Linealidad del ensayo cuantitativo de HIV, en plasma con EDTA, en concordancia con los datos expuestos en el Ejemplo 2.

10 **Ejemplos**

Los ejemplos los cuales se facilitan abajo, a continuación, describen una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, en la cual puede procederse la invención. Queda claro, para la persona experta en el arte especializado de la técnica, el hecho consistente en que, estos ejemplos, no son limitativos del ámbito de la presente invención.

15

Ejemplo 1

Este ejemplo, describe un procedimiento para aislar y, de una forma simultánea, amplificar por lo menos un primer y un segundo ácidos nucleicos objetivizados como diana, mediante la utilización de un ácido de control interno genérico, individual.

20

En resumen, en la forma de presentación, en concordancia con la presente invención, la cual se describe en este ejemplo, se lleva a cabo una PCR, a tiempo real, simultáneamente y bajo unas condiciones idénticas, en un panel de diversas dianas, las cuales comprendían bacterias (*Chlamydia trachomatis*, CT) así como, también los DNA virus (HBV) y los RNA virus (HIV). Todas la muestras, se procesaron y se analizaron dentro del mismo procedimiento, a saber, en la misma placa de pozos hondos o profundos (por ejemplo, para la preparación), o placa de múltiples pozos (para la amplificación y la detección), respectivamente.

25

Se procedió a analizar y, subsiguientemente, a analizar las siguientes muestras:

30

| Reactivo | Fabricante |
|--|------------|
| HIV-1M Secundario estándar, 50.000 cp/ML | Roche |
| HBV Secundario estándar, 400 IU/ml | Roche |
| CT (DNA POS CTL pCHL-1) | Roche |

Los patrones estándar apropiados, u otros tipos de dianas, se encuentran disponibles y al alcance de aquellas personas expertas en el arte especializado de la técnica.

35

Los instrumentos los cuales se listan abajo, a continuación, en la siguiente tabla, se utilizaron en concordancia con las instrucciones del respectivo fabricante:

| Instrumento | Fabricante |
|------------------|--|
| Hamilton Star | Hamilton Medical AG (Bonaduz, CH) |
| Light Cycler 480 | Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, DE) |
| Chameleon Sealer | K biosystems (Essex, UK) |
| Compressor | K biosystems (Essex, UK) |

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

| Reactivo | Fabricante |
|--------------------------|------------|
| PreservCyt | Thin Prep |
| K3 EDTA Plasma, PCR neg. | Roche |

40

Las siguientes diluciones, se prepararon previamente, y éstas se estacionaron, durante el transcurso de toda la noche (diluciones de plasma, a una temperatura comprendida dentro de unos márgenes de - 60 ° hasta los - 90 °C, diluciones PreservCy5, a una temperatura comprendida dentro de unos márgenes situados entre 2 - 8 °C)

| Diana | Concentración | | Matriz |
|--------|---------------|-----------|----------------|
| HBV | 50 | UI/plasma | Plasma K3 EDTA |
| HIV-1M | 100 | cp/ml | Plasma K3 EDTA |
| CT | 2,5 | fg/ml | PreservCyt |

45

ES 2 617 258 T5

- 5 Cada muestra respectiva (500 µl), y cada respectivo diluyente de espécimen (350 µl), se pipetearon manualmente, al interior de una placa de pozos hondos, en donde, cada muestra, se añadió a tres diferentes pozos, para un análisis por triplicado. Para cada pozo con muestras de HIV o HBV, se añadieron, manualmente, 50 µl de ácido nucleico de control interno. Para el ensayo de HIV, cualitativo, se procedió a añadir un RNA, que servía como un control cualitativo (1000 partículas blindadas/muestra). Para el ensayo de HIV, cuantitativo, se procedió a añadir un RNA, que servía como un patrón estándar cuantitativo (500 partículas blindadas/muestra). Para el ensayo de HBV, cuantitativo, se procedió a añadir DNA, el cual servía como un patrón estándar cuantitativo (1E4 copias/muestra). La secuencia de ácidos nucleicos de control, era idéntica, en todos los casos, y ésta se seleccionó de entre los grupos consistentes en las SEQ ID NOs 45 - 48.

Los respectivos ácidos nucleicos de control, se almacenaron en el siguiente tampón:

| IC/IQS - Tampón de almacenaje | Conc. o pH |
|--------------------------------|------------|
| Tris (mM) | 10 |
| EDTA (mM) | 0,1 |
| Azida sódica (peso/volumen, %) | 0,05 |
| Poli rARNA (mg/l) | 20 |
| pH | 8 |

- 15 La preparación de muestras, se realizó en un dispositivo de preparación Hamilton Star (Hamilton Star CH), seguido de un proceso de trabajo según el esquema ilustrado en la Fig. 1, y mediante el uso de los siguientes reactivos.

| Reactivo proteasa | Conc. o pH |
|-----------------------------|------------|
| Tris mM) | 10 |
| EDTA (mM) | 1 |
| Cloruro cálcico (mM) | 5 |
| Acetato cálcico (mM) | 5 |
| Esperasa (mg/ml) | 80 |
| Glicerina (peso/volumen, %) | 50 |
| pH | 5,5 |

| Reactivo MGP | Conc. o pH |
|---------------------------------|------------|
| MGP en polvo (mg/ml) | 60 |
| Tris (mM) | 30 |
| Metilparabeno (peso/volumen, %) | 0,1 |
| Azida sódica (peso/volumen, %) | 0,095 |
| pH | 8,5 |

| Reactivo de Lisis | Conc. o pH |
|--------------------------------|------------|
| Tiocianato de guanidina (M) | 4 |
| Citrato sódico (mM) | 50 |
| Polidecanol (peso/volumen, %) | 5 |
| Ditiotreitol (peso/volumen, %) | 2 |
| pH | 5,8 |

| Tampón de lavado | Conc. o pH |
|---------------------------------|------------|
| Citrato sódico (mM) | 7,5 |
| Tampón de lavado | Conc. o pH |
| Metilparabeno (peso/volumen, %) | 0,1 |
| pH | 4,1 |

20

| Tampón de elución | Conc. o pH |
|---------------------------------|------------|
| Tris (mM) | 30 |
| Metilparabeno (peso/volumen, %) | 0,2 |
| pH | 8,5 |

- Después de la etapa final, el control del proceso mediante un aparato del tipo Hamilton Star, añadió las respectivas mezclas matrices (Mmxs), las cuales contenían los reactivos de amplificación, a cada pozo, mezcló los fluidos los cuales contenían los ácidos nucleicos aislados, con las Mmx, y transfirieron cada mezcla resultante, al correspondiente pozo de una placa de micropozos, en la cal se llevó a cabo la amplificación.

25

Se utilizaron las siguientes mezclas matrices (consistiendo, cada una de ellas, en dos reactivos, R1 y R2):

Para el HIV:

ES 2 617 258 T5

| Reactivo R1 | Concentración/50 µl PCR [µM] |
|--|------------------------------|
| Agua (grado PCR) | |
| Mn(AC) ₂ · 4H ₂ (pH 6,1, ajustado con ácido acético) | 3.000 |
| NaN ₃ Ri, tamponado con 10 mM Tris a un pH 7 [%] | 0,018 |

| Reactivo R2 | Concentración/50 µl PCR [µM] |
|--|------------------------------|
| DMSO (%) | 5,000 % |
| NaN ₃ Ri, tamponado con 10 mM Tris a un pH 7 [%] | 0,027 % |
| Acetato potásico, a un pH 7,0 | 110.000 |
| Glicerol (%) | 3,000 % |
| Tricina, a un pH 8,0 | 50.000 |
| Igepal (%) | 0,024 % |
| dGTP | 337,5 |
| dATP | 337,5 |
| dCTP | 337,5 |
| dUTP | 675 |
| Cebadores/sondas, seleccionados de entre las SEQ ID Nos 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-glicosidasa | 10 (U/reacción) |
| Z05-D-polimerasa | 40 (U/reacción) |
| NTQ21-46 A - aptámero | 0,222 |
| Agua | |

Para el HBV:

| Reactivo R2 | Concentración/50 µl - PCR | |
|-------------------------|---------------------------|------------------|
| H ₂ O | 100 | % |
| Tricina 7.7 | 40 | mM |
| Tween | 0,03 | % (peso/peso) |
| Glicerol | 5 | % (peso/peso) |
| KOH | 25,2 | mM |
| KOAc | 121,8 | mM |
| NTQ21 - 46 A (Aptámero) | 0,2625 | µM |
| dGTP | 0,42 | µM |
| dATP | 0,42 | µM |
| dCTP | 0,42 | µM |
| 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 |
| Z05D Polimerasa | 35 | |
| Uracil-N-Glicosilasa | 2 | (U/reacción) |
| Azida sódica | 0,027 | (U/reacción) |
| | | % (masa/volumen) |
| | | |
| Reactivo R1 | Concentración/50 µl - PCR | |
| H ₂ O | 100 | % |
| MgOAc | 2,5 | mM |
| MnOAc pH 6,1 | 2,5 | mM |
| Azida sódica | 0,018 | % (masa/volumen) |

Para la CT:

| Reactivo R1 | Concentración/50 µl - PCR |
|---|---------------------------|
| Agua (grado PCR) | |
| Mn(AC) ₂ (pH 6,5 en 0,02 % (volumen /volumen ácido acético glacial | 2,7 mM |
| NaN ₃ | 0,0135 % (peso volumen) |
| | |
| Reactivo R2 | Concentración/50 µl - PCR |

(continuación)

| Reactivo R1 | Concentración/50 µl - PCR |
|--|---------------------------|
| NaN ₃ /Ri (tamponado con 10 mM Tris a un valor pH de 7 (%)) | 0,0315 % |
| Acetato potásico | 112,4 mM |
| Glicerol (%) | 3,5 % |
| Tricina | 61 mM |
| Hidróxido potásico | 28,4 mM |
| dGTP | 525 µM |
| dATP | 525 µM |
| dCTP | 525 µM |
| dUTP | 1,05 mM |
| SEQ ID NO 39 | 750 mM |
| SEQ ID NO 40 | 600 mM |
| SEQ ID NO 41 | 116 nM |
| Aptámero NTQ - 46 A | 175 mM |
| Uracil-N-Glicosilasa | 5 U/reacción |
| ZO-D-polimerasa | 31 U/reacción |

Para los procesos de amplificación y de detección, se procedió a sellar la placa de múltiples pozos, de una forma hermética, mediante un sellador de placas automatizado (véase, anteriormente, más arriba, en este documento de solicitud de patente y, la placa en cuestión, se transfirió a un ciclador del tipo LightCycler 480 (véase anteriormente, más arriba, en este documento de solicitud de patente.

Se procedió a utilizar el siguiente perfil de la PCR:

Perfil de la termociclación

| Nombre del programa | Diana (°C) | Modo de adquisición | Retención (horas, minutos, segundos) | Tasa de rampa (°C/seg.) | Ciclos | Modo de análisis |
|---------------------|------------|---------------------|--------------------------------------|-------------------------|--------|------------------|
| Pre-PCR | 50 | Ninguno | 00 : 02 : 00 | 4,4 | 1 | Ninguno |
| | 94 | Ninguno | 00 : 00 : 05 | 4,4 | | |
| | 55 | Ninguno | 00 : 02 : 00 | 2,2 | | |
| | 60 | Ninguno | 00 : 06 : 00 | 4,4 | | |
| | 65 | Ninguno | 00 : 04 : 00 | 4,4 | | |
| 1ª medición | 95 | Ninguno | 00 : 00 : 05 | 4,4 | 5 | Cuantificación |
| | 55 | Individual | 00 : 00 : 30 | 2,2 | | |
| 2ª medición | 91 | Ninguno | 00 : 00 : 05 | 4,4 | 45 | cuantificación |
| | 58 | Individual | 00 : 00 : 25 | 2,2 | | |
| Enfriamiento | 40 | Individual | 00 : 02 : 00 | 2,2 | 1 | Ninguno |

Formato de detección (Manual)

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

El programa de PCR, comprende la desnaturalización inicial y la incubación, a unas temperaturas de 55 °C, de 60 °C, y de 65 °C, para la transcripción inversa de los moldes de RNA. La acción consistente en incubar las tres diferentes temperaturas, combina los efectos ventajosos consistentes en que, a reducidas temperaturas, se transcriben así mismo, también, secuencias ligeramente desajustadas o no coincidentes (tales como las consistentes en variantes genéticas de un organismo, mientras que, a altas temperaturas, se suprime la formación de estructuras de RNA secundarias, conduciendo así, de este modo, a una transcripción más eficiente.

La ciclación de PCR, se divide en dos mediciones, en donde, las mediciones en cuestión, se aplican en un ajuste en de una etapa (procediendo a combinar la reasociación y la extensión). Así, de este modo, los primeros 5 ciclos, a una temperatura de 55 °C, permite una inclusión incrementada, mediante la preamplificación de secuencias ligeramente desajustadas o no coincidentes, mientras que, los 45 ciclos de la segunda medición, proporcionan una especificidad incrementada, mediante la utilización de una temperatura de reasociación y/o extensión correspondiente a un valor de 58 °C.

Mediante la utilización de este perfil, la totalidad de las muestras comprendidas en la placa de múltiples pozos, mencionada anteriormente, arriba, se realizó la amplificación y la detección, en la totalidad de las muestras, de la forma la cual se encuentra ilustrada en la figura 2. Esta muestra el hecho de que, la preparación de las muestras, previamente a la amplificación, se llevó a cabo, así mismo, también, de una forma satisfactoria.

Los resultados, para los controles internos del HIV, cualitativos y cuantitativos, y el control interno del HBV, cuantitativo, se encuentran representados, de una forma separada, en la figura 2, a efectos de claridad. Puede observarse, en dicha figura, el hecho consistente en que, los controles, se amplificaron así mismo, también, de una forma satisfactoria, en la totalidad de los casos. La cuantificación de las dianas HIV y HBV, en la configuración o ajuste cuantitativo, se calcularon mediante la comparación del ácido nucleico de control interno, el cual servía como un patrón estándar cuantitativo.

Ejemplo 2

El procedimiento de amplificación genérica, el cual se ha descrito anteriormente, arriba, en este documento de solicitud de patente, se llevó a cabo, en una gran variedad de diferentes ácidos nucleicos pretendidos como dianas, en experimentos por separado, pero bajo unas condiciones idénticas. El aislamiento del respectivo ácido nucleico, se llevó a cabo de la forma la cual se encuentra descrita para el Ejemplo 1.

El respectivo ácido nucleico de control interno, genérico, se seleccionó de entre las SEQ ID NOs 45 - 49, y éste era RNA blindado, para los RNA dianas, y DNA lambda empaquetado, para los DNA dianas. Para los ensayos cualitativos de RNA, se procedió a añadir 300 partículas por muestra, y para los ensayos de cuantitativos de RNA, se procedió a añadir 3000 partículas, mientras que, para todos los ensayos de DNA, se procedió a añadir 500 partículas.

Se procedió a utilizar el siguiente perfil de PCR, para todas las partículas:

| | | Diana (°C) | Modo de adquisición | Meseta (horas, minutos, segundos) | Medición (horas, minutos, segundos) | Tasa de rampa (°C/seg.) |
|--------------|---------------------------------|------------|---------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|-------------------------|
| | Etapa de UNG | 50 | ninguno | 00 : 02 : 00 | 00 : 00 : 00 | 2,2 |
| Pre - PCR | Desnaturalización de UNG/moldes | 94 | ninguno | 00 : 00 : 05 | 00 : 00 : 00 | 4,4 |
| | Etapa de RT | 55 | ninguno | 00 : 02 : 00 | 00 : 00 : 00 | 2,2 |
| | | 60 | ninguno | 00 : 06 : 00 | 00 : 00 : 00 | 4,4 |
| | | 65 | ninguno | 00 : 04 : 00 | 00 : 00 : 00 | 4,4 |
| 1ª medición | | 95 | ninguno | 00 : 00 : 05 | 00 : 00 : 00 | 4,4 |
| | | 55 | individual | 00 : 00 : 30 | 00 : 00 : 08 | 2,2 |
| 2ª medición | | 91 | ninguno | 00 : 00 : 05 | 00 : 00 : 00 | 4,4 |
| | | 58 | individual | 00 : 00 : 25 | 00 : 00 : 08 | 2,2 |
| Enfriamiento | | 40 | ninguno | 00 : 02 : 00 | 00 : 00 : 00 | 2,2 |

| Nombre | Ciclos |
|--------------|--------|
| Pre-PCR | 1 |
| 1ª medición | 5 |
| 2ª medición | 45 |
| Enfriamiento | 1 |

De una forma detallada, se procedió a llevar a cabo los siguientes experimentos:

1. Análisis multiplex cualitativo de los HBV, HCV y HIV

a. Mezcla matriz

R1:

| | Concentración 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 10 mM Tris, a un pH 7) | 0,018 |
| | pH: 6.41 |

R2:

| Reactivo | Concentración en 50 µl - PCR (µM) |
|---|-----------------------------------|
| DMSO (%) | 5,4 |
| NaN ₃ /Ri, tamponado con 10 mM Tris, a un pH 7) | 0,027 |
| KOAc (pH 7,0 | 120.000 |
| Glicerol (%) | 3 |
| Tween 20 (%) | 0,015 |
| Tricina pH 8,0 | 60.000 |
| NTQ21 - 46 A - Aptámero | 0,2222 |
| Uracil-N-glicosilasa (U/µl) | 0,2 |
| DGTP | 400,0 |
| DATP | 400,0 |
| DCTP | 400,0 |
| dUTP | 800,0 |
| ZO5-D Polimerasa (U/µl)* | 0,9 |
| Cebadores/sondas, seleccionadas de entre las SEQ ID NOs 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 entre las SEQ ID NOs 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/LOD

- 5 Para cada virus detectado (grupo HIV - 1, grupo O, grupo HIV - 2, HBV y HVC), a diversas concentraciones/niveles y a alrededor del LOD anticipado, para plasma con EDTA. Se procedió a someter a test de ensayo, un panel por virus y concentración, mediante por lo menos 20 replicados por concentración. El LOD, se determinó mediante un análisis PROBIT (véanse las Tablas 1 - 5, las cuales se facilitan abajo, a continuación).

