

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 606 688**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

**C12Q 1/70** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.07.2011 E 14150845 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.09.2016 EP 2759604**

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

30 Prioridad:

**29.07.2010 US 368979 P**  
**07.09.2010 EP 10175538**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**27.03.2017**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 606 688 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Ácidos nucleicos de control para parámetros múltiples

## 5 Campo de la invención

La presente invención pertenece al campo de diagnósticos *in vitro*. Dentro de este campo, se refiere particularmente a la amplificación de al menos un primer y un segundo ácido nucleico diana que puede estar presente en al menos una muestra líquida usando un ácido nucleico de control interno para fines cualitativos y/o cuantitativos.

10

## Antecedentes de la invención

En el campo del diagnóstico molecular, la amplificación de ácidos nucleicos procedentes de numerosas fuentes ha tenido una importancia considerable. Son ejemplos para aplicaciones de diagnóstico de amplificación y detección de ácidos nucleicos la detección de virus tales como el Virus del Papiloma Humano (HPV), el Virus del Nilo occidental (WNV) o la exploración rutinaria de donaciones de sangre para detectar la presencia del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (HIV) Virus de la Hepatitis B (HBV) y/o C (HCV). Adicionalmente, dichas técnicas de amplificación son adecuadas para dianas bacterianas tales como micobacterias, o para el análisis de marcadores oncológicos.

15

20

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

25

Los sistemas automatizados para realizar análisis basados en PCR a menudo utilizan detección en tiempo real de la amplificación de los productos durante el proceso de la PCR en el mismo recipiente de reacción. Es clave para dichos métodos el uso de oligonucleótidos modificados portadores de grupos indicadores o marcadores.

30

Se ha mostrado que es posible efectuar la amplificación y la detección de más de un ácido nucleico diana en el mismo recipiente. Este método se denomina habitualmente amplificación "múltiplex" y requiere diferentes marcadores de diferenciación si la detección se realiza en tiempo real.

35

En su mayor parte es deseable o incluso obligatorio en el campo de diagnósticos clínicos de ácidos nucleicos, controlar la amplificación respectiva usando ácidos nucleicos de control con una secuencia conocida, para fines cualitativos (función de control) y/o cuantitativo (determinación de la cantidad de un ácido nucleico diana usando el control como una referencia). Dada la diversidad especialmente de dianas de diagnóstico, que comprenden ácidos de procariotas, eucariotas, así como de virus, y dada la diversidad entre diferentes tipos de ácidos nucleicos, tales como ARN y ADN, los ácidos nucleicos de control se diseñan normalmente de una manera específica. En resumen, estos controles normalmente se asemejan al ácido nucleico diana para el que sirven como control para imitar sus propiedades durante el proceso. Esta circunstancia se aplica a ensayos tanto cuantitativos como cuantitativos. En caso de detectar parámetros múltiples en un experimento sencillo o en paralelo, normalmente se emplean diferentes controles que se asemejan a diferentes ácidos nucleicos diana, tales como, por ejemplo, los de Swanson *et al.* (J. Clin. Microbiol., (2004), 42, págs. 1863-1868). Stöcher *et al.* (J. Virol. Meth. (2003), 108, págs. 1-8) desvelan un ácido nucleico de control en el que en la misma molécula de ADN se incluyen controles competitivos específicos de virus múltiples.

40

45

Wong *et al.*, Journal of Clinical Microbiology, 2001, 2937-2945, desvelan un ensayo automatizado para el aislamiento y amplificación múltiplex simultánea de HCV, HBV y HIV (es decir, virus de ADN y ARN) en donaciones de sangre usando polimerasa de ZO5 (que también tiene actividad transcriptasa inversa). En el ensayo se incorpora un control interno (CI que consiste en una molécula de ARN de 142 bases) para monitorizar los procesos de extracción, amplificación y detección de la diana de todas las muestras.

50

55

La presente invención proporciona un método de amplificación controlado usando una estrategia diferente que presenta diversas ventajas.

## Descripción de la invención

60

La presente invención proporciona un método para la amplificación controlada de al menos un primer y un segundo ácido nucleico diana que puede estar presente en una muestra líquida, como se define en las reivindicaciones adjuntas.

65

En un primer aspecto, la presente divulgación se refiere a un proceso para el aislamiento y amplificación simultánea de al menos un primer y un segundo ácido nucleico diana que puede estar presente en una o más muestras líquidas, comprendiendo dicho proceso las etapas automatizadas de:

a. añadir un ácido nucleico de control interno a cada una de dichas muestras líquidas

b. combinar a la vez un material de soporte sólido y dicha una o más muestras líquidas en uno o más recipientes durante un período de tiempo y en condiciones suficientes para permitir que los ácidos nucleicos que comprenden los ácidos nucleicos diana y el ácido nucleico de control interno se inmovilicen sobre el material de soporte sólido

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

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

e. poner en contacto los ácidos nucleicos diana purificados y el ácido nucleico de control interno purificado con uno o más reactivos de amplificación que comprenden al menos un conjunto distinto de cebadores para cada uno de dichos ácidos nucleicos diana y para dicho ácido nucleico de control interno en al menos dos recipientes de reacción, en el que al menos un primer recipiente de reacción comprende al menos dicho primer ácido nucleico diana y al menos un segundo recipiente de reacción comprende al menos dicho segundo ácido nucleico diana y en el que el segundo ácido nucleico diana no está presente en el primer recipiente de reacción

f. incubar en dicho recipiente de reacción dichos ácidos nucleicos diana purificados y dicho ácido nucleico de control interno purificado con dicho uno o más reactivos de amplificación durante un período de tiempo y en condiciones suficientes para que se produzca una reacción de amplificación indicadora de la presencia o ausencia de dichos ácidos nucleicos diana

g. detectar y medir señales generadas por los productos de amplificación de dichos ácidos nucleicos diana y que es proporcional a la concentración de dichos ácidos nucleicos diana, y detectar y medir una señal generada por dicho ácido nucleico de control interno,

en el que las condiciones para la amplificación y detección en las etapas d. a g. son idénticas para dichos al menos primer y segundo ácidos nucleicos diana purificados y dicho ácido nucleico de control interno, y en el que la secuencia de dichos ácidos nucleicos de control interno es idéntica para dichos al menos primer y segundo ácidos nucleicos diana purificados.

Dicho método permite el desarrollo de ensayos simultáneos en una pluralidad de parámetros y/o tipos de ácido nucleico, usando al mismo tiempo la misma secuencia de ácido nucleico de control interno para dichos parámetros diferentes y/o tipos de ácido nucleico. Por lo tanto, esto contribuye a reducir la complejidad global de los experimentos correspondientes en diversos niveles: Por ejemplo, solo ha de diseñarse una secuencia de ácido nucleico de control interno y añadirse a las mezclas de amplificación respectivas, ahorrando así tiempo y costes para diseñar y sintetizar o adquirir secuencias de ácido nucleico de control múltiples. El ensayo o los ensayos pueden rentabilizarse, y se reduce el riesgo de que se produzcan errores durante la manipulación. Asimismo, cuando en un ensayo o en ensayos paralelos, realizados simultáneamente en las mismas condiciones, se emplean las secuencias de ácido nucleico de control más diferentes, la más compleja puede resultar del ajuste de las condiciones respectivas. Además, con un solo control adecuado para una pluralidad de ácidos nucleicos, dicho control puede dispensarse de una sola fuente, por ejemplo, en recipientes diferentes que contengan dichos ácidos nucleicos diana diferentes. Dentro del alcance de la invención, la única secuencia de ácido nucleico de control también puede servir como un control cualitativo y como uno cuantitativo.

Como una ventaja adicional del método descrito anteriormente, el ensayo de una muestra biológica particular para otros ácidos nucleicos en posibles experimentos posteriores no implica necesariamente otro procedimiento de preparación de muestras con de la adición de un ácido nucleico de control interno diferente, dado que el control que se usa en la invención puede usarse para controlar la amplificación de ácidos nucleicos diferentes. Por tanto, una vez que se ha añadido un ácido nucleico de control interno, puede ensayarse otros parámetros en la misma muestra en las mismas condiciones.

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

Un ácido nucleico de control interno competitivo lleva esencialmente los mismos sitios de unión al cebador que la diana y por tanto compite por los mismos cebadores con la diana. Aunque este principio permite una buena imitación del ácido nucleico diana respectivo debido a su estructura similar, esto puede reducir la eficacia de la amplificación con respecto a uno o más ácidos nucleico diana y por tanto 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 por tanto se une a diferentes cebadores. Las ventajas de dicha configuración comprenden, entre otras, el hecho de que en la mezcla de reacción pueden llevarse a cabo sucesos de amplificación simple de los ácidos nucleicos diferentes independientemente entre sí, sin que se produzca ningún efecto competitivo. Por tanto, no se producen efectos

adversos con respecto al límite de detección de los ensayos como puede ser el caso en una configuración competitiva.