10 HIV

Tabla 1: HIV - 1, Grupo M, porcentajes de éxitos (hit rates) y LOD mediante análisis Probit, de un panel individual

| Concentración | Número de replicados | Número de positivos | Porcentaje de éxitos |
|--|----------------------|---------------------|----------------------|
| 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 % |
| LOD mediante análisis PROBIT (95 % hitrato) | | | 4,06 cp/ml |
| 95 % intervalo de confianza para LOD, mediante análisis PROBIT | | | 2,85 - 9,24 cp/ml |

El título de VHO estándar para el HIV - 1, grupo M, se convirtió en UI/ml.

15

$$\text{Título (en } \frac{IU}{mL} \text{)} = \frac{\text{Título (en } \frac{cp}{mL} \text{)}}{0,6}$$

Así, por lo tanto, el LOD del HIV - 1, grupo M, en UI/ml, es

- 20 LOD mediante análisis PROBIT (95 hitrato): 6,77 UI/ml
 Intervalo del 95 % de confianza, para LOD, mediante análisis PROBIT: 4,75 - 15,4 UI/ml

Tabla 2: HIV-1, Grupo O, porcentajes de éxitos (hit rates) y LOD mediante análisis Probit, de un panel individual

Tabla 5: HCV, Porcentajes de éxitos (hit rates) y LOD mediante análisis Probit, de un panel individual

| Concentración | Número de replicados | Número de positivos | Porcentaje de éxitos |
|--|----------------------|---------------------|----------------------|
| 7,6 UI/ml | 21 | 21 | 100 % |
| 3,8 UI/ml | 21 | 21 | 100 % |
| 1,9 UI/ml | 21 | 21 | 100 % |
| 0,95 UI/ml | 21 | 17 | 81 % |
| 0,6 UI/ml | 21 | 14 | 67 % |
| 0,4 UI/ml | 21 | 9 | 43 % |
| 0 UI/ml (control negativo) | 18 | 0 | 0 % |
| LOD mediante análisis PROBIT (95 % hitrato) | | | 4,76 UI/ml |
| 95 % intervalo de confianza para LOD, mediante análisis PROBIT | | | 3,14 - 11,61 UI/ml |

2. Análisis cualitativo del WNV

5

Mezcla matriz

R1:

| Reactivo | Concentración 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 10 mM Tris, a un pH 7) | 0,018 |
| | pH: 6.41 |

10

R2:

| Reactivo | Concentración en 50 µl - PCR (µM) |
|---|-----------------------------------|
| DMSO (%) | 5,4 |
| NaN ₃ /Ri, tamponado con 10 mM Tris, a un pH 7) | 0,027 |
| Acetato de K (pH 7,0 | 120.000 |
| Glicerol (%) | 3 |
| Tween 20 (%) | 0,015 |
| Tricina pH 8,0 | 60.000 |
| NTQ21 - 46 A - Aptámero | 0,2222 |
| Uracil-N-glicosilasa (U/µl) | 0,2 |
| DGTP | 400,0 |
| DATP | 400,0 |
| DCTP | 400,0 |
| dUTP | 800,0 |
| ZO5-D Polimerasa (U/µl)* | 0,9 |
| Cebadores/sondas, seleccionadas de entre las SEQ ID NOs 53 - 59 | 0,8 - 0,4 |
| SEQ ID NO 42 | 0,150 |
| SEQ ID NO 43 | 0,150 |
| SEQ ID NO 44 | 0,100 |

Sensibilidad analítica/LOD

15

Para cada virus detectado (WNV, SLEV y JEV), se procedió a preparar un panel, como series de dilución, de los respectivos patrones estándar, incluyendo a diversas concentraciones/niveles y al LOD anticipado, y alrededor de éste. Se procedió a someter a test de ensayo, un panel por virus, con por lo menos 20 replicados válidos, por concentración. Se procedió a someter a test de ensayo, un panel por virus y concentración, mediante por lo menos 20 replicados por concentración. El LOD, se determinó mediante un análisis PROBIT

20

Tabla 6: WNV, Grupo M, porcentajes de éxitos (hit rates) y LOD mediante análisis Probit, de un panel individual

| Concentración | Número de replicados | Número de positivos | Porcentaje de éxitos |
|---------------|----------------------|---------------------|----------------------|
| 20 cp/ml | 21 | 21 | 100 % |
| 12 cp/ml | 21 | 21 | 100 % |
| 8 cp/ml | 21 | 21 | 100 % |

ES 2 617 258 T5

(continuación)

| Concentración | Número de replicados | Número de positivos | Porcentaje de éxitos |
|--|----------------------|---------------------|----------------------|
| 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 % |
| LOD mediante análisis PROBIT (95 % hitrato) | | | 6,57 cp/ml |
| 95 % intervalo de confianza para LOD, mediante análisis PROBIT | | | 4,74 - 11,03 cp/ml |

Tabla 7: SLEV, Porcentajes de éxitos (hit rates) y LOD mediante análisis Probit, de un panel individual

| Concentración | Número de replicados | Número de positivos | Porcentaje de éxitos |
|--|----------------------|---------------------|----------------------|
| 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 % |
| LOD mediante análisis PROBIT (95 % hitrato) | | | 78,9 cp/ml |
| 95 % intervalo de confianza para LOD, mediante análisis PROBIT | | | 55,4 - 145,7 cp/ml |

Tabla 8: JEV, Porcentajes de éxitos (hit rates) y LOD mediante análisis Probit, de un panel individual

| Concentración | Número de replicados | Número de positivos | Porcentaje de éxitos |
|--|----------------------|---------------------|----------------------|
| 20 cp/ml | 21 | 20 | 100 % |
| 12 cp/ml | 21 | 20 | 95,2 % |
| 8 cp/ml | 21 | 18 | 95,2 % |
| 5 cp/ml | 21 | 17 | 81,0 % |
| 2,5 cp/ml | 21 | 14 | 52,4 % |
| 0,5 cp/ml | 21 | 2 | 28,6 % |
| 0 cp/ml (control negativo) | 12 | 0 | 0 % |
| LOD mediante análisis PROBIT (95 % hitrato) | | | 78,9 cp/ml |
| 95 % intervalo de confianza para LOD, mediante análisis PROBIT | | | 55,4 - 145,7 cp/ml |

3. Análisis cuantitativo del HBV

Mezcla matriz

R1:

| Reactivo | Concentración final 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 10 mM Tris, a un pH 7) | 0,018 |
| | pH: 6.41 |

R2:

| Reactivo | Concentración final en 50 µl - PCR (µM) |
|---------------------------|---|
| Glicerol (% peso/volumen) | 3 % |
| Tricina | 60 mM |
| DMSO (%) | 5,4 % |
| KOAc | 120 mM |
| Tween 20 (%) | 0,015 % |
| Aptámero NTQ21 - 46 A | 0,222 µM) |

(continuación)

| Reactivo | Concentración final en 50 µl - PCR (µM) |
|-----------------------------|---|
| ZO5D Polimerasa | 0,9 U/µl (45 U/rxn) |
| Uracil-N-glicosilasa | 0,2 U/µl (10/rxn) |
| Azida sódica (peso/volumen) | 0,27 % |
| DCTPs | 400 µM |
| DGTPs | 400 µM |
| DATPs | 400 µM |
| dUTPs | 800 µM |
| SEQ ID NO 36 | 1,2 µM |
| SEQ ID NO 37 | 1,2 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/LOD

- 5 Se procedió a preparar cuatro paneles de dilución, con patrones estándar de HBV secundarios (que representan al genotipo A), a saber, dos en suero HBV negativo, para volúmenes de "input" o entrada de 200 µl y de 500 µl, y dos en plasma con EDTA, HBV-negativos, para volúmenes de "input" o entrada de 200 µl y de 500 µl. Cada panel, incluía 7 niveles de concentración, y al LOD anticipado, o a aproximadamente el LOD anticipado. Se procedió a someter a test de ensayo, un panel por matriz, con ≥ 21 replicados por nivel de concentración. Por lo menos 20 replicados, necesitaban ser válidos. El LOD, se determinó mediante un análisis PROBIT, a un porcentaje de éxito o hit rate del análisis ≥ 95%, mediante un análisis de porcentaje de éxito o hit rate ≥ 95 %.

Tabla 9: Análisis de LOD, para 200 µl de volumen de input, en plasma con EDTA.*

| Concentración | Número de replicados | Número de positivos | Porcentaje de éxitos |
|---|----------------------|---------------------|----------------------|
| 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 % |
| LOD mediante análisis PROBIT (95 % hitrato) | | | 8,2 UI/ml |
| 95 % intervalo de confianza para LOD, mediante análisis PROBIT | | | 4,8 - 2,6 UI/ml |
| *Se procedió a analizar replicados adicionales, con objeto de estrechar el intervalo de confianza del 95 % observado. | | | |

15 Tabla 10: Análisis de LOD, para 500 µl de volumen de input, en plasma con EDTA.

| Concentración | Número de replicados | Número de positivos | Porcentaje de éxitos |
|--|----------------------|---------------------|----------------------|
| 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 % |
| LOD mediante análisis PROBIT (95 % hitrato) | | | 2,3 UI/ml |
| 95 % intervalo de confianza para LOD, mediante análisis PROBIT | | | 1,6 - 4,2 UI/ml |

Tabla 11: Análisis de LOD, para 200 µl de volumen de input, en suero.

| Concentración | Número de replicados | Número de positivos | Porcentaje de éxitos |
|--|----------------------|---------------------|----------------------|
| 25 UI/ml | 21 | 21 | 100 % |
| 15 UI/ml | 21 | 20 | 95,2 % |
| 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 % |
| LOD mediante análisis PROBIT (95 % hitrato) | | | 9,4 UI/ml |
| 95 % intervalo de confianza para LOD, mediante análisis PROBIT | | | 6,2 -19,0 UI/ml |

Tabla 12: Análisis de LOD, para 500 µl de volumen de input, en plasma con EDTA.

| Concentración | Número de replicados | Número de positivos | Porcentaje de éxitos |
|--|----------------------|---------------------|----------------------|
| 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 % |
| LOD mediante análisis PROBIT (95 % hitrato) | | | 4,1 UI/ml |
| 95 % intervalo de confianza para LOD, mediante análisis PROBIT | | | 2,4 - 10,0 UI/ml |

5 Síntesis del LOD:

10 EDTA-Plasma: El análisis PROBIT, a un 95 % de "hit rate" (porcentaje de éxito), proporcionó, como resultado, un LOD (límite de detección), correspondiente a un valor de 8,2 UI/ml, para un volumen de "input" (de entrada), de las muestras, de 200 µl, y de 2,3 UI/ml, para un volumen de "input" (de entrada), de la muestra, de 500 µl, para el EDTA-plasma.

15 El rango de intervalo de coincidencia, correspondiente a un valor del 95%, para estas concentraciones, era de un valor comprendido dentro de unos márgenes situados entre 4,8 UI/ml y 26 UI/ml, para un volumen de input de las muestras de 200 µl, y de un valor comprendido dentro de unos márgenes situados entre 1,6 UI/ml y 4,2 UI/ml, para un volumen de input de las muestras de 500 µl.

20 Suero: El análisis PROBIT, a un 95 % de "hit rate" (porcentaje de éxito), proporcionó, como resultado, un LOD (límite de detección), correspondiente a un valor de 9,02 UI/ml, para un volumen de "input" (de entrada), de las muestras, de 200 µl, y de 4,1 UI/ml, para un volumen de "input" (de entrada), de la muestra, de 500 µl, para el suero.

25 El rango de intervalo de coincidencia, correspondiente a un valor del 95%, para estas concentraciones, era de un valor comprendido dentro de unos márgenes situados entre 6,2 UI/ml y 19,0 UI/ml, para un volumen de input de las muestras de 200 µl, y de un valor comprendido dentro de unos márgenes situados entre 2,4 UI/ml y 10 UI/ml, para un volumen de input de las muestras de 500 µl.

Linealidad

30 Se procedió a preparar un panel de EDTA-plasma, y un panel de suero, mediante la utilización del HBV, genotipo A (proporcionado por parte de la firma RMD Research Pleasanton, plásmido linealizado, pHBV-PC_ADW2). Cada uno de los plásmidos, se analizó, a razón de 12 niveles de concentración, para la determinación del rango dinámico esperado (4 - 2 E + 09 UI/ml) del ensayo. La totalidad de los niveles de concentración/miembros del panel (PM - [de sus siglas, en idioma inglés, correspondientes a panel members] -), se sometieron a test de ensayo, en 21 replicados.

35 Este estudio, se llevó a cabo en un volumen de "input" de las muestras, correspondientes a un volumen de 500 µl. A dicho efecto, los niveles de concentración, se seleccionaron de la siguiente forma: Un nivel, por debajo del esperado límite inferior de cuantificación (LLOQ - [de sus siglas, en idioma inglés, correspondientes a Lower Limit of Quantification] -), uno, al LLOQ esperado, uno, por encima del LLOQ esperado, algunas concentraciones, a unos

ES 2 617 258 T5

niveles intermediarios, al límite superior de cuantificación (ULOQ -[de sus siglas, en idioma inglés, correspondientes a Upper Limit of Quantification] -) esperado, y uno, a un valor por encima del ULOQ esperado:

- 5 PM 12 - 2,0 E + 09 UI/ml - por encima del ULOQ esperado
- PM 11 - 1,0 E + 09 UI/ml - al ULOQ esperado
- PM 10 - 1,0 E + 08 UI/ml - por debajo del ULOQ esperado
- 10 PM 9 - 1,0 E + 07 UI/ml - nivel de concentración intermedio
- PM 8 - 1,0 E + 06 UI/ml - nivel de concentración intermedio
- 15 PM 7 - 1,0 E + 05 UI/ml - nivel de concentración intermedio
- PM 6 - 1,0 E + 04 UI/ml - nivel de concentración intermedio
- PM 5 - 1,0 E + 03 UI/ml - nivel de concentración intermedio
- 20 PM 6a - 2,0 E + 02 UI/ml - nivel de concentración intermedio (PM 6, diluido a 2,0 E+02 UI/ml, utilizado para la asignación del título, al panel de suero).
- PM 4 - 1,0 E + 02 UI/ml - nivel de concentración intermedio (también utilizado para la asignación del título, al panel de suero).
- 25 PM 3 - 5,0 E + 01 UI/ml - por encima del LLOQ esperado
- PM 2 - 1,0 E + 01 UI/ml - al LLOQ esperado
- 30 PM 1 - 4,0 E + 00 UI/ml - por debajo del LLOQ esperado.

Para cada muestra válida del panel de linealidad, el título observado para el HBV DNA, se transformó a log 10 del título, y el título medio del log 10 del título, se calculó, para el nivel de concentración.

35 **Tabla 13: Linealidad en EDTA -plasma**

| Título nominal (UI/ml) | Título asignado (UI/ml) | Log 10 del título, asignado | Log 10 medio del título, observado | Replicados |
|---------------------------|----------------------------|--------------------------------|---------------------------------------|------------|
| 4,00 E + 00 | 3,50 E + 00 | 0,54 | 0,52 | 17 |
| 1,00 E + 01 | 8,70 E + 00 | 0,94 | 0,91 | 21 |
| 5,00 E + 01 | 4,40 E + 01 | 1,64 | 1,69 | 21 |
| 1,00 E + 02 | 8,70 E + 01 | 1,94 | 2,04 | 21 |
| 1,00 E + 03 | 8,70 E + 02 | 2,94 | 3,01 | 21 |
| 1,00 E + 04 | 8,70 E + 03 | 3,94 | 3,9 | 21 |
| 1,00 E + 05 | 8,70 E + 04 | 4,94 | 4,88 | 21 |
| 1,00 E + 06 | 8,70 E + 05 | 5,94 | 5,87 | 21 |
| 1,00 E + 07 | 8,70 E + 06 | 6,94 | 6,92 | 21 |
| 1,00 E + 08 | 8,70 E + 07 | 7,94 | 8,01 | 21 |
| 1,00 E + 09 | 8,70 E + 08 | 8,94 | 9,04 | 21 |
| 2,00 E + 09 | 1,70 E + 09 | 9,24 | 9,38 | 21 |

Una ilustración gráfica de este resultado, se muestra en la Figura 13.