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

10 El hecho de que el método descrito anteriormente implique un conjunto de cebadores distinto para cada uno de dichos ácidos nucleico diana y para dicho ácido nucleico de control interno hace que el método sea considerablemente flexible. En una configuración no competitiva no es necesario introducir sitios de unión específicos de diana en el ácido nucleico de control como es el caso de una configuración competitiva y se evitan los inconvenientes de una configuración competitiva, como se ha mencionado anteriormente. En una configuración no competitiva, el ácido nucleico de control interno tiene una secuencia diferente de cualquiera de las secuencias diana, para no competir con sus cebadores y/o sondas. Preferentemente, la secuencia del ácido nucleico de control interno es diferente de las otras secuencias de ácido nucleico en la muestra líquida. Como ejemplo, si la muestra líquida procede de un ser humano, el ácido nucleico de control interno no tendrá preferentemente una secuencia que también se produzca de manera endógena en seres humanos. La diferencia en la secuencia debe por tanto ser al menos lo suficientemente significativa para no permitir la unión de cebadores y/o sondas con el ácido nucleico o ácidos nucleicos endógeno(s) respectivo(s) en condiciones rigurosas y por tanto volver competitiva la configuración. Para impedir dicha interferencia, la secuencia del ácido nucleico de control interno usada en la invención procede preferentemente de una fuente diferente de la del origen de la muestra líquida. Preferentemente, procede de un genoma de origen natural, preferentemente un genoma vegetal, adicionalmente de manera preferente de un genoma de uva. En una realización muy preferida, un ácido nucleico procedente de un genoma de origen natural se transloca. Como se sabe en la técnica, "translocación" significa introducir mutaciones de bases en una secuencia a un nivel determinado. Preferentemente, la secuencia del ácido nucleico de control interno usada en la invención se altera sustancialmente con respecto al gen de origen natural del cual procede.

25 El proceso, que comprende las etapas automatizadas mencionadas anteriormente, también muestra diversas ventajas adicionales:

30 En la técnica anterior ha sido un reto que el número de diversos ácidos nucleicos diana diferentes en un ensayo múltiple, realizado en un solo recipiente de reacción, esté limitado por el número de marcadores apropiados. En un ensayo de PCR en tiempo real, por ejemplo, el posible solapamiento de espectros de fluorocromos tiene un gran impacto sobre el rendimiento del ensayo (riesgo de resultados positivos falsos, menor precisión etc.) Por lo tanto, los fluoróforos respectivos tienen que seleccionarse cuidadosamente y separarse bien desde el punto de vista espectral, para garantizar el rendimiento deseado de un ensayo de diagnóstico. Típicamente, el número de diferentes fluoróforos que puede utilizarse corresponde a un número de un solo dígito de canales de fluorescencia del instrumento PCR.

40 En cambio, en el proceso descrito anteriormente, la amplificación internamente controlada de al menos un primer y un segundo ácido nucleico diana tiene lugar en al menos dos recipientes de reacción diferentes, lo que permite realizar la amplificación simultánea de un mayor número de ácidos nucleicos diana diferentes, ya que pueden detectarse señales en diferentes recipientes de reacción independientemente entre sí. No obstante, dentro del alcance de la presente invención, hay realizaciones en las que se realizan reacciones multiplex en uno o más de los múltiples recipientes de reacción, multiplicando de este modo el número de dianas que puede amplificarse simultáneamente y en las mismas condiciones. En dichas realizaciones, el ácido nucleico de control interno sirve como un control para los ácidos nucleicos diana diferentes dentro de un recipiente así como para ácidos nucleicos diana diferentes en un recipiente diferente.

50 Por tanto, un aspecto preferido de la divulgación se refiere al proceso descrito anteriormente, en el que al menos dos ácidos nucleicos diana se amplifican en el mismo recipiente de reacción.

55 En otros casos, puede preferirse amplificar el primer, pero no el segundo ácido nucleico diana, en el primer recipiente de reacción y solo el segundo, pero no el primer ácido nucleico diana, en el segundo recipiente de reacción, dependiendo, por ejemplo, de la muestra y/o del ácido nucleico o ácidos nucleicos diana en cuestión.

Por lo tanto, una realización preferida adicional de la divulgación es el proceso descrito anteriormente, en el que el primer ácido nucleico diana no está presente en el segundo recipiente de reacción.

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

65

Un aspecto preferido adicional de la divulgación es el proceso descrito anteriormente, en el que el primer y/o el segundo ácido nucleico diana es un ácido nucleico no vírico.

5 También, un aspecto preferido de la divulgación es el proceso descrito anteriormente, en el que el primer y/o el segundo ácido nucleico diana es un ácido nucleico bacteriano.

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

10 La detección cualitativa de un ácido nucleico en una muestra biológica es crucial, por ejemplo, para reconocer una infección de un individuo. Por lo tanto, un requisito importante para un ensayo de detección de una infección microbiana, es que se impidan los resultados negativos falsos o positivos falsos, dado que dichos resultados podrían conducir casi inevitablemente a consecuencias graves con respecto al tratamiento del paciente respectivo. Por tanto, especialmente en métodos basados en PCR, a la mezcla de detección se añade un ácido nucleico de control interno cualitativo. Dicho control es particularmente importante para confirmar la validez de un resultado de ensayo: Al menos en el caso de un resultado negativo con respecto al ácido nucleico diana respectivo, la reacción de control interno cualitativo debe comportarse reactiva en configuraciones determinadas, es decir, debe seleccionarse el control interno cualitativo, de otra manera se considera que el propio ensayo no es operativo. Sin embargo, en una configuración cualitativa, dicho control interno cualitativo no tiene que detectarse necesariamente en caso de un resultado positivo. Para ensayos cualitativos, es especialmente importante que se garantice la sensibilidad de la reacción y que, por lo tanto, se controle estrictamente. Como una consecuencia, la concentración del control interno cualitativo debe ser relativamente baja, de forma que, incluso en una situación, por ejemplo, de ligera inhibición, el control interno cualitativo no se detecte y por lo tanto el ensayo se invalide.

25 Por tanto, un aspecto preferido de la divulgación es el proceso descrito anteriormente, en el que la presencia de un producto de amplificación de dicho ácido nucleico de control interno es indicadora de que se produce una amplificación en la mezcla de reacción incluso en ausencia de productos de amplificación para uno o más de dichos ácidos nucleicos diana.

30 Por otro lado y además de la mera detección de la presencia o ausencia de un ácido nucleico en una muestra, es a menudo importante determinar la cantidad de dicho ácido nucleico. Como un ejemplo, el estadio y la gravedad de una enfermedad vírica pueden evaluarse en función de la carga viral. Además, la monitorización de cualquier terapia requiere información sobre la cantidad de un patógeno presente en un individuo para evaluar el éxito de la terapia. Para un ensayo cuantitativo, es necesario introducir un ácido nucleico patrón cuantitativo que sirva como una referencia para determinar la cantidad absoluta de un ácido nucleico diana. La cuantificación puede efectuarse bien buscando una calibración externa o implementando un patrón cuantitativo interno.

40 En el caso de una calibración externa, se crean curvas patrón en reacciones distintas usando cantidades conocidas de ácidos nucleicos idénticos o comparables. La cantidad absoluta de un ácido nucleico diana se determina posteriormente comparando el resultado obtenido con la muestra analizada con dicha función patrón. Sin embargo, la calibración externa tiene la desventaja de que en el control no se refleje un posible procedimiento de extracción, su eficacia modificada, y la posible y con frecuencia presencia de agentes no predecibles que inhiben la reacción de amplificación y/o detección.

45 Esta circunstancia se aplica a cualquiera de los efectos relacionados con las muestras. Por lo tanto, podría darse el caso de que una muestra se considere como negativa debido a un procedimiento de extracción ineficaz o a otros factores basados en la muestra, mientras que el ácido nucleico diana a detectar y cuantificar está realmente presente en la muestra.

50 Por estas y otras razones, la adición de un ácido nucleico de control interno a la propia reacción de ensayo es una ventaja. Cuando sirve como un patrón cuantitativo, dicho ácido nucleico de control interno tiene al menos las dos funciones siguientes en un ensayo cuantitativo:

- i) Controla la validez de la reacción.
- 55 ii) Sirve como referencia para calcular el título compensando así los efectos de inhibición y controlando los procesos de preparación y amplificación para permitir una cuantificación más precisa. Por lo tanto, a diferencia del ácido nucleico de control interno cualitativo en un ensayo cualitativo que debe ser positivo solo en una reacción diana negativa, el ácido nucleico de control cuantitativo en un ensayo cuantitativo tiene dos funciones: controlar la reacción y calibrar la reacción. Por lo tanto debe ser posible y válido tanto en reacciones diana positivas como en reacciones diana negativas.

También debe ser adecuado para proporcionar un valor de referencia fiable para el cálculo de altas concentraciones de ácido nucleico. Por tanto, la concentración de un ácido nucleico de control interno cuantitativo interno requiere ser relativamente alta.

65

Por lo tanto, un aspecto preferido de la divulgación es el proceso descrito anteriormente, que adicionalmente comprende la siguiente etapa:

h. determinar la cantidad de uno o más de dichos ácidos nucleico diana.