Tabla 14: Linealidad en suero

| Título nominal (UI/ml) | Título asignado (UI/ml) | Log 10 del título, asignado | Log 10 medio del título, observado | Replicados |
|---------------------------|----------------------------|--------------------------------|---------------------------------------|------------|
| 4,00 E + 00 | 3,30 E + 00 | 0,52 | 0,7 | 21 |
| 1,00 E + 01 | 8,30 E + 00 | 0,92 | 0,99 | 21 |
| 5,00 E + 01 | 4,10 E + 01 | 1,62 | 1,73 | 21 |
| 1,00 E + 02 | 8,30 E + 01 | 1,92 | 2,03 | 21 |
| 1,00 E + 03 | 8,30 E + 02 | 2,92 | 2,93 | 21 |
| 1,00 E + 04 | 8,30 E + 03 | 3,92 | 3,8 | 21 |
| 1,00 E + 05 | 8,30 E + 04 | 4,92 | 4,78 | 21 |
| 1,00 E + 06 | 8,30 E + 05 | 5,92 | 5,75 | 21 |
| 1,00 E + 07 | 8,30 E + 06 | 6,92 | 6,73 | 21 |

(continuación)

| Título nominal (UI/ml) | Título asignado (UI/ml) | Log 10 del título, asignado | Log 10 medio del título, observado | Replicados |
|---------------------------|----------------------------|--------------------------------|---------------------------------------|------------|
| 1,00 E + 08 | 8,30 E + 07 | 7,92 | 7,78 | 21 |
| 1,00 E + 09 | 8,30 E + 08 | 8,92 | 8,92 | 21 |
| 2,00 E + 09 | 1,70 E + 09 | 9,22 | 9,22 | 21 |

Una ilustración gráfica de este resultado se muestra en la Figura 14.

Síntesis de la linealidad:

- 5 El rango lineal, definido como el rango de concentración para el cual, el log 10 de la desviación del log 10 medio de los títulos, observado, se encuentra en el ámbito de ± 3 del log 10 de título nominal, se determinó como siendo: $3,5 \text{ E} + 00 \text{ UI/ml} - 1,7 \text{ E} + 00 \text{ UI/ml}$, para EDTA-plasma, y de $3,3 \text{ E} + 00 \text{ UI/ml} - 1,7 \text{ E} + 09 \text{ UI/ml}$, para suero. Se encontró que, el límite inferior de cuantificación, era de $4,0 \text{ E} + 00 \text{ UI/ml}$, para EDTA-plasma y para suero.

10

4. Análisis cuantitativo del HCV

Mezcla matriz

15 R1:

| Reactivo | Concentración final 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 10 mM Tris, a un pH 7) | 0,018 |
| | pH: 6,41 |

R2:

| Reactivo | Concentración final en 50 μl - PCR (μM) |
|--|---|
| Glicerol (% peso/volumen) | 3 % |
| Tricina | 60 mM |
| DMSO (%) | 5,4 % |
| KOAc | 120 mM |
| Tween 20 (%) | 0,015 % |
| NTQ21 - 46 A | 0,222 μM |
| ZO5D | 0,9 U/ μl (45 U/rxn) |
| UNG | 0,2 U/ μl (10 U/rxn) |
| Azida sódica (peso/volumen) | 0,27 % |
| DCTPs | 400 μM |
| DGTPs | 400 μM |
| DATPs | 400 μM |
| dUTPs | 800 μM |
| Cebadores/sondas seleccionados de entre las SEQ ID Nos 60 - 76 | 0,1 μM |
| SEQ ID NO 42 | 0,3 μM |
| SEQ ID NO 43 | 0,3 μM |
| SEQ ID NO 44 | μM |

Sensibilidad analítica/LOD

- 20 Se procedió a preparar un panel de dilución, con patrón estándar de Roche, HCV secundario en EDTA-plasma HCV negativo, y suero HCV negativo, mediante la utilización de unos volúmenes de "input" o entrada de 200 μl y de 500 μl , y dos en plasma con EDTA, HBV-negativos, para volúmenes de "input" o entrada de 200 μl y de 500 μl . Cada nivel de concentración, se sometió a test de ensayo, con 21 replicados. Por lo menos ≥ 20 replicados, necesitaban ser válidos. El LOD, se determinó mediante un análisis PROBIT, a un porcentaje de éxito o hit rate del análisis $\geq 95\%$, mediante un análisis de porcentajes éxitos o hit rate $\geq 95\%$.

25

Tabla 15: Hit rates (porcentajes de éxito) mediante 200 μl de volumen de input del procesado de las muestras, para EDTA-plasma

| Concentración | Número de replicados | Número de positivos | Porcentaje de éxitos |
|---------------|----------------------|---------------------|----------------------|
| 55 UI/ml | 21 | 21 | 100 % |
| 38 UI/ml | 21 | 21 | 100 % |

30

(continuación)

| Concentración | Número de replicados | Número de positivos | Porcentaje de éxitos |
|--|----------------------|---------------------|----------------------|
| 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 % |
| LOD mediante análisis PROBIT (95 % hitrato) | | | 17,4 UI/ml |
| 95 % intervalo de confianza para LOD, mediante análisis PROBIT | | | 12,1 - 34,3 UI/ml |

Tabla 16: Hit rates (porcentajes de éxito) mediante 500 µl de volumen de input del procesado de las muestras, para EDTA-plasma

| Concentración | Número de replicados | Número de positivos | Porcentaje de éxitos |
|--|----------------------|---------------------|----------------------|
| 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 % |
| 0,2 UI/ml | 21 | 6 | 57 % |
| 0 UI/ml (control negativo) | 21 | 0 | 0 % |
| LOD mediante análisis PROBIT (95 % hitrato) | | | 9,0 UI/ml |
| 95 % intervalo de confianza para LOD, mediante análisis PROBIT | | | 5,5 - 35,4 UI/ml |

5

Tabla 17: Hit rates (porcentajes de éxito) mediante 200 µl de volumen de input del procesado de las muestras, para suero

| Concentración | Número de replicados | Número de positivos | Porcentaje de éxitos |
|--|----------------------|---------------------|----------------------|
| 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 % |
| LOD mediante análisis PROBIT (95 % hitrato) | | | 20,2 UI/ml |
| 95 % intervalo de confianza para LOD, mediante análisis PROBIT | | | 14,0 - 93,3 UI/ml |

10

Tabla 18: Hit rates (porcentajes de éxito) mediante 500 µl de volumen de input del procesado de las muestras, para suero

| Concentración | Número de replicados | Número de positivos | Porcentaje de éxitos |
|--|----------------------|---------------------|----------------------|
| 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 % |
| LOD mediante análisis PROBIT (95 % hitrato) | | | 8,2 UI/ml |
| 95 % intervalo de confianza para LOD, mediante análisis PROBIT | | | 5,8 - 150 UI/ml |

Síntesis del LOD:

1. El análisis PROBIT, a un 95 % de "hit rate" (porcentaje de éxito), proporcionó, como resultado, un LOD (límite

de detección), correspondiente a un valor de 17,4 UI/ml, para un volumen de "input" (de entrada), de procesado las muestras, de 200 µl, y de 9,0 UI/ml, para un volumen de "input" (de entrada), de procesado de las muestras, de 500 µl, para el EDTA-plasma. El rango de intervalo de coincidencia, correspondiente a un valor del 95%, para estas concentraciones, era de un valor comprendido dentro de unos márgenes situados entre 12,1 UI/ml y 34,3 UI/ml, para un volumen de input de las muestras de 200 µl, y de un valor comprendido dentro de unos márgenes situados entre 5,5 UI/ml y 25,4 UI/ml, para un volumen de input de las muestras de 500 µl.

2. Los valores del análisis PROBIT, a un 95 % de "hit rate" (porcentaje de éxito), eran 20,2 UI/ml, para un volumen de "input" (de entrada), del procesado de las muestras, de 200 µl, y de 8,2 UI/ml, para un volumen de "input" (de entrada), de procesado de las muestras, para 500 µl, de volumen del procesado de las muestras, para el suero. El intervalo de coincidencia, correspondiente a un valor del 95%, para estas concentraciones, era de un valor comprendido dentro de unos márgenes situados entre 14,0 UI/ml y 39,3 UI/ml, para un volumen de input de las muestras de 200 µl, y de un valor comprendido dentro de unos márgenes situados entre 5,8 UI/ml y 15,0 UI/ml, para un volumen de input de las muestras de 500 µl.

Linealidad

Se procedió a analizar una preparación de un panel de EDTA-plasma, y una preparación de un panel de suero de HCV aRNA, rastreado para el patrón estándar de HCV VHO. Los paneles de linealidad, se prepararon mediante una dilución en serie, y se analizaron, a 10 diferentes concentraciones. El estudio, se llevó a cabo con un volumen de input del procesado de las muestras de 500 µl. Las concentraciones, se seleccionaron del siguiente modo: Un nivel, por debajo del esperado límite inferior de cuantificación (LLOQ - [de sus siglas, en idioma inglés, correspondientes a Lower Limit of Quantification] -), uno, al LLOQ esperado, uno, por encima del LLOQ esperado, algunas concentraciones, a unos niveles intermedios, al límite superior de cuantificación (ULOQ -[de sus siglas, en idioma inglés, correspondientes a Upper Limit of Quantification] -) esperado, y uno, a un valor por encima del ULOQ esperado: Para todas las concentraciones, se sometieron a test de ensayo 21 replicados.

PM 1 - 2,0 E + 08 UI/ml - por encima del ULOQ esperado

PM 2 - 1,0 E + 08 UI/ml - al ULOQ esperado

PM 3 - 1,0 E + 07 UI/ml - por debajo del ULOQ esperado

PM 4 - 1,0 E + 06 UI/ml - nivel de concentración intermedio

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

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

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

PM 8 - 1,0 E + 02 UI/ml - por encima del LLOQ esperado

PM 9 - 1,0 E + 01 UI/ml - al LLOQ esperado

PM 10 - 8,0 E + 00 UI/ml - por debajo del LLOQ esperado.

Tabla 19: Linealidad en EDTA -plasma

| Título nominal (UI/ml) | Título asignado (UI/ml) | Log 10 del título, asignado | Log 10 medio del título, observado | Replicados |
|---------------------------|----------------------------|--------------------------------|---------------------------------------|------------|
| 8,00 E + 00 | 4,87 E + 00 | 0,7 | 0,6 | 15 |
| 1,00 E + 01 | 6,09 E + 00 | 0,8 | 0,8 | 17 |
| 1,00 E + 02 | 6,09 E + 01 | 1,8 | 1,7 | 21 |
| 1,00 E + 03 | 6,09 E + 02 | 2,8 | 2,8 | 21 |
| 1,00 E + 04 | 6,09 E + 03 | 3,8 | 3,8 | 21 |
| 1,00 E + 05 | 6,09 E + 03 | 4,8 | 4,7 | 21 /20 |
| 1,00 E + 06 | 6,09 E + 04 | 5,8 | 5,6 | 21/20 |
| 1,00 E + 07 | 6,09 E + 05 | 6,8 | 6,7 | 21 |
| 1,00 E + 08 | 6,09 E + 06 | 7,8 | 7,8/7,7 | 21/18 |
| 2,00 E + 08 | 1,22 E + 07 | 8,1 | 8 | 21/20 |

Una ilustración gráfica de este resultado, se muestra en la Figura 15.

Tabla 20: Linealidad en suero

ES 2 617 258 T5

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

Una ilustración gráfica de este resultado, se muestra en la Figura 16.

Síntesis de la linealidad:

- 5 El rango lineal, definido como el rango de concentración para el cual, el log 10 de la desviación del log 10 medio de los títulos, observado, se encuentra en el ámbito de ± 3 del log 10 de título nominal, se determinó como siendo: $4,87 \text{ E} + 00 \text{ UI/ml} - 1,22 \text{ E} + 08 \text{ UI/ml}$, para EDTA-plasma, y de $3,90 \text{ E} + 00 \text{ UI/ml} - 9,92 \text{ E} + 07 \text{ UI/ml}$, para suero.

5. Análisis cuantitativo del HCV

10

Mezcla matriz

R1:

| Reactivo | Concentración final 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 10 mM Tris, a un pH 7) | 0,018 |
| | pH: 6.41 |

15 R2:

| Reactivo | Concentración final en 50 μl - PCR (μM) |
|---|---|
| Glicerol (% peso/volumen) | 3 % |
| Tricina | 60 mM |
| DMSO (%) | 5,4 % |
| KOAc | 120 mM |
| Tween 20 (%) | 0,02 % |
| Aptámero NTQ21 - 46 A | 0,222 μM) |
| ZO5D Polimerasa | 0,9 U/ μl (45 U/rxn) |
| UNG | 0,2 U/ μl (10 U/rxn) |
| Azida sódica (peso/volumen) | 0,27 % |
| DCTPs | 400 μM |
| DGTPs | 400 μM |
| DATPs | 400 μM |
| dUTPs | 800 μM |
| Cebadores/sondas seleccionados de entre las SEQ ID Nos 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/LOD

- 20 Se procedió a preparar un panel de dilución, con patrón estándar de HIV - 1M secundario, en EDTA-plasma HIV negativo, para unos volúmenes de "input" o entrada de muestras de 200 μl y de 500 μl . Cada nivel de concentración, se sometió a test de ensayo, con 21 replicados. Por lo menos ≥ 20 replicados, necesitaban ser válidos. El LOD, se determinó mediante un análisis PROBIT, a un porcentaje de éxito o hit rate del análisis $\geq 5\%$, mediante un análisis de porcentajes éxitos o hit rate $\geq 95\%$.

25 Tabla 21 Análisis del LOD, para un volumen de input o entrada de 200 μl , en EDTA-plasma

| Concentración | Número de replicados | Número de positivos | Porcentaje de éxitos |
|---------------|----------------------|---------------------|----------------------|
| 200 cp/ml | 21 | 21 | 100 % |
| 100 cp/ml | 21 | 21 | 100 % |

(continuación)

| Concentración | Número de replicados | Número de positivos | Porcentaje de éxitos |
|--|----------------------|---------------------|----------------------|
| 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 % |
| 10 cp/ml (control negativo) | 12 | 8 | 38,1% |
| LOD mediante análisis PROBIT (95 % hitrato) | | | 41,8 cp/ml |
| 95 % intervalo de confianza para LOD, mediante análisis PROBIT | | | 30,9 - 74,9 cp/ml |

Tabla 22 Análisis del LOD, para un volumen de input o entrada de 500 µl

| Concentración | Número de replicados | Número de positivos | Porcentaje de éxitos |
|--|----------------------|---------------------|----------------------|
| 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 % |
| LOD mediante análisis PROBIT (95 % hitrato) | | | 18,9 cp/ml |
| 95 % intervalo de confianza para LOD, mediante análisis PROBIT | | | 14,9 - 29,4 cp/ml |

5

Síntesis del LOD:

1. El análisis PROBIT, a un 95 % de "hit rate" (porcentaje de éxito), proporcionó, como resultado, un LOD (límite de detección), correspondiente a un valor de 41,81 cp/ml, para un volumen de "input" (de entrada), de 200 µl, y de 18,9 cp/ml, para un volumen de "input" (de entrada), de 500 µl.
2. El rango del intervalo de confianza del 95 %, para estas concentraciones, era de un valor comprendido dentro de unos márgenes situados entre 30,9 cp/ml - 74,9 cp/ml, para un volumen de input o entrada de 200 µl, y de un valor comprendido dentro de unos márgenes de 14,9 cp/ml - 29,4 cp/ml, para un volumen de input o entrada de 500 µl.

15

Linealidad

Las muestras, las cuales se utilizaron en un estudio de linealidad/rango dinámico/precisión, consistían en un panel de dilución de un material sobrenadante de un cultivo de células HIV - 1 del grupo M, subtipo B.

20

El panel de linealidad, se preparó mediante una dilución en serie. Este panel, se analizó a 10 diferentes niveles de concentración.

Las concentraciones, se seleccionaron del siguiente modo: Un nivel, por debajo del esperado límite inferior de cuantificación (LLOQ - [de sus siglas, en idioma inglés, correspondientes a Lower Limit of Quantification] -), uno, al LLOQ esperado, uno, al LLOQ esperado, uno, por encima del LLOQ esperado, algunas concentraciones, a unos niveles intermedios, al límite superior de cuantificación (ULOQ - [de sus siglas, en idioma inglés, correspondientes a Upper Limit of Quantification] -) esperado, y uno, a un valor por encima del ULOQ esperado. Para todas las concentraciones, se sometieron a test de ensayo, 21 replicados. El estudio de linealidad, se llevó a cabo con un volumen de input o entrada de 500 µl.

30

PM 1 - 2,0 E + 07 cp/ml - por encima del ULOQ esperado

35

PM 2 - 1,0 E + 07 cp/ml - al ULOQ esperado

PM 3 - 1,0 E + 06 cp/ml - por debajo del ULOQ esperado

PM 4 - 1,0 E + 05 cp/ml - nivel de concentración intermedio

40

PM 5 - 3,0 E + 04 cp/ml - nivel de concentración intermedio, para la asignación del título

PM 6 - 1,0 E + 04 cp/ml - nivel de concentración intermedio,

- PM 7 - 1,0 E + 03 cp/ml - nivel de concentración intermedio
- PM 8 - 1,0 E + 02 cp/ml - nivel de concentración intermedio
- 5 PM 9 - 5,0 E + 01 cp/ml - por encima del LLOQ esperado
- PM 10 - 2,0 E + 01 cp/ml - al LLOQ esperado.
- 10 PM 11 - 1,5 E + 01 cp/ml - por debajo del LLOQ esperado.