El proceso controlado de manera interna, descrito anteriormente, requiere considerablemente menos tiempo de trabajo efectivo y el ensayo es mucho más sencillo de realizar que los métodos de PCR en tiempo real usados en la técnica anterior. El proceso ofrece una ventaja importante, por ejemplo, en el campo de la virología clínica ya que permite la amplificación en paralelo de diversos virus en experimentos paralelos. El proceso es particularmente útil en el tratamiento de pacientes después de un trasplante, en los que se requiere monitorizar con frecuencia los virus. Por lo tanto dicho proceso facilita un diagnóstico rentable y contribuye a disminuir el uso de agentes antivirales y las complicaciones y hospitalizaciones causadas por virus. Esto se aplica igualmente al campo de la microbiología clínica. En general, se obtendrán rendimientos en un tiempo de respuesta más rápido y una flexibilidad de ensayo mejorada. Por consiguiente, esto conduce a una reducción en el número de ensayos requeridos en un paciente para establecer un diagnóstico, y posiblemente acortar la hospitalización (por ejemplo, si el diagnóstico puede proporcionarse mucho antes, los pacientes que requieren terapia antimicrobiana lo recibirán en seguida y por tanto se recuperarán antes). Además los pacientes muestran menos morbilidad y por lo tanto se ocasionan menos costes relacionados con la terapia complementaria (por ejemplo, cuidados intensivos relacionados con un retraso en el diagnóstico de septicemia). El ofrecer un resultado negativo en seguida puede tener importantes implicaciones para la sobre prescripción de antibióticos. Por ejemplo, si un resultado de ensayo obtenido mediante el proceso según la invención puede descartar el patógeno más rápidamente que con un método de PCR en tiempo real estándar, entonces el médico no se verá obligado a usar antibióticos empíricos. Como alternativa, si se usan antibióticos empíricos, la duración del tratamiento respectivo puede acortarse.

Con respecto al diseño de un ensayo específico basado en el proceso según la invención, el experto en la técnica se beneficiará, particularmente, pero no únicamente, de las siguientes ventajas:

- una reducción en la complejidad del programa informático (lo que conduce a reducir el riesgo de cometer errores de programación)
- enfocar los esfuerzos de desarrollo de ensayo en la optimización de la química en lugar de la química más los parámetros de control del instrumento
- un sistema mucho más fiable dado que siempre se usa un solo proceso y los componentes informáticos pueden diseñarse de manera óptima para realizar este protocolo
- ofrecer flexibilidad al experto en la técnica que realiza el proceso controlado de manera interna descrito anteriormente, para ejecutar ensayos diferentes múltiples en paralelo como parte del mismo proceso
- reducción de costes.

En el sentido de esta divulgación “purificación”, “aislamiento” o “extracción de ácidos nucleicos” se refiere a lo siguiente: Antes de que los ácidos nucleicos puedan analizarse en un ensayo de diagnóstico, por ejemplo, mediante amplificación, típicamente estos han de purificarse, aislarse o extraerse de muestras biológicas que contengan mezclas complejas de diferentes componentes. A menudo, para las primeras etapas, se usan procesos que permiten el enriquecimiento de los ácidos nucleicos. Para liberar el contenido de las células o de las partículas de virus, estas pueden tratarse con enzimas o con productos químicos para disolver, degradar o desnaturalizar las paredes celulares o las partículas de virus. Este proceso se denomina comúnmente lisis. La solución resultante que contiene dicho material resultante de la lisis, se denomina lisado. Un problema a menudo encontrado durante la lisis es que otras enzimas que degradan el componente de interés, por ejemplo, desoxirribonucleasas o ribonucleasas que degradan ácidos nucleicos, se ponen en contacto con el componente de interés durante el procedimiento de la lisis. Las enzimas degradantes también pueden estar presentes fuera de las células, o se pueden haber separado espacialmente en diferentes compartimentos celulares, antes de producirse la lisis. A medida que se produce la lisis, el componente de interés se expone a dichas enzimas degradantes. Otros componentes liberados durante este proceso pueden ser, por ejemplo, endotoxinas que pertenecen a la familia de lipopolisacáridos que son tóxicas para las células y pueden causar problemas en productos destinados a su uso en terapia humana o animal.

Hay una variedad de medios para resolver el problema anteriormente mencionado. Es común usar agentes caotrópicos tales como tiocianato de guanidinio o detergentes aniónicos, catiónicos, zwitteriónicos o no iónicos cuando se pretende liberar los ácidos nucleicos. Es también una ventaja el uso de proteasas que degradan rápidamente las enzimas descritas anteriormente o proteínas no deseadas. Sin embargo, esto puede producir otro problema, ya que dichas sustancias o enzimas pueden interferir como reactivos o componentes en etapas posteriores.