Tabla 23: Linealidad en EDTA - plasma

| Título nominal (UI/ml) | Título asignado (UI/ml) | Log 10 del título, asignado | Log 10 medio del título, observado | Replicados |
|---------------------------|----------------------------|--------------------------------|---------------------------------------|------------|
| 1,00 E + 01 | 1,50 E + 01 | 1,2 | 1,3 | 21 |
| 2,00 E + 01 | 2,00 E + 01 | 1,3 | 1,5 | 21 |
| 5,00 E + 01 | 5,10 E + 01 | 1,7 | 1,8 | 21 |
| 1,00 E + 02 | 1,00 E + 02 | 2 | 2 | 21 |
| 1,00 E + 03 | 1,00 E + 03 | 3 | 3 | 21 |
| 1,00 E + 04 | 1,00 E + 04 | 4 | 4 | 21 |
| 1,00 E + 05 | 1,00 E + 05 | 5 | 5 | 21 |
| 1,00 E + 06 | 1,00 E + 06 | 6 | 6 | 21 |
| 1,00 E + 07 | 1,00 E + 07 | 7 | 7 | 21 |
| 2,00 E + 07 | 2,00 E + 07 | 7,3 | 7,4 | 21 |

Una ilustración gráfica de este resultado, se muestra en la Figura 17.

Síntesis de la linealidad:

- 15 El rango lineal, definido como el rango de concentración para el cual, el log 10 de la desviación del log 10 medio de los títulos, observado, se encuentra en el ámbito de ± 3 del log 10 de título nominal, se determinó como siendo de 1,5 E + 01 cp/ml - 2,0E + 07 cp/ml.

20 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Roche Diagnostics F. HOFFMANN- LA ROCHE AG

25 <120> Preparación de muestras genéricas

<130> 26551 EP1

<160> 76

30 <170> Patentin versión 3.5

<210> 1

<211> 29

<212> ADN

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador/sonda

40 <400> 1

agtgggggga catcaagcag ccatgcaaa

29

<210> 2

<211> 30

45 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador/sonda

50 <400> 2

ES 2 617 258 T5

| | | |
|----|--|----|
| | agtgggggga catcaagcag ccatgcaaat | 30 |
| 5 | <210> 3 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial | |
| 10 | <220> <223> cebador/sonda | |
| | <400> 3 gctttcagcc cagaagtaat acc | 23 |
| 15 | <210> 4 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial | |
| 20 | <220> <223> cebador/sonda | |
| | <400> 4 ggacacatca agcagccatg caaat | 25 |
| 25 | <210> 5 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial | |
| 30 | <220> <223> cebador/sonda | |
| | <400> 5 agagaaccaa ggggaagtga | 20 |
| 35 | <210> 6 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial | |
| 40 | <220> <223> cebador/sonda | |
| | <400> 6 ataatccacc tatcccagta ggagaaat | 28 |
| 45 | <210> 7 <211> 29 <212> ADN <213> Secuencia artificial | |
| 50 | <220> <223> cebador/sonda | |
| | <400> 7 agtgggggga caccaggcag caatgcaaa | 29 |
| 55 | <210> 8 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial | |
| 60 | <220> <223> cebador/sonda | |
| | <400> 8 | |
| 65 | | |

ES 2 617 258 T5

| | | |
|----|---|----|
| | catagcagga actactagta | 20 |
| 5 | <210> 9 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial | |
| 10 | <220> <223> cebador/sonda | |
| | <400> 9 ggtactagta gtcctgcta tgcacttcc | 30 |
| 15 | <210> 10 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial | |
| 20 | <220> <223> cebador/sonda | |
| | <400> 10 ctatgtcact tccccttgg tctct | 25 |
| 25 | <210> 11 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial | |
| 30 | <220> <223> cebador/sonda | |
| 35 | <400> 11 ggtactagta gtcctgcta taccacttcc | 30 |
| 40 | <210> 12 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial | |
| 45 | <220> <223> cebador/sonda | |
| | <400> 12 tcctgtctt atgtccagaa | 20 |
| 50 | <210> 13 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial | |
| 55 | <220> <223> cebador/sonda | |
| | <400> 13 tttggcctt gtcttatgac cagaatgc | 28 |
| 60 | <210> 14 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial | |
| 65 | <220> <223> cebador/sonda | |
| | <400> 14 | |

ES 2 617 258 T5

| | | |
|----|---|----|
| | tactagtagt tctgctatg tcacttcc | 28 |
| 5 | <210> 15 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial | |
| 10 | <220> <223> cebador/sonda | |
| | <400> 15 tgtgttatga tgggtttaa atc | 23 |
| 15 | <210> 16 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial | |
| 20 | <220> <223> cebador/sonda | |
| 25 | <400> 16 actctaaagg gttccttgg | 20 |
| 30 | <210> 17 <211> 33 <212> ADN <213> Secuencia artificial | |
| 35 | <220> <223> cebador/sonda | |
| | <400> 17 tctgcagctt cctcattgat ggtatctttt aac | 33 |
| 40 | <210> 18 <211> 29 <212> ADN <213> Secuencia artificial | |
| 45 | <220> <223> cebador/sonda | |
| | <400> 18 tcagcattat cagaaggagc caccccaca | 29 |
| 50 | <210> 19 <211> 32 <212> ADN <213> Secuencia artificial | |
| 55 | <220> <223> cebador/sonda | |
| | <400> 19 tctgcagctt cctcattgag gtatctttta ac | 32 |
| 60 | <210> 20 <211> 41 <212> ADN <213> Secuencia artificial | |
| 65 | <220> <223> cebador/sonda | |
| | <400> 20 | |

ES 2 617 258 T5

| | | |
|----|---|----|
| | atcctgggat taaataaaat agtaagaatg tatagcccta c | 41 |
| 5 | <210> 21 <211> 29 <212> ADN <213> Secuencia artificial | |
| 10 | <220> <223> cebador/sonda | |
| | <400> 21 accatcaatg aggaagctg cagaatggg | 29 |
| 15 | <210> 22 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial | |
| 20 | <220> <223> cebador/sonda | |
| | <400> 22 tgactctggt aactagagat ccctca | 26 |
| 25 | <210> 23 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial | |
| 30 | <220> <223> cebador/sonda | |
| | <400> 23 tgttcaacctg tggtatctag agatccctca | 30 |
| 35 | <210> 24 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial | |
| 40 | <220> <223> cebador/sonda | |
| 45 | <400> 24 ggctaactag ggaccactg | 20 |
| 50 | <210> 25 <211> 18 <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 | |
| 65 | <220> <223> cebador/sonda | |
| | <400> 26 | |

ES 2 617 258 T5

| | | |
|----|---|----|
| | tcagcaagcc gagtcctgcg tcgaga | 26 |
| 5 | <210> 27 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia artificial | |
| 10 | <220> <223> cebador/sonda | |
| | <400> 27 ccgctaagcc gagcccttg cgctgga | 27 |
| 15 | <210> 28 <211> 17 <212> ADN <213> Secuencia artificial | |
| 20 | <220> <223> cebador/sonda | |
| 25 | <400> 28 ggtctgaggg atctcta | 17 |
| 30 | <210> 29 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial | |
| 35 | <220> <223> cebador/sonda | |
| | <400> 29 ctgctagaga tttccacac tgac | 24 |
| 40 | <210> 30 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial | |
| 45 | <220> <223> cebador/sonda | |
| | <400> 30 ggctccacgc ttgctgctt aaa | 23 |
| 50 | <210> 31 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial | |
| 55 | <220> <223> cebador/sonda | |
| | <400> 31 ggctccacgc ttgctgctt | 18 |
| 60 | <210> 32 <211> 31 <212> ADN <213> Secuencia artificial | |
| 65 | <220> <223> cebador/sonda | |
| | <400> 32 | |

ES 2 617 258 T5

| | | |
|----|---|----|
| | ttcccaaagc aagaagggtc ctaacagacc a | 31 |
| 5 | <210> 33 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial | |
| 10 | <220> <223> cebador/sonda | |
| | <400> 33 tctctagcag tggcgccccga acagggac | 28 |
| 15 | <210> 34 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia artificial | |
| 20 | <220> <223> cebador/sonda | |
| | <400> 34 accagagtca cacaacagac gggcacacac tact | 34 |
| 25 | <210> 35 <211> 31 <212> ADN <213> Secuencia artificial | |
| 30 | <220> <223> cebador/sonda | |
| 35 | <400> 35 tcctagtcgc cgcctggtca ttcggtgttc a | 31 |
| 40 | <210> 36 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial | |
| 45 | <220> <223> cebador/sonda | |
| | <400> 36 catgcaactt tttcacctct gccta | 25 |
| 50 | <210> 37 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia artificial | |
| 55 | <220> <223> cebador/sonda | |
| | <400> 37 aactccacag tagctccaaa ttcttta | 27 |
| 60 | <210> 38 <211> 33 <212> ADN <213> Secuencia artificial | |
| 65 | <220> <223> cebador/sonda | |
| | <400> 38 | |

ES 2 617 258 T5

| | | |
|----|---|----|
| | ccaagctgtg ccttgggtgg cttggggca tgg | 33 |
| 5 | <210> 39 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial | |
| 10 | <220> <223> cebador/sonda | |
| | <400> 39 gggattcctg taacaacaag tca | 23 |
| 15 | <210> 40 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial | |
| 20 | <220> <223> cebador/sonda | |
| | <400> 40 tcttcccag aacaataaga acac | 24 |
| 25 | <210> 41 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial | |
| 30 | <220> <223> cebador/sonda | |
| | <400> 41 ggcttgcaga gttctatagt gctatg | 26 |
| 35 | <210> 42 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial | |
| 40 | <220> <223> cebador/sonda | |
| 45 | <400> 42 ttgatagcaa tcggctatcg actaa | 25 |
| 50 | <210> 43 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial | |
| | <220> <223> cebador/sonda | |
| 55 | <400> 43 gcttcgatac tcagtcactc cggtataa | 28 |
| 60 | <210> 44 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia artificial | |
| 65 | <220> <223> cebador/sonda | |
| | <400> 44 | |

ES 2 617 258 T5

| | | |
|----|---|-----|
| | tctctcgcca tctcctaccg cattggc | 27 |
| 5 | <210> 45 <211> 269 <212> ADN <213> Secuencia artificial | |
| 10 | <220> <223> ácido nucleico de control interno <400> 45 | |
| | aattcaagct tagatctagc tttgcctgct tgatagcaat cggctatcga ctaatgactg | 60 |
| | tcctggcggg ctctcgccat ctctaccgc attggctcat aggtaagctc gctgtcacc | 120 |
| | agtacggagg tgccagtaga ttattagaga cagtcgcca tcgatcgtta taccgagatg | 180 |
| | actgagtatc gaagctacat tgtagccgca cataggacca cccatcttca tgttgaaaca | 240 |
| | tgaggattac ccatgtggat ccaagcttg | 269 |
| 15 | <210> 46 <211> 235 <212> ADN <213> Secuencia artificial | |
| 20 | <220> <223> ácido nucleico de control interno <400> 46 | |
| | gggctgcagg tcgactctag attctaagaa tttgatgggc ttttctact aattactatt | 60 |
| | agtatattgc catctttaac acttagaccg aagtgtgctg aagttccagt ggccggccca | 120 |
| | gacctgggaa gttgcaagga cttaaacgaa tgcaagcgat catatcttga aaaattataa | 180 |
| 25 | ccagaggatc gatgaaaaaa atttcttaga gctttggatc cccgggagag ctccc | 235 |
| 30 | <210> 47 <211> 350 <212> ADN <213> Secuencia artificial | |
| 35 | <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 gggaccogag | 240 |
| | gaagctgtca gcgccacttc cggcggttaag gctttaaacc gcgcccgcg gttatcacgc | 300 |
| | gcggggagca cagcgcggac tgacgtgctg ggaagcaccg gttaaggatc | 350 |

ES 2 617 258 T5

<210> 48
 <211> 470
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> ácido nucleico de control interno

 10 <400> 48

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

 <210> 49
 <211> 350
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial

 <220>
 20 <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 gctttaaaac gcgcccgccg gttatcacgc 300
 gcggggagca cagcgcggac tgacgtgctg ggaagcaccg gttaaggatc 350

 25
 <210> 50
 <211> 25
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador/sonda

 <400> 50
 35 acaaccgcgc catacatgtc aagaa 25

 <210> 51
 <211> 24
 <212> ADN

ES 2 617 258 T5

| | | |
|----|---|----|
| | <213> Secuencia artificial | |
| | <220> | |
| | <223> cebador/sonda | |
| 5 | <400> 51 gtcgggccgc ttatacagta ccaa | 24 |
| | <210> 52 | |
| 10 | <211> 32 <212> ADN <213> Secuencia artificial | |
| | <220> | |
| 15 | <223> cebador/sonda | |
| | <400> 52 gccagcaatt aagtgagtcg gggcgtggtg ac | 32 |
| 20 | <210> 53 <211> 52 <212> ADN <213> Secuencia artificial | |
| | <220> | |
| 25 | <223> cebador/sonda | |
| | <400> 53 caacaaaaca gcatattgac acctgggagt agactaggag atcttctgct ct | 52 |
| 30 | <210> 54 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial | |
| 35 | <220> | |
| | <223> cebador/sonda | |
| 40 | <400> 54 tctcctagtc ttcccagggt gtcaatatgc | 30 |
| | <210> 55 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia artificial | |
| 45 | <220> | |
| | <223> cebador/sonda | |
| 50 | <400> 55 ctgccccagg aggactgggt taacaaa | 27 |
| | <210> 56 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial | |
| | <220> | |
| | <223> cebador/sonda | |
| 60 | <400> 56 tcttagtcta tcccagggtg caa | 23 |
| | <210> 57 <211> 25 <212> ADN | |
| 65 | | |

ES 2 617 258 T5

| | | |
|----|---|----|
| | <213> Secuencia artificial | |
| | <220> | |
| | <223> cebador/sonda | |
| 5 | <400> 57 gtaagccctc agaaccgtct cggaa | 25 |
| | <210> 58 | |
| 10 | <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial | |
| | <220> | |
| 15 | <223> cebador/sonda | |
| | <400> 58 ggactagagg ttagaggaga ccccgagg | 28 |
| 20 | <210> 59 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial | |
| | <220> | |
| 25 | <223> cebador/sonda | |
| | <400> 59 aaggactaga ggtagagga gaccccg | 28 |
| 30 | <210> 60 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial | |
| 35 | <220> | |
| | <223> cebador/sonda | |
| | <400> 60 aaaccactc tatgtccggt c | 21 |
| 40 | <210> 61 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial | |
| | <220> | |
| | <223> cebador/sonda | |
| 50 | <400> 61 gtacgccgga attgccgga a | 21 |
| | <210> 62 | |
| 55 | <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial | |
| | <220> | |
| | <223> cebador/sonda | |
| 60 | <400> 62 cctcaaagaa aaaccaaag a | 21 |
| | <210> 63 | |
| 65 | <211> 26 <212> ADN | |

ES 2 617 258 T5

| | | |
|----|---|----|
| | <213> Secuencia artificial | |
| | <220> | |
| | <223> cebador/sonda | |
| 5 | <400> 63 gcagaaagcg tctagccatg gcgtta | 26 |
| | <210> 64 | |
| 10 | <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial | |
| | <220> | |
| 15 | <223> cebador/sonda | |
| | <400> 64 gcagaaagcg tctagccatg gcgt | 24 |
| 20 | <210> 65 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial | |
| | <220> | |
| 25 | <223> cebador/sonda | |
| | <400> 65 tggcgtctcc cacgcggctg g | 21 |
| 30 | <210> 66 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial | |
| 35 | <220> | |
| | <223> cebador/sonda | |
| | <400> 66 cttccccag gacctgccg t | 21 |
| 40 | <210> 67 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial | |
| 45 | <220> | |
| | <223> cebador/sonda | |
| 50 | <400> 67 gcaagcaccc tataggcagt accac | 25 |
| | <210> 68 | |
| 55 | <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial | |
| | <220> | |
| 60 | <223> cebador/sonda | |
| | <400> 68 ctcgcaagca ccctatcagg cagt | 24 |
| 65 | <210> 69 <211> 28 <212> ADN | |

ES 2 617 258 T5

| | | |
|----|---|----|
| | <213> Secuencia artificial | |
| | <220> | |
| | <223> cebador/sonda | |
| 5 | <400> 69 gcaagcacc ttcaggcag taccaca | 28 |
| | <210> 70 | |
| 10 | <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia artificial | |
| | <220> | |
| 15 | <223> cebador/sonda | |
| | <400> 70 gcaagcacc ttcaggcag taccaca | 27 |
| 20 | <210> 71 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial | |
| | <220> | |
| 25 | <223> cebador/sonda | |
| | <400> 71 tgccgaaa gactgggtcc ttc | 24 |
| 30 | <210> 72 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial | |
| 35 | <220> | |
| | <223> cebador/sonda | |
| | <400> 72 tgccgaaa gactgggtcc ttc | 24 |
| 40 | <210> 73 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial | |
| 45 | <220> | |
| | <223> cebador/sonda | |
| 50 | <400> 73 ccagccatc ccgaaagatc ggcg | 24 |
| | <210> 74 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial | |
| 55 | <220> | |
| | <223> cebador/sonda | |
| 60 | <400> 74 tgtccgtca ttgggcg | 18 |
| | <210> 75 <211> 33 <212> ADN | |
| 65 | | |

ES 2 617 258 T5

<213> Secuencia artificial
<220>
<223> cebador/sonda
5
<400> 75
ccgggagagc catagtggtc tgcggaaccg gtg 33
10
<210> 76
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
15
<220>
<223> cebador/sonda
<400> 76
tctctgcccattctctacc gcattggc 28
20

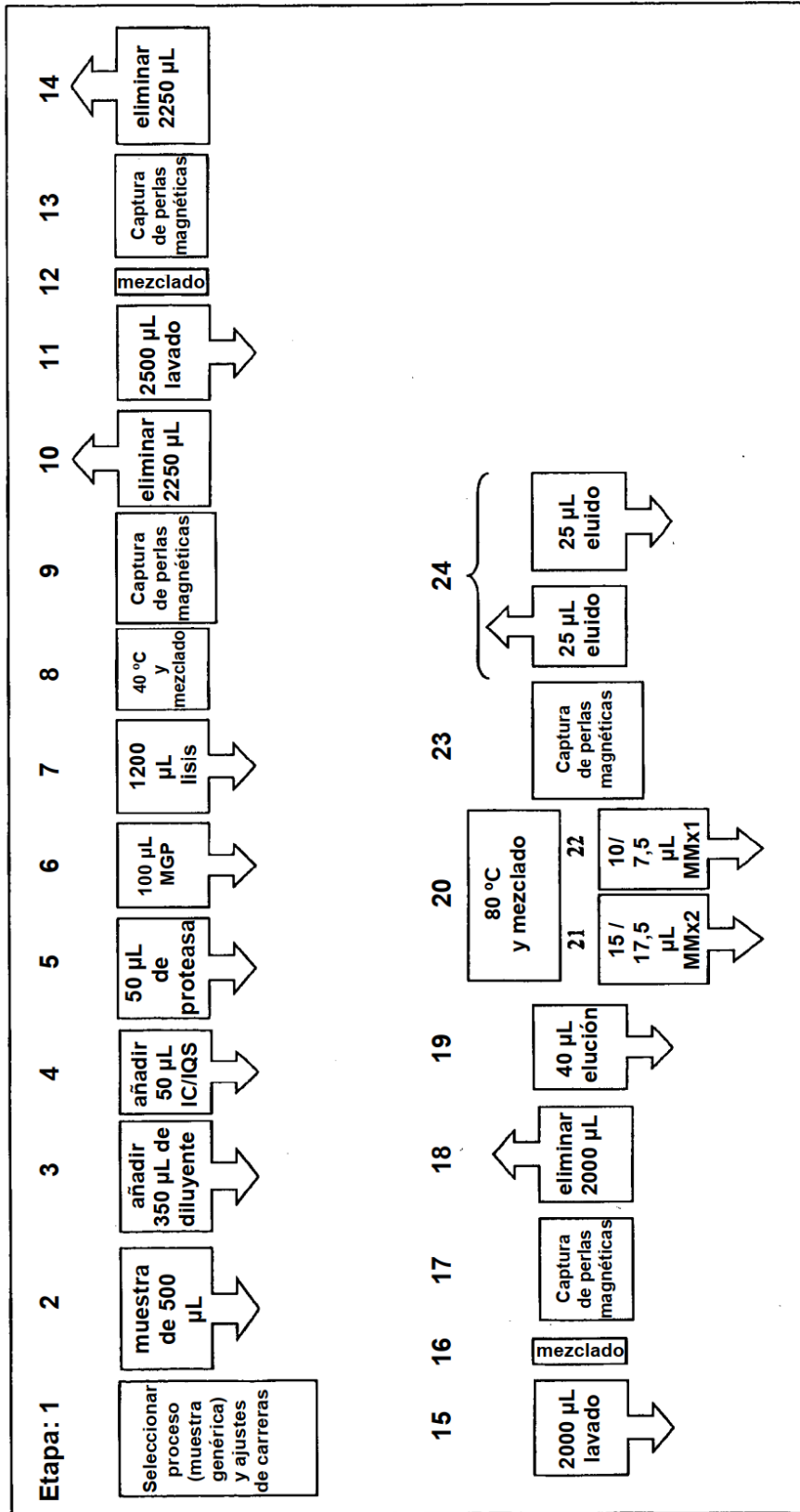
REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para aislar y determinar, de una forma simultánea, la presencia, la no presencia y/o la cantidad, de por lo menos un primer y un segundo ácido nucleico diana, seleccionado de entre bacterias, virus DNA y virus RNA, procedentes de una pluralidad de diferentes tipos de muestras de fluidos, comprendiendo el citado procedimiento las etapas automatizadas de
- a. añadir un tampón de lisis idéntico, el cual tiene un valor pH de 5,8 y el cual comprende un tiocianato de guanidinio 4 M, citrato de Na 50 mM, polidecanol al 5 % y DDT al 2 % p/v, a los miembros de dicha pluralidad de diferentes tipos de muestras de fluidos, y así, de este modo, liberar ácidos nucleicos, a partir del entorno medioambiental celular y/o vírico, mediante el lisado de cápsidas víricas, potencialmente presentes en la pluralidad de diferentes tipos de muestras de fluido, y combinar conjuntamente partículas de vidrio magnéticas y la citada pluralidad de diferentes tipos de muestras de fluido, en un gran número de recipientes correspondientes al número de muestras de fluido, durante un período de tiempo y bajo unas condiciones suficientes como para permitir que los ácidos nucleicos, los cuales comprenden los ácidos nucleicos diana, se inmovilicen en las partículas de vidrio magnéticas,
 - b. aislar las partículas de vidrio magnéticas, del otro material presente en las muestras de fluido, en una estación de separación, la cual comprende uno o más imanes,
 - c. purificar los ácidos nucleicos, en una estación de separación, mediante la separación de la muestra de fluido, de las partículas de vidrio magnéticas, y lavar las partículas de vidrio magnéticas, una o más veces, con un tampón de lavado, mediante la aspiración y la dispensación de la suspensión, la cual comprende el tampón de lavado y las partículas de vidrio magnéticas, una o más veces, mediante la utilización de una pipeta,
 - d. eluir los ácidos nucleicos procedentes de las partículas de vidrio magnéticas, mediante un tampón de elución,
 - e. transferir los ácidos nucleicos purificados y, opcionalmente, las citadas partículas de vidrio magnéticas, a una pluralidad de recipientes de reacción,
 - f. amplificar los ácidos nucleicos diana,
- en donde las condiciones físicas y el citado período de tiempo son idénticos para los miembros de la citada pluralidad de diferentes tipos de muestras de fluido y en donde el primer y/o el segundo ácido nucleico es un ácido nucleico bacteriano.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en donde los recipientes se combinan en la misma configuración integral.
 3. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el primer ácido nucleico diana comprende RNA y el segundo ácido nucleico diana comprende DNA.
 4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el primer ácido nucleico diana y el segundo ácido nucleico diana son de diferentes organismos.
 5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la etapa a. se lleva a cabo a una temperatura de hasta 50 °C.
 6. El procedimiento de la reivindicación 1, en donde la etapa d. se lleva a cabo a una temperatura comprendida dentro de unos márgenes situados entre los 70 °C y los 90 °C.
 7. El procedimiento de la reivindicación 1, en donde la etapa f. comprende las siguientes etapas:
 - i. contactar los ácidos nucleicos purificados, con uno o más reactivos de purificación, que comprenden una polimerasa con una actividad transcriptasa inversa, en por lo menos dos recipientes de reacción, en donde por lo menos un primer recipiente de reacción comprende por lo menos el citado primer ácido nucleico diana, y por lo menos un segundo recipiente de reacción comprende por lo menos el citado segundo ácido nucleico diana, y en donde el segundo ácido nucleico diana se encuentra ausente del primer recipiente de reacción;
 - ii. incubar en los citados recipientes de reacción los citados ácidos nucleicos purificados, con los citados uno o más reactivos de amplificación, durante un período de tiempo, y bajo unas condiciones apropiadas, para que acontezca la transcripción de RNA, mediante la citada polimerasa con actividad transcriptasa inversa;
 - iii. incubar en los citados recipientes de reacción los citados ácidos nucleicos purificados, con los citados uno o más reactivos de amplificación, durante un período de tiempo, y bajo unas condiciones suficientes, para que acontezca una reacción de amplificación indicativa de la presencia o ausencia de los citados primer y segundo ácido nucleicos,

en donde las condiciones para las etapas de transcripción y de amplificación i. a iii. son idénticas para los por lo menos un primer y segundo ácidos nucleicos.

5

Fig. 1



Señales normalizadas
Ensayo cualitativo del HIV, canal diana

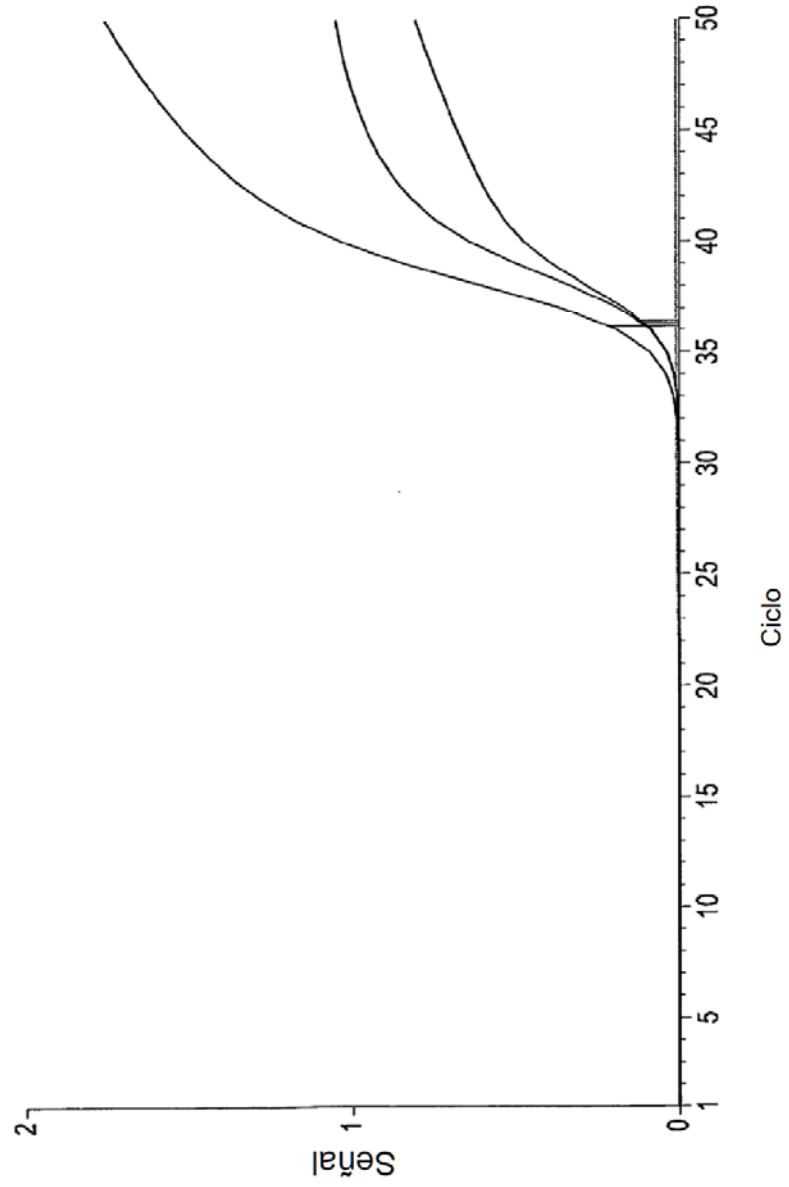
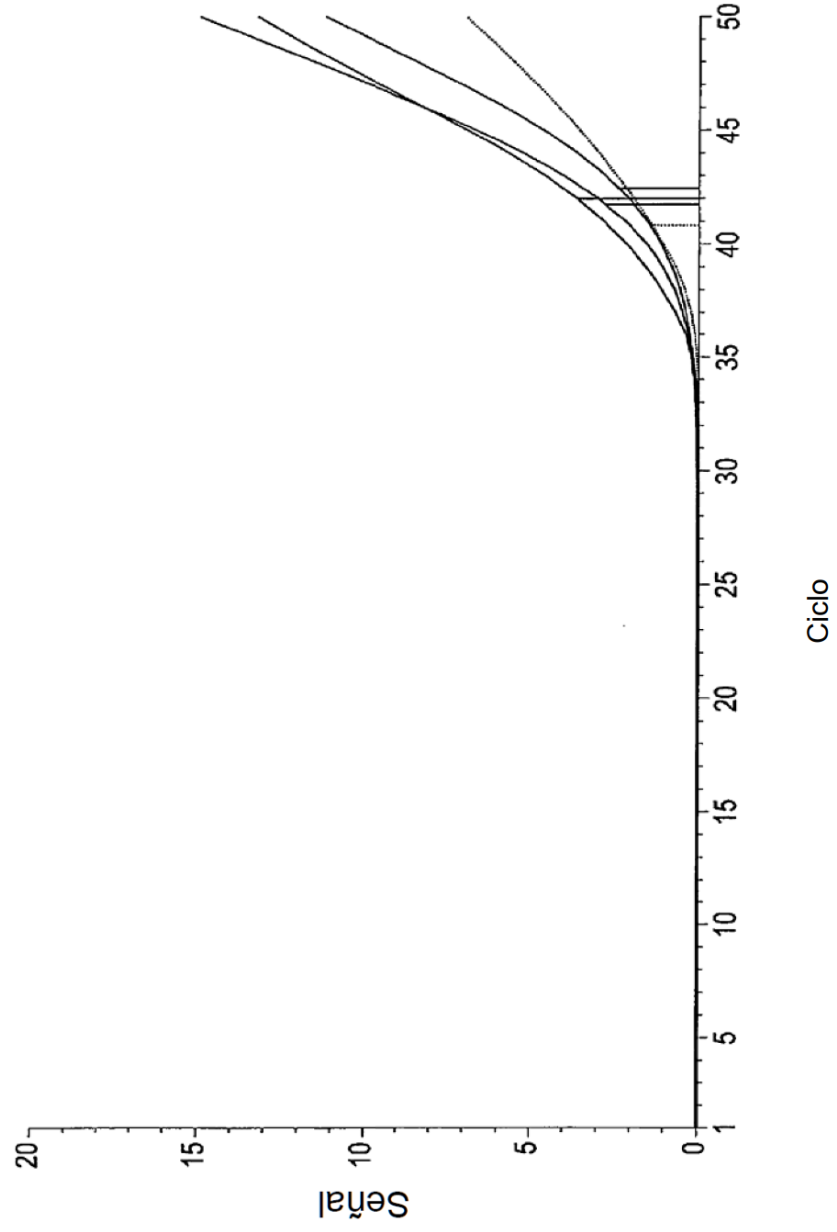