Las enzimas que pueden usarse ventajosamente en dicha lisis o procesos de preparación de muestra mencionados anteriormente son enzimas que escinden los enlaces amida en sustratos de proteína y que se clasifican como proteasas o (indistintamente) peptidasas (véase Walsh, 1979, Enzymatic Reaction Mechanisms. W. H. Freeman and

Company, San Francisco, Capítulo 3). Las proteasas usadas en la técnica anterior comprenden proteasas alcalinas (documento WO 98/04730) o proteasas ácidas (documento US 5.386.024). Una proteasa que se ha usado ampliamente para la preparación de muestras en el aislamiento de ácidos nucleicos en la técnica anterior, es la proteinasa K de *Tritirachium album* (véase, por ejemplo, Sambrook J. *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989) que es activa en torno a un pH neutro y que pertenece a una familia de proteasas, conocida por el experto en la técnica, como subtilisinas. Especialmente ventajosas para el uso en la lisis o en los procesos de preparación de muestras mencionados anteriormente, es la enzima esperasa, una fuerte proteasa que conserva su actividad tanto a altas temperaturas como a alta alcalinidad (documento EP 1 201 7539).

En las etapas de preparación de muestras, después de la etapa de lisis, se realiza un enriquecimiento en el componente de interés. Si los componentes de interés no proteicos son, por ejemplo, ácidos nucleicos, estos se extraen normalmente de las mezclas complejas de lisis antes de utilizarse en un ensayo basado en sondas

Hay varios métodos para la purificación de ácidos nucleicos:

- métodos dependientes de secuencia o bioespecíficos, como por ejemplo:

- cromatografía de afinidad
- hibridación con sondas inmovilizadas

- métodos independientes de secuencia o fisicoquímicos, como por ejemplo:

- extracción líquido-líquido, por ejemplo, con fenol-cloroformo
- precipitación, por ejemplo, con etanol puro
- extracción con papel de filtro
- extracción con agentes formadores de micelas como bromuro de cetil-trimetil-amonio
- unión a pigmentos intercalantes inmovilizados, por ejemplo, derivados de acridina
- adsorción a gel de sílice o tierras diatomeas
- adsorción a partículas de vítreo magnéticas (PVM) o a partículas de organosilano en condiciones caotrópicas.

Resulta particularmente interesante para los fines de purificación la adsorción de ácidos nucleicos a una superficie de vidrio aunque también son posibles otras superficies. En los últimos años se han propuesto muchos procedimientos para el aislamiento de ácidos nucleicos de su ambiente mediante el uso de usando su comportamiento de unión a superficies de vidrio. Si los ácidos nucleicos no modificados son la diana, se prefiere una unión directa de los ácidos nucleicos a un material con una superficie porque, entre otras razones, los ácidos nucleicos no tienen que modificarse e incluso pueden unirse a ácidos nucleicos nativos. Estos procesos se describen con detalle en diversos 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, con vidrio de plomo molido. La purificación de ADN plasmídico de bacterias en polvo de vidrio en presencia de perclorato sódico se describe en Marko M. A. *et al.*, Anal. Biochem. 121 (1982) 382-387. En el documento DE-A 37 34 442 se describe el aislamiento de ADN monocatenario de fago M13 en filtros de fibra de vidrio precipitando las partículas de fago usando ácido acético y lisis de las partículas de fago con perclorato. Los ácidos nucleicos unidos a los filtros de fibra de vidrio se lavan y después se eluyen con un tampón de Tris/EDTA que contiene metanol. Un procedimiento similar para purificar ADN de fagos lambda se describe en Jakobi R. *et al.*, Anal. Biochem. 175 (1988) 196-201. El procedimiento conlleva la unión selectiva de ácidos nucleicos a superficies de vidrio en soluciones de salinas caotrópicas y la separación de los ácidos nucleicos de contaminantes tales como agarosa, proteínas o residuos celulares. Para separar las partículas de vidrio de los contaminantes, las partículas pueden centrifugarse o los fluidos se extraen a través de filtros de fibra de vidrio. Sin embargo, esta es una etapa limitante ya que impide que el procedimiento se use para procesar grandes cantidades de muestras. El uso de partículas magnéticas para inmovilizar ácidos nucleicos después de la precipitación añadiendo sal y etanol es más ventajoso y se describe, por ejemplo, en Alerten R. P. *et al.*, S., Anal. Biochem. 201 (1992) 166-169 y en el documento PCT GB 91/00212. En este procedimiento, los ácidos nucleicos se aglutinan junto con las partículas magnéticas. El aglutinado se separa del disolvente original aplicando un campo magnético y realizando una etapa de lavado. Después de una etapa de lavado, los ácidos nucleicos se disuelven en un tampón de Tris. Sin embargo, este procedimiento tiene una desventaja, ya que la precipitación no es selectiva para los ácidos nucleicos. En cambio, una variedad de sustancias sólidas y disueltas se aglutinan también. Como resultado, este procedimiento no puede usarse para retirar cantidades significativas de cualquier inhibidor de reacciones enzimáticas específicas que puedan