Fig. 2a

Fig. 2b

Señales normalizadas
Ensayo cualitativo del HIV, canal IC



Señales normalizadas
Ensayo cuantitativo del HIV, canal diana

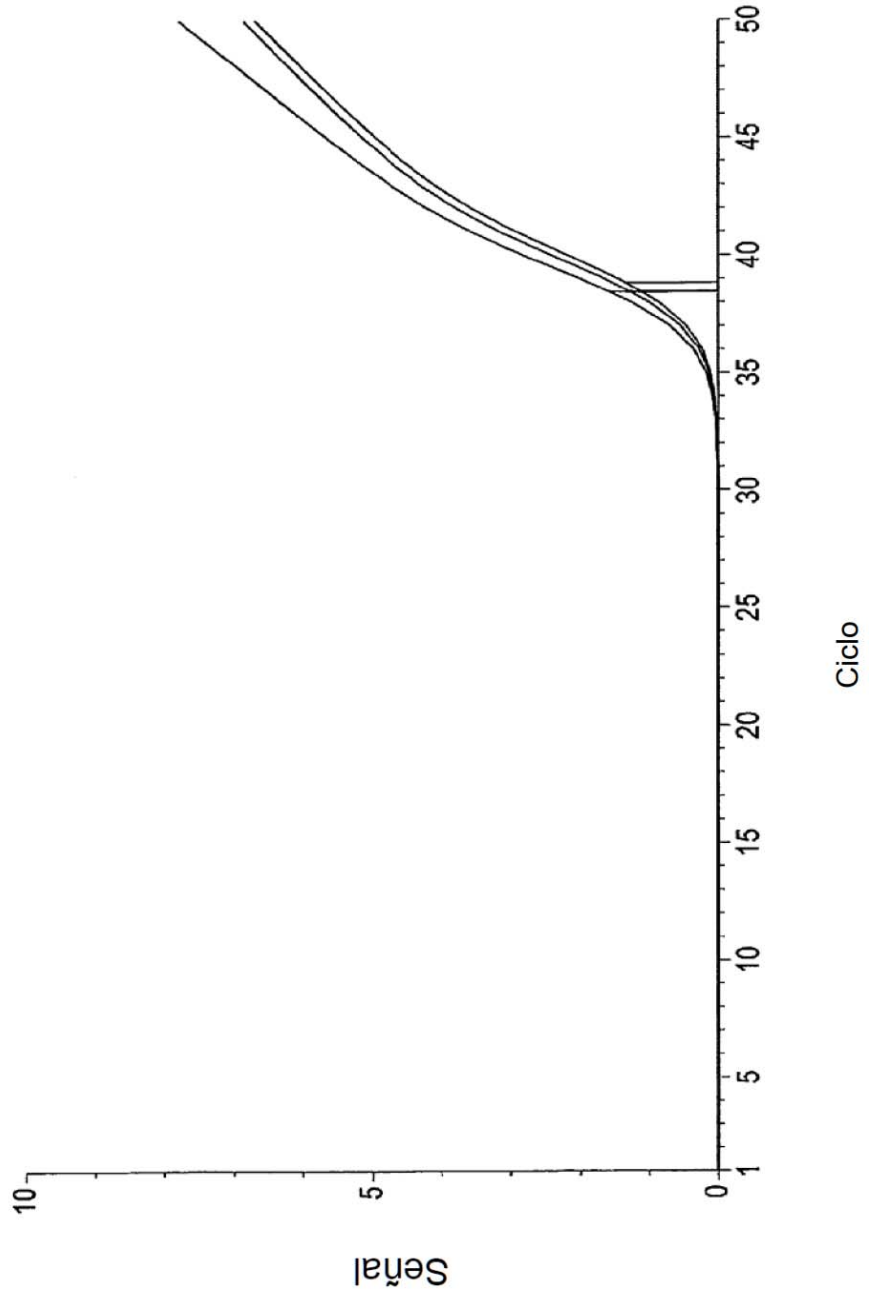


Fig. 2c

Señales normalizadas
Ensayo cuantitativo del HIV, canal QS

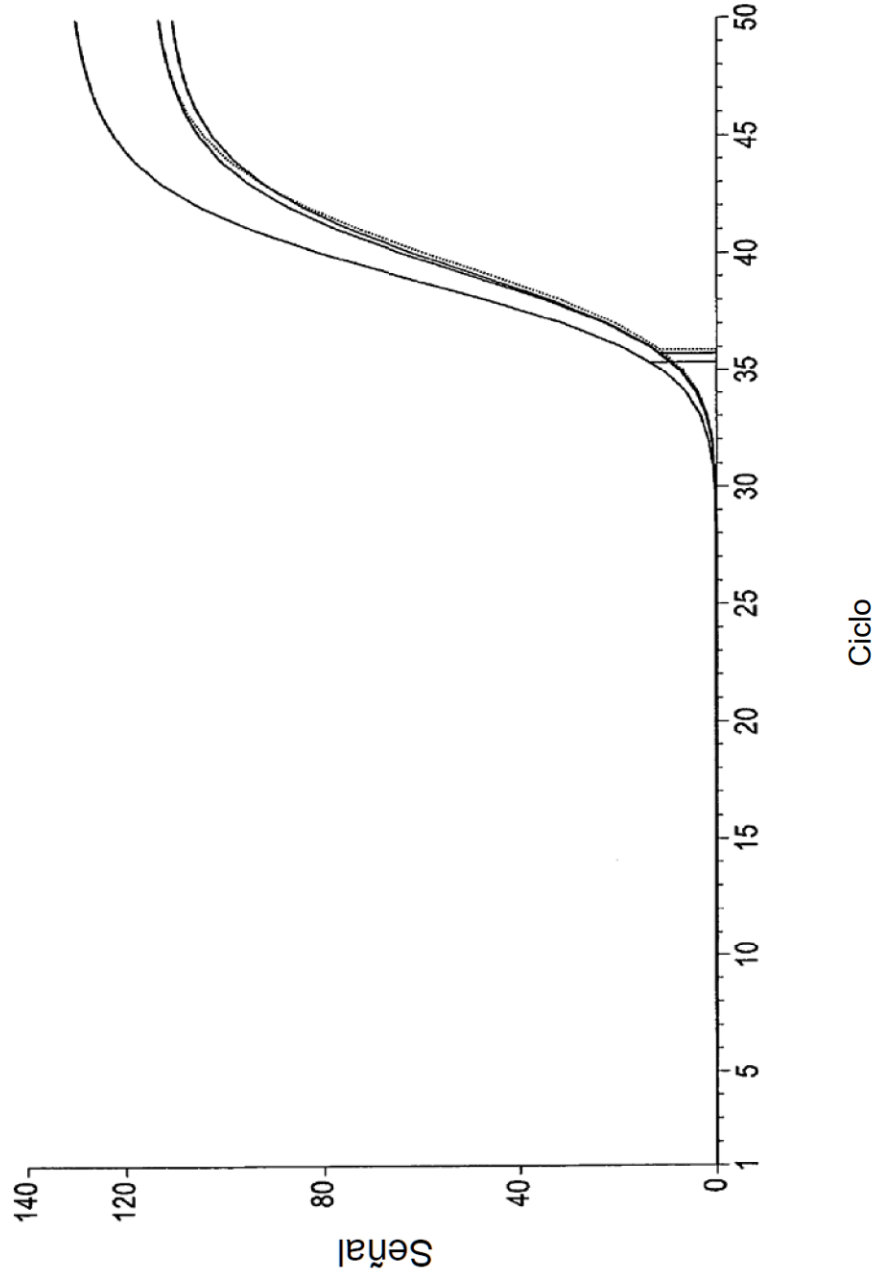


Fig. 2d

Fig. 2e

Señales normalizadas
Ensayo cuantitativo del HBV, canal diana

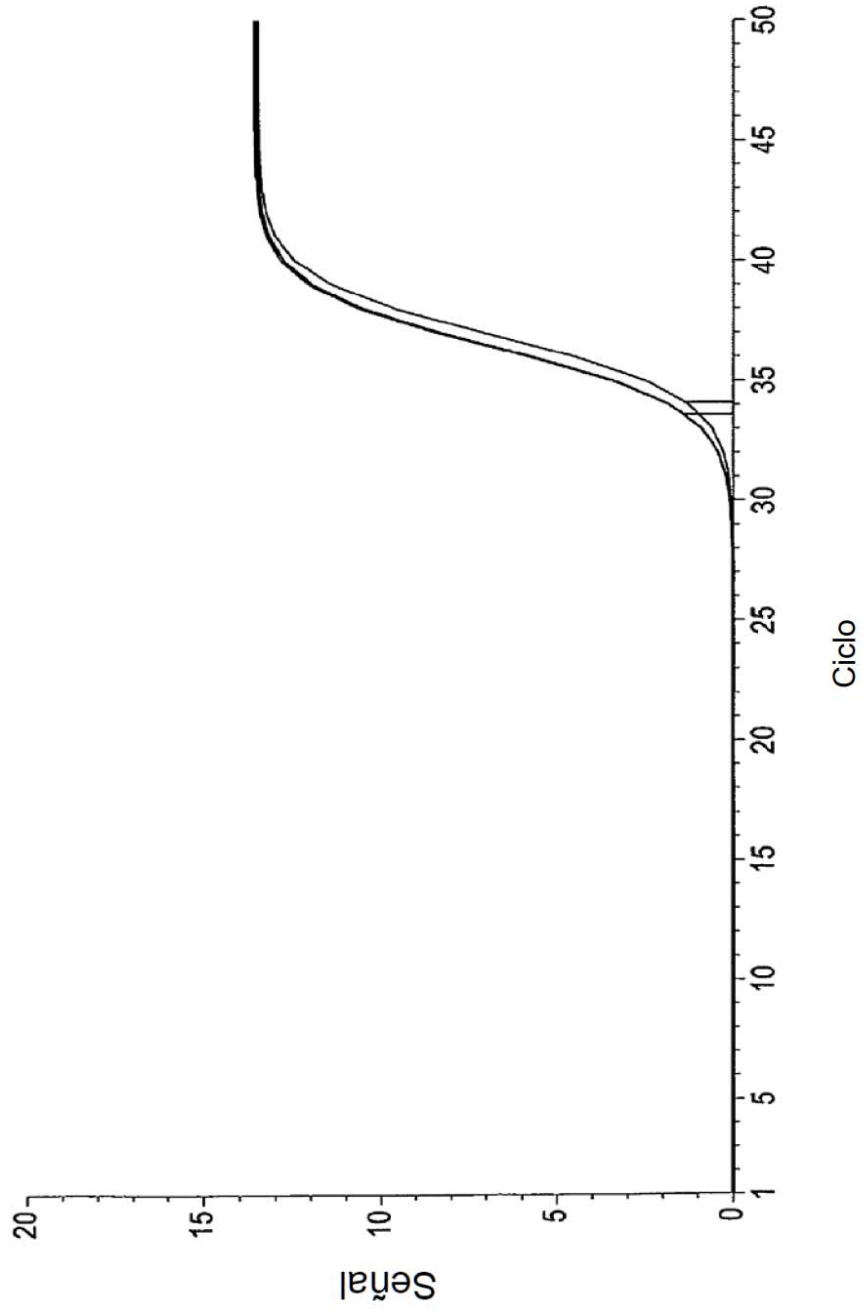
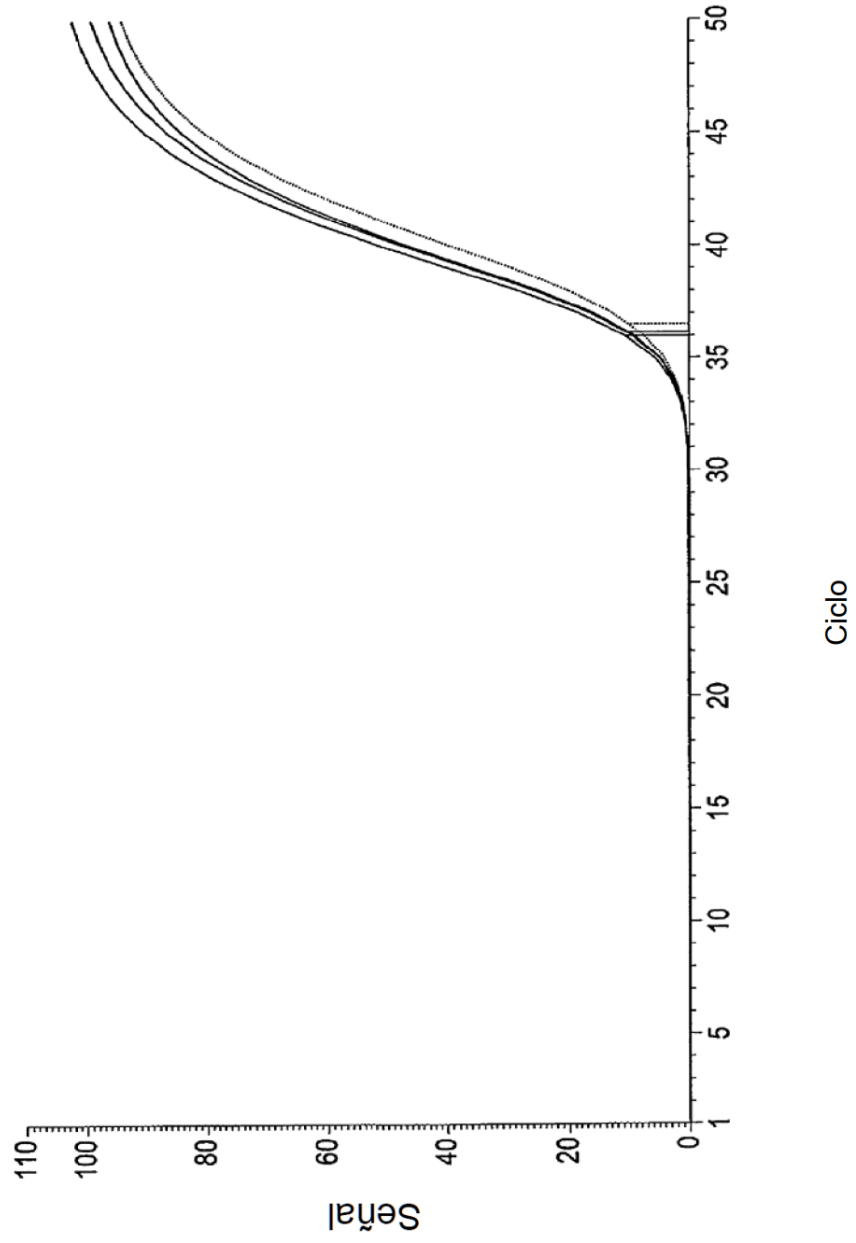


Fig. 2f

Señales normalizadas
Ensayo cuantitativo del HBV, canal QS



Señales normalizadas
Ensayo cuantitativo del CT / NG, canal CT

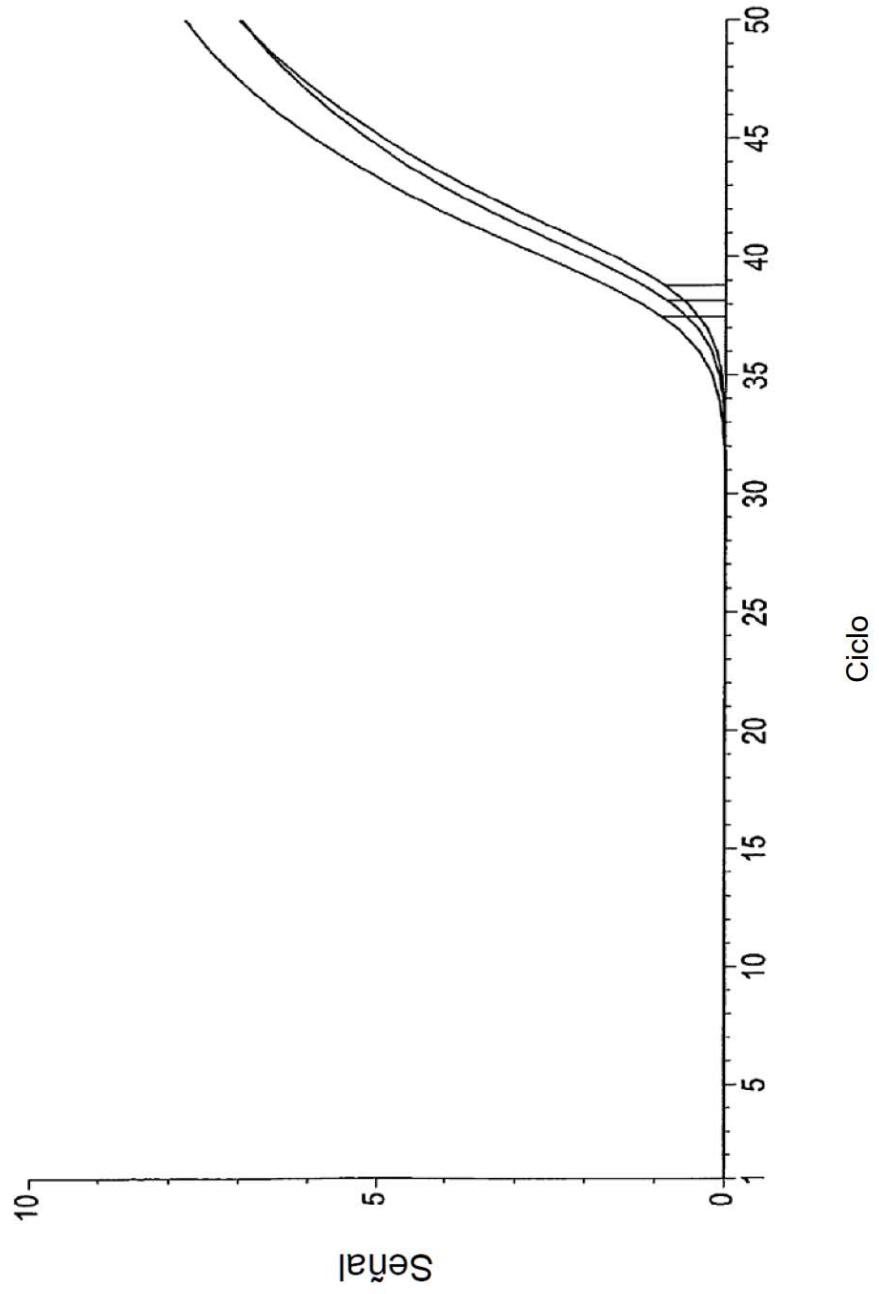
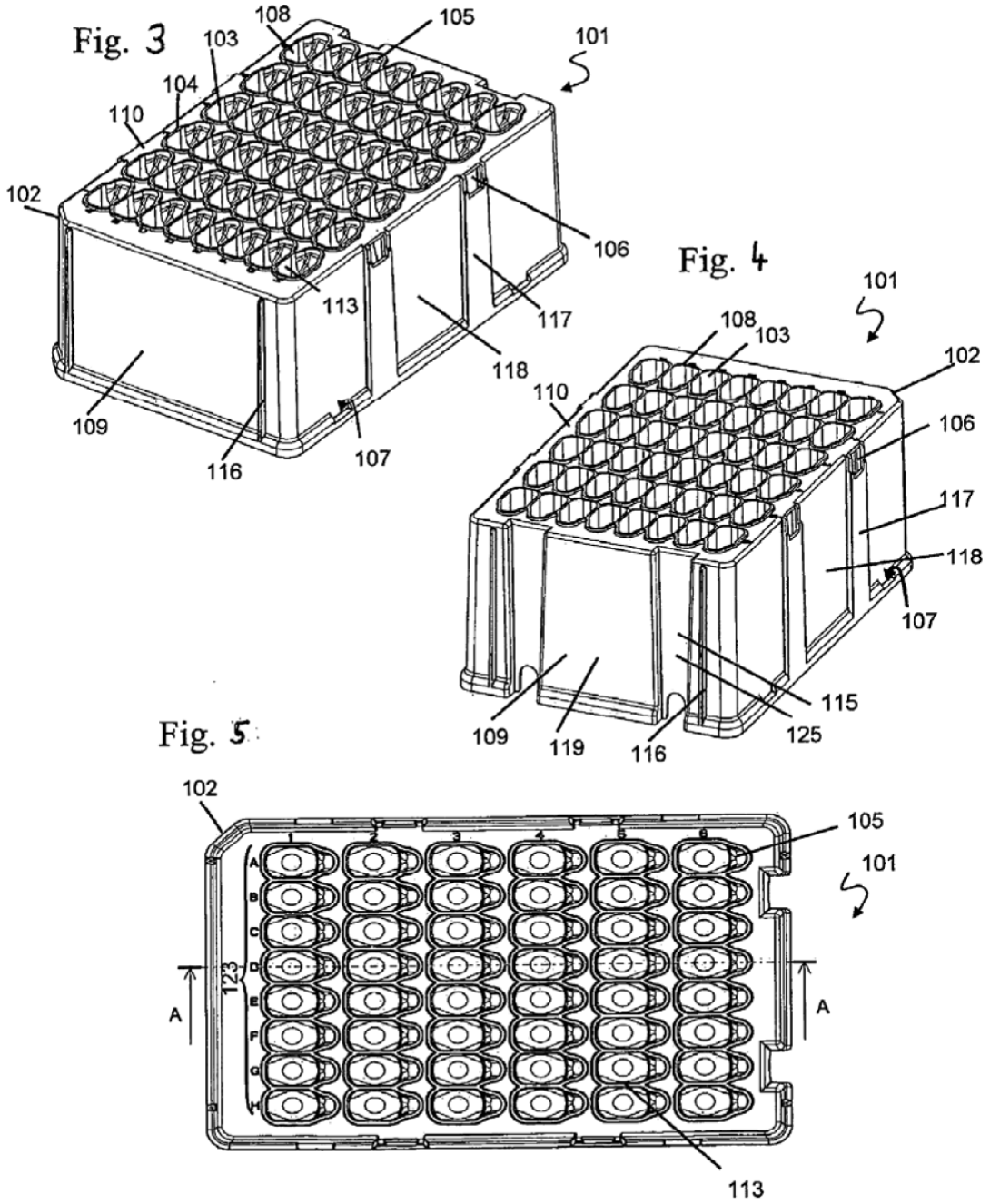