estar presentes. En el comercio también se dispone del vidrio poroso magnético que contiene partículas magnéticas en una matriz de vidrio porosa, particular y que se cubre con una capa que contiene estreptavidina. Este producto puede usarse para aislar materiales biológicos, por ejemplo proteínas o ácidos nucleicos, si se modifican en una etapa de preparación compleja de manera que se unan de manera covalente con biotina. Los adsorbentes  
 5 particulares magnetizables han demostrado ser muy eficaces y adecuados para la preparación automatizada de muestras. Los pigmentos ferrimagnéticos y ferromagnéticos así como superparamagnéticos se usan para esta finalidad. En el documento WO 01/37291 se describen las partículas de vidrio magnéticas más preferidas y los métodos que las usan. Particularmente útil para el aislamiento de ácidos nucleicos en el contexto de la invención es el método de acuerdo con R. Boom *et al.* (J. Clin Microbiol., 28 (1990), 495-503).

10 La expresión “material de soporte sólido” comprende cualquiera de los materiales sólidos mencionados anteriormente en relación con la inmovilización de ácidos nucleicos, por ejemplo, partículas de vidrio magnéticas, fibras de vidrio, filtros de fibra de vidrio, papel de filtro etc., aunque el material de soporte sólido no está limitado a estos materiales.

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

20 “Inmovilizar”, en el contexto de la invención, significa capturar objetos tales como, por ejemplo, ácidos nucleicos de una manera reversible o irreversible. Particularmente, “inmovilizado en el material de soporte sólido”, significa que el objeto o los objetos se asocian con el material de soporte sólido para separarlos de cualquier medio circundante y que pueden recuperarse, por ejemplo, separando el material de soporte sólido en un punto más adelante. En este  
 25 contexto, “inmovilización” puede comprender, por ejemplo, la adsorción de ácidos nucleicos a superficies de vidrio o a otras superficies adecuadas de materiales sólidos como se ha descrito anteriormente. Además, los ácidos nucleicos pueden “inmovilizarse” específicamente uniéndose a sondas de captura, donde los ácidos nucleicos se unen a esencialmente ácidos nucleicos complementarios fijados a un soporte sólido por emparejamiento de bases. En el último caso, dicha inmovilización específica conduce a la unión predominante de ácidos nucleico diana.

30 Después de la purificación o del aislamiento de los ácidos nucleicos, incluyendo los ácidos nucleicos diana, de su ambiente natural, puede realizarse un análisis, por ejemplo, mediante la amplificación simultánea descrita anteriormente.

35 “Simultáneamente”, en el sentido de la invención, significa que dos acciones, tal como la amplificación de un primer y un segundo ácido nucleico o más, se realizan al mismo tiempo y en las mismas condiciones físicas. En una realización, la amplificación simultánea de al menos un primer y un segundo ácido nucleico diana se realiza en un recipiente. En otra realización, la amplificación simultánea se realiza con al menos un ácido nucleico en un recipiente  
 40 y al menos un segundo ácido nucleico en un segundo recipiente, al mismo tiempo y en las mismas condiciones físicas, particularmente con respecto a la temperatura y al tiempo de incubación en el que el ácido nucleico de control interno mencionado anteriormente está presente cada uno en dichos recipientes.

45 El “primer ácido nucleico diana” y el “segundo ácido nucleico diana” son ácidos nucleicos diferentes. Una “muestra líquida” es cualquier material líquido que pueda someterse a un ensayo de diagnóstico dirigido a ácidos nucleicos y procede preferentemente de una muestra biológica. También preferentemente, dicha muestra líquida procede de un ser humano y de un fluido corporal. En una realización preferida de la invención, la muestra líquida es sangre humana, orina, esputo, sudor, un frotis, heces tratadas con pipeta o líquido cefalorraquídeo. Más preferentemente, la muestra líquida es sangre humana.