Fig. 2g



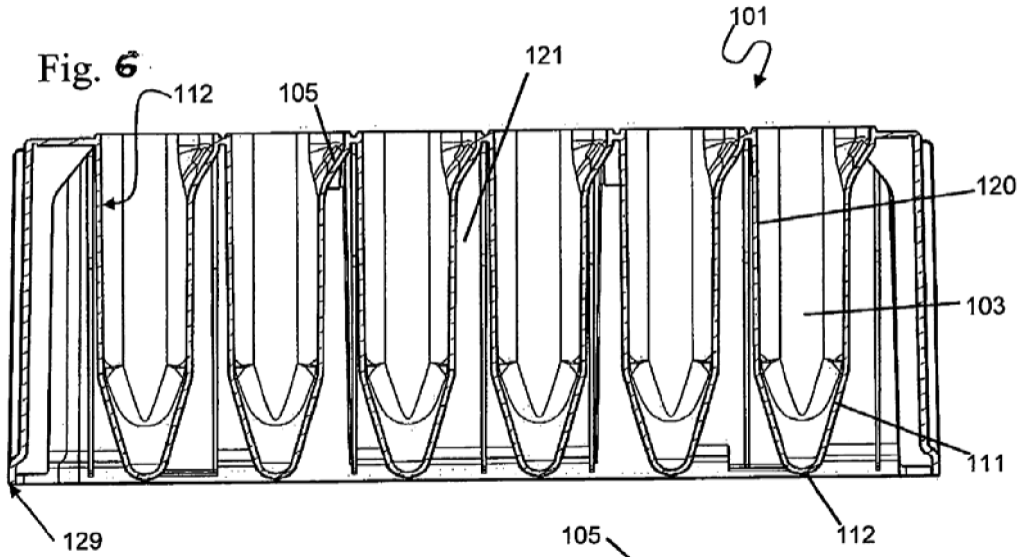


Fig. 7

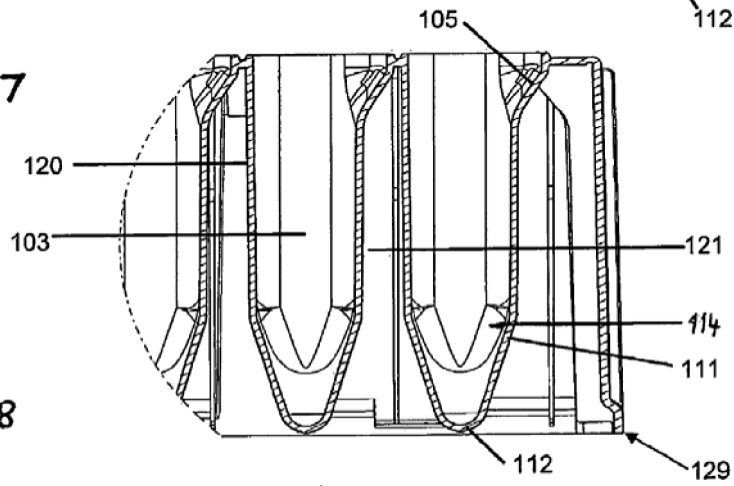


Fig. 8

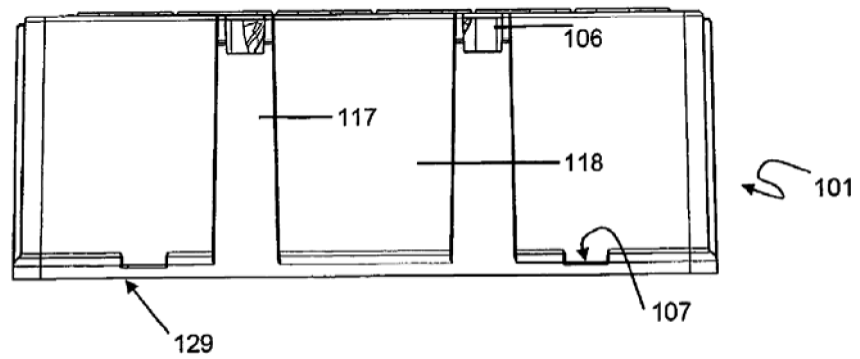
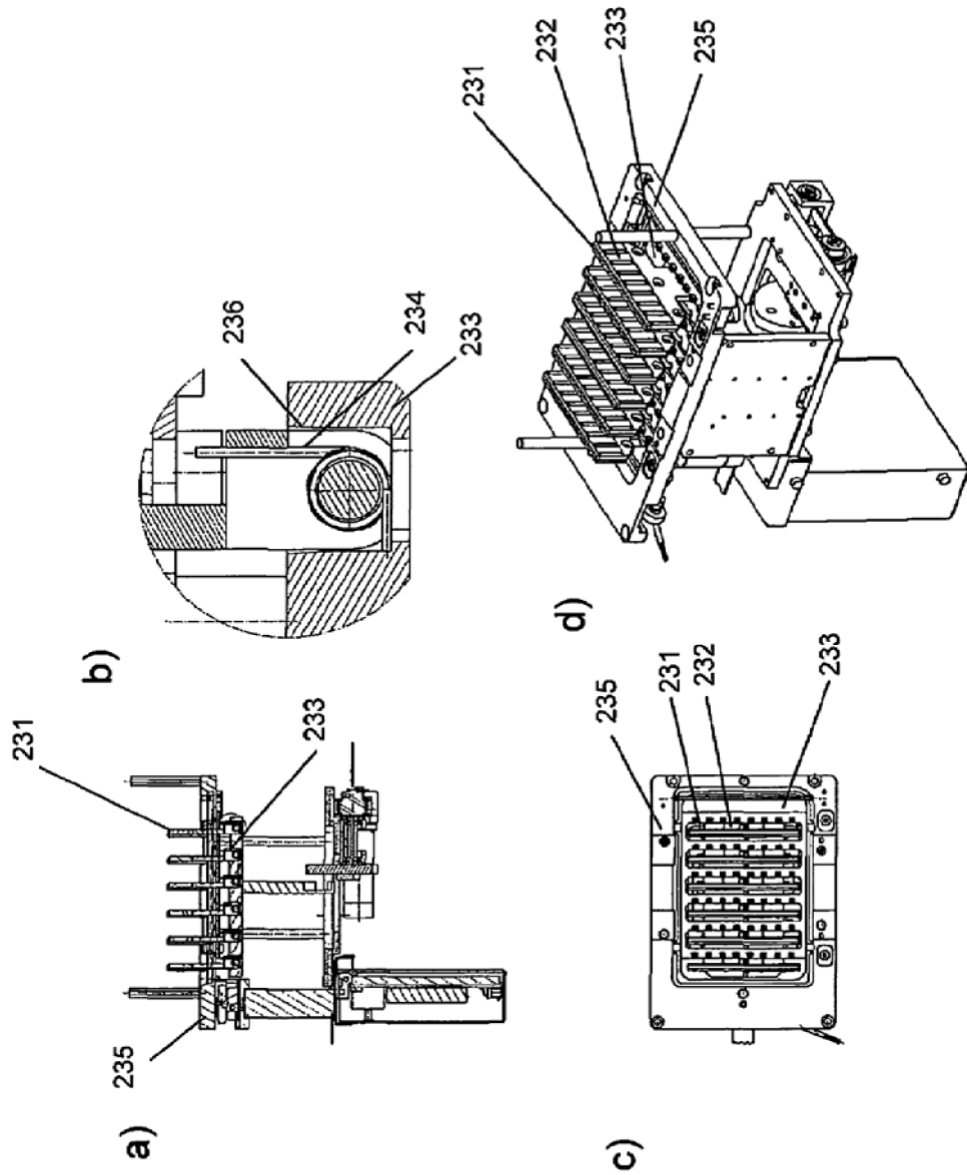
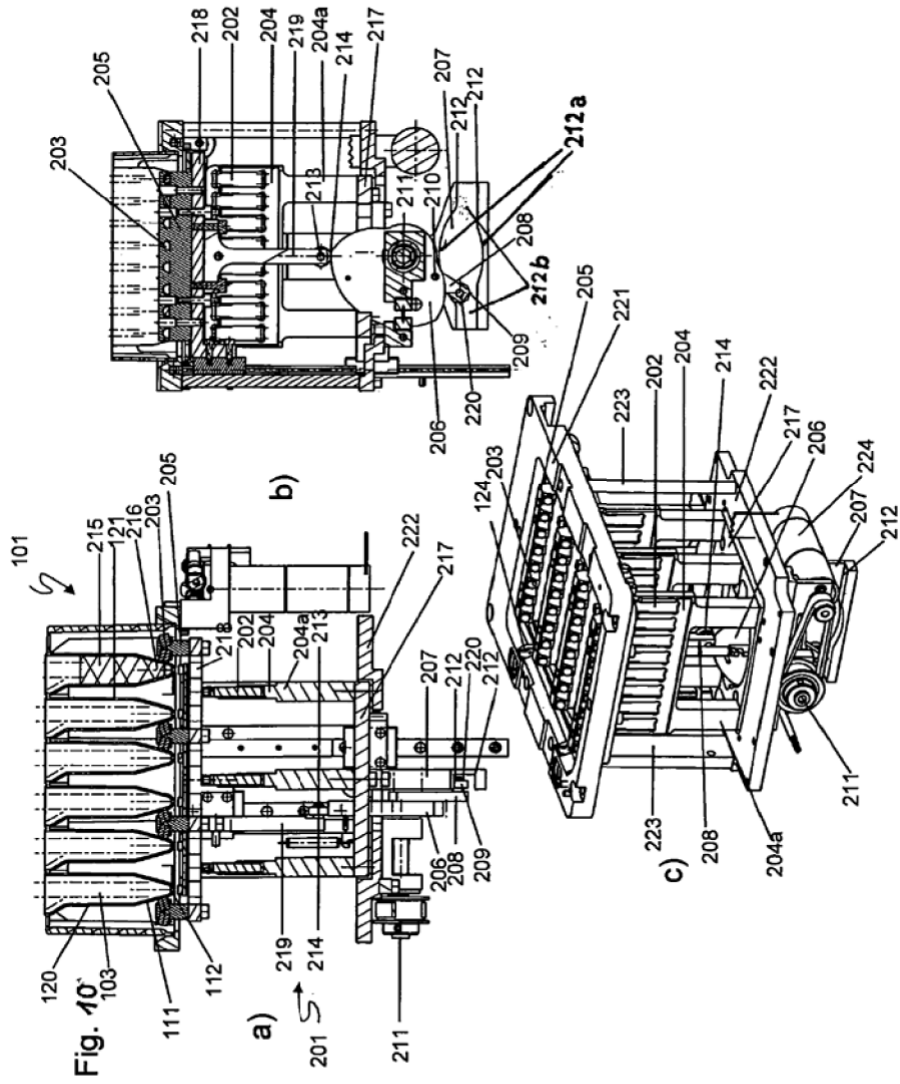


Fig. 9





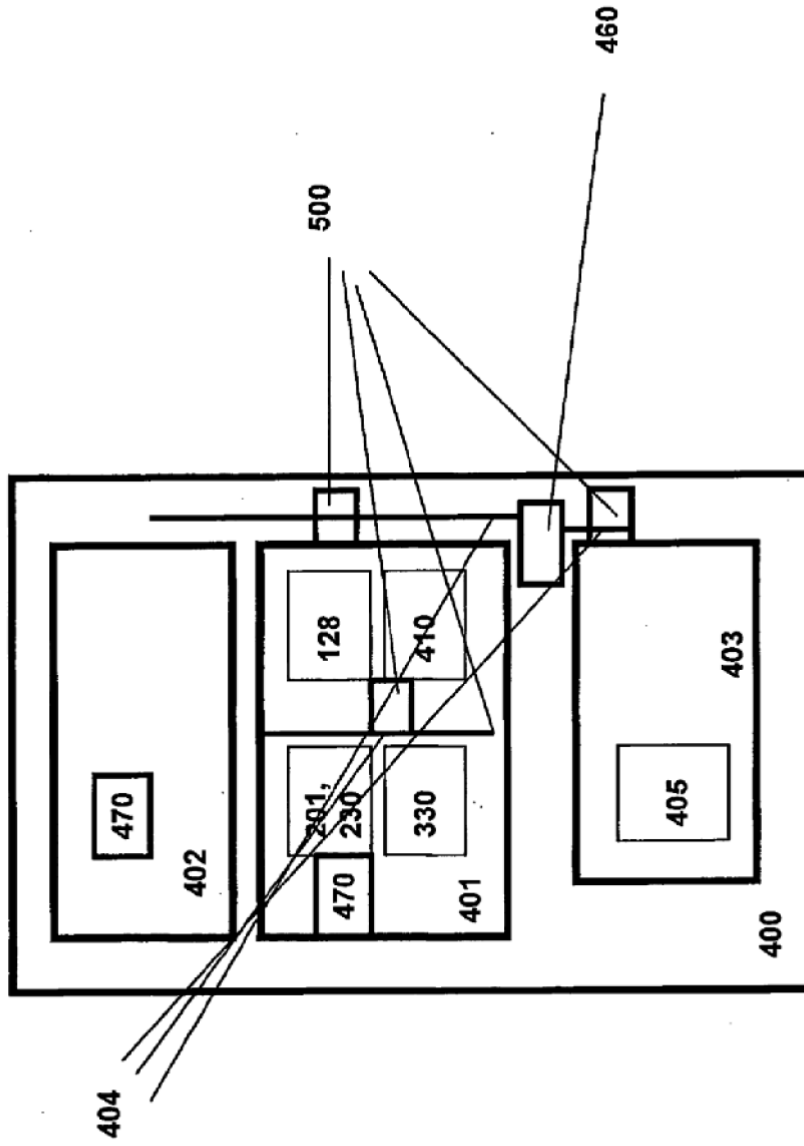
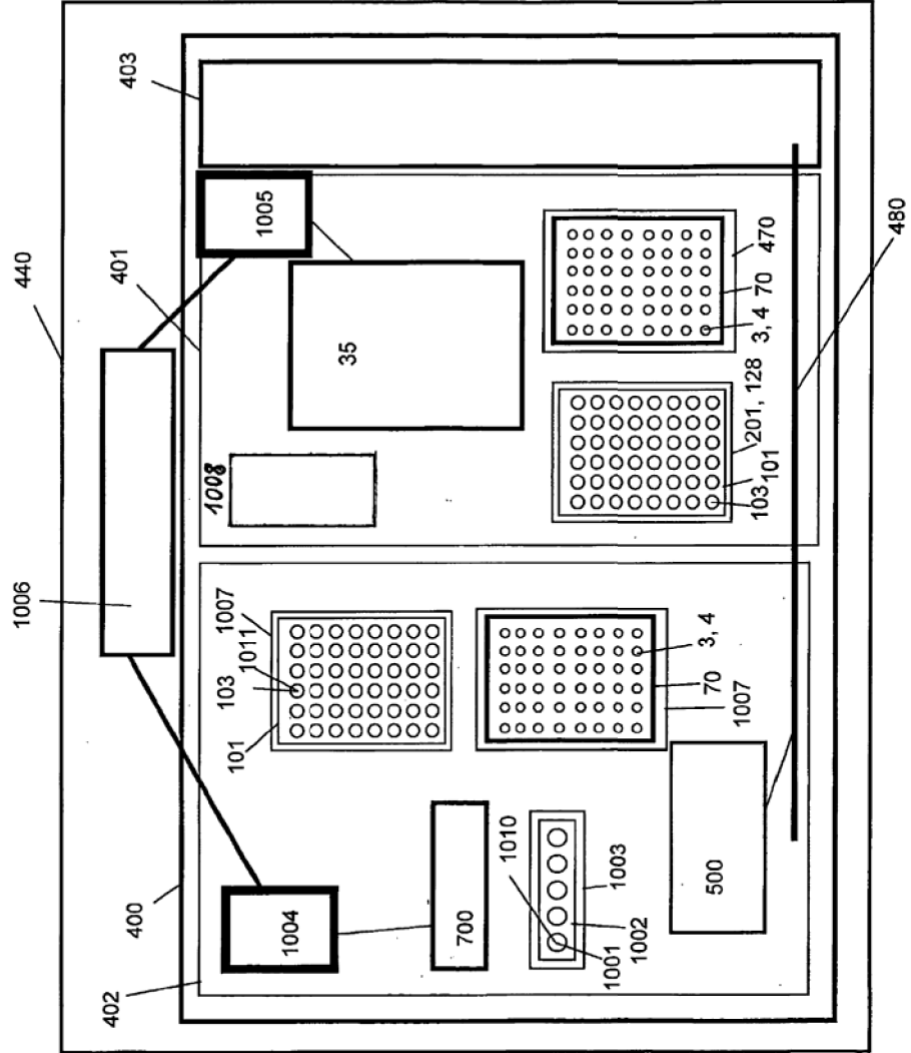


Fig. 11

Fig. 12



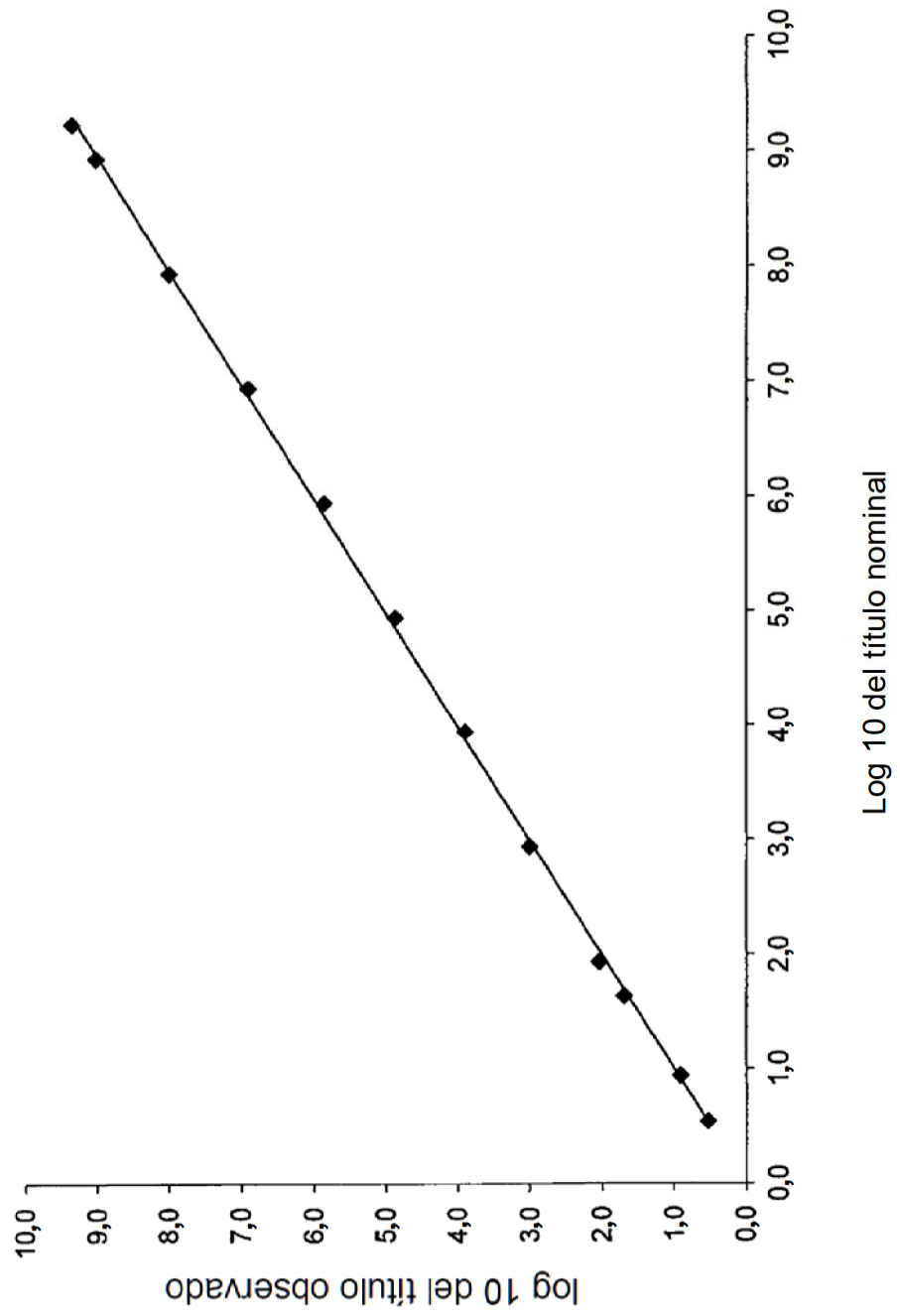


Fig. 13

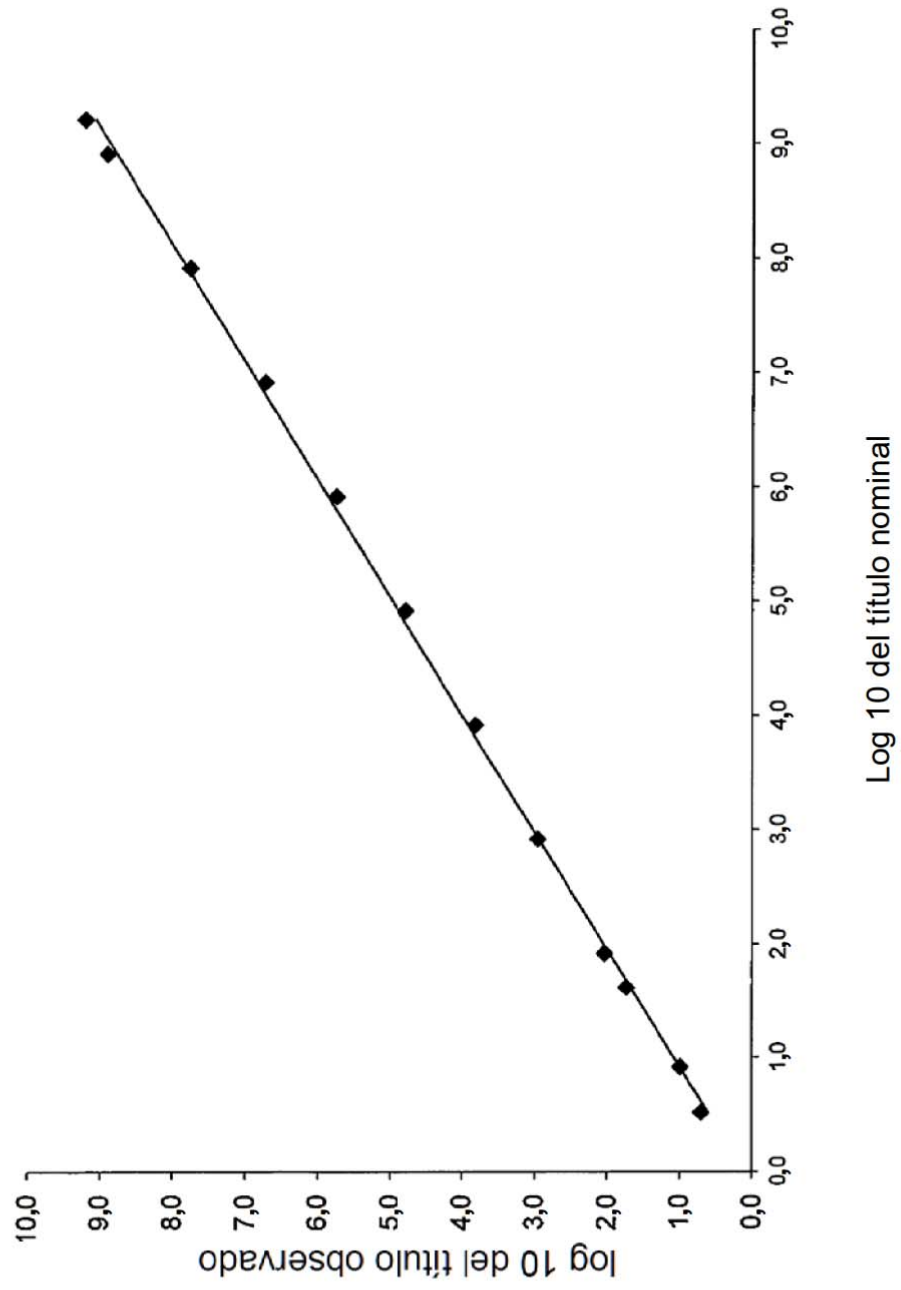
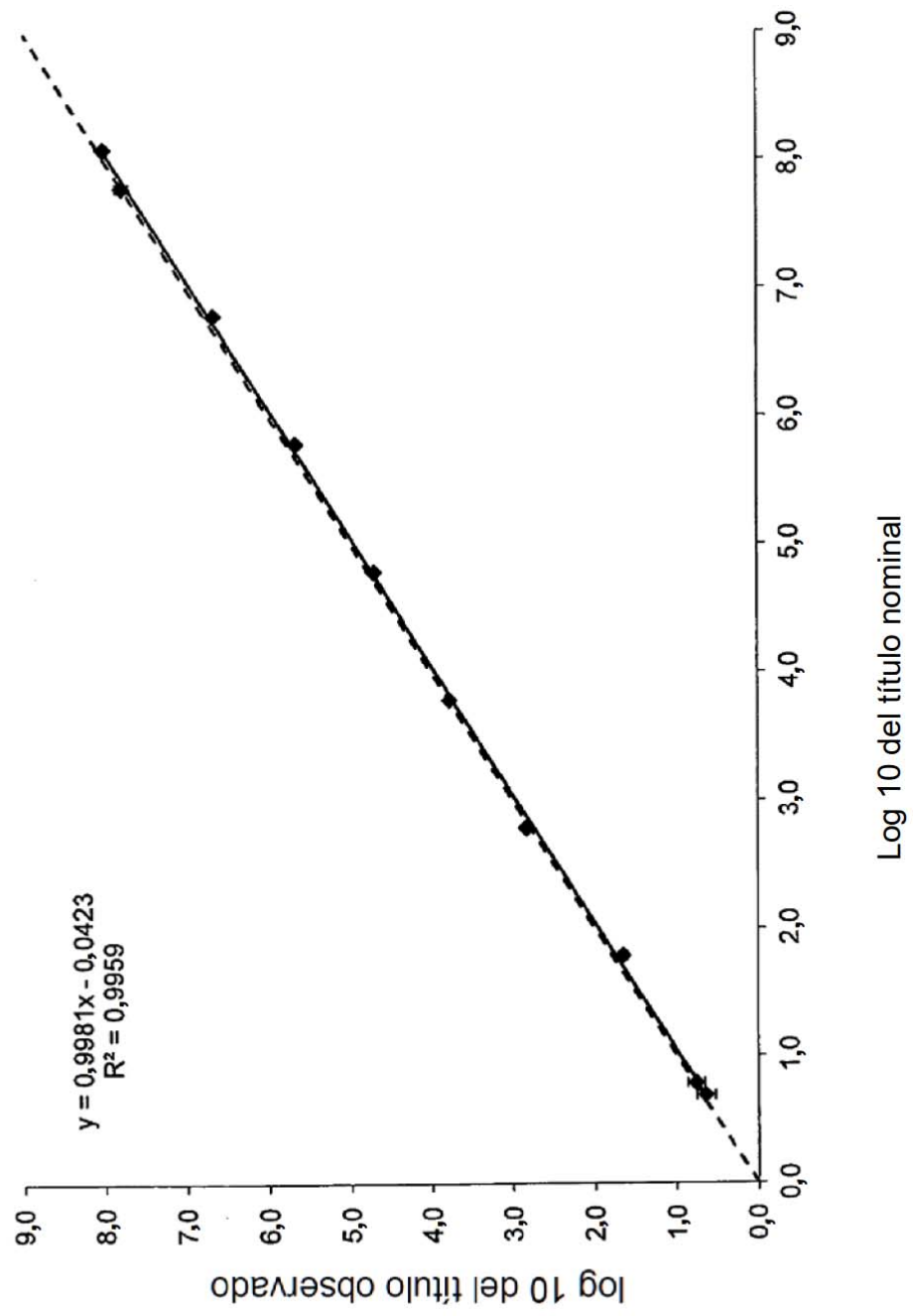


Fig. 14

Fig. 15



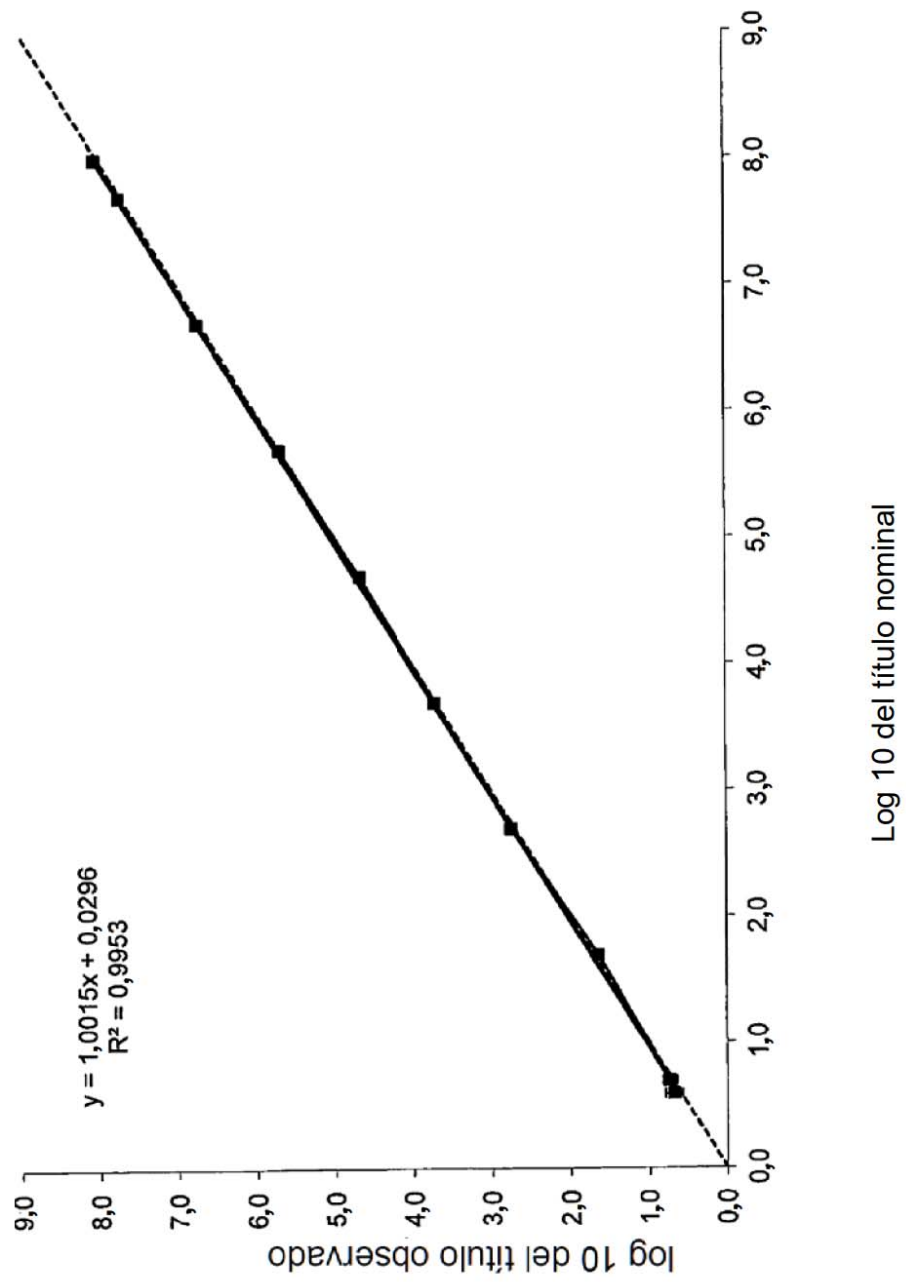


Fig. 16

Fig. 17

Gráfico de regresión lineal de la HIV – 1 MMX