50 La expresión “recipiente de reacción” comprende, pero sin limitación, tubos o pocillos de placas tales como micropocillos, pocillos profundos u otros tipos de placas multipocillo, en los que tiene lugar una reacción para el análisis de la muestra líquida, tal como, por ejemplo, transcripción inversa o reacción en cadena de la polimerasa. Los límites externos o las paredes de dichos recipientes son químicamente inertes de tal manera que no interfieren con la reacción analítica que se produce en su interior. Preferentemente, el aislamiento de los ácidos nucleicos,  
 55 como se describe anteriormente, también se realiza en una placa multipocillo.

60 En este contexto, las placas multipocillo en sistemas analíticos permiten la separación en paralelo y analizar o conservar muestras múltiples. Las placas multipocillo pueden optimizarse para una captación máxima de líquido o para una transferencia máxima de calor. Una placa multipocillo preferida para su uso en el contexto de la presente invención se optimiza para incubar o separar un analito en un analizador automático. Preferentemente, la placa multipocillo se construye y dispone para establecer contacto con un dispositivo magnético y/o con un dispositivo calefactor. Dicha placa multipocillo preferida, que en el contexto de la divulgación, se denomina indistintamente “placa de procesamiento” comprende:

65 - una superficie de cubierta que comprende recipientes múltiples con aberturas en la parte superior dispuesta en filas. Los recipientes comprenden una parte superior, una parte central y una parte inferior. La parte superior está

unida a la superficie de cubierta de la placa multipocillo y comprende dos lados más largos y dos más cortos. La parte central tiene una sección transversal sustancialmente rectangular con dos lados más largos y dos lados más cortos;

- dos paredes laterales opuestas más cortas y dos paredes laterales opuestas más largas y
- una base, en la que dicha base comprende una abertura construida y dispuesta para colocar la placa multipocillo en contacto con dicho dispositivo magnético y/o dispositivo calefactor.

En una realización preferida de la placa multipocillo, recipientes adyacentes dentro de una fila se unen en el lado más largo de dicha forma casi rectangular.

Preferentemente, la placa multipocillo comprende un espacio continuo que se localiza entre filas de recipientes adyacentes. Dicho espacio continuo se construye y dispone para alojar un dispositivo magnético con forma de placa. En una realización preferida, la parte inferior de los recipientes comprende una parte inferior esférica. En una realización más preferida, la parte inferior de dichos recipientes comprende una parte cónica localizada entre dicha parte central y dicha parte inferior esférica.

En una realización preferida, la superficie de cubierta comprende costillas, rodeando dichas costillas las aberturas de los recipientes. Preferentemente, un lado más corto de dicha parte superior de los recipientes comprende un receso, comprendiendo dicho receso una superficie flexionada que se extiende desde la costilla hasta el interior del recipiente.

Adicionalmente, en una realización preferida, los recipientes comprenden una forma interna redondeada.

Para la fijación a las estaciones de procesamiento o de incubación, la base comprende preferentemente un borde que comprende recesos. Para fijar la placa en una estación, pueden acoplarse clips de cierre en una estación de un analizador con dichos recesos.

En una realización preferida, los recipientes comprenden un grosor de pared esencialmente constante.

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

La superficie de apoyo de la placa (101) de procesamiento comprende preferentemente una longitud y una anchura de la base correspondiente a un formato de superficie de apoyo ANSI SBS. Más preferentemente, la longitud es de 127,76 mm +/- 0,25 mm y la anchura es de 85,48 mm +/- 0,25 mm. Por tanto, la placa (101) tiene dos paredes laterales opuestas más cortas (109) y dos paredes laterales opuestas más largas (118). La placa (101) de procesamiento comprende elementos de bloqueo de forma (106) para interactuar con un manipulador (500, Fig. 12). La placa (101) de procesamiento puede sujetarse, transportarse y colocarse de manera rápida y segura a alta velocidad manteniendo al mismo tiempo la orientación y posición correctas. Preferentemente, los elementos de bloqueo de forma (106) para sujetar se localizan dentro de la parte central superior, preferentemente en el tercio central superior de la placa (101) de procesamiento. Esto tiene la ventaja de que una posible distorsión de la placa (101) de procesamiento tenga únicamente un efecto minoritario sobre los elementos de bloqueo de forma (106) y que la manipulación de la placa (101) sea más consistente.

La placa (101) de procesamiento comprende preferentemente identificadores hardware (102) y (115). Los identificadores hardware (102) y (115) son únicos para la placa (101) de procesamiento y diferentes de los identificadores hardware de otros consumibles usados en el mismo sistema. Los identificadores hardware (102, 115) comprenden preferentemente bordes (119) y/o recesos (125) en las paredes laterales de los consumibles, donde dicho patrón de bordes (119) y/o recesos (125) es único para un tipo de consumible específico, preferentemente la placa (101) de procesamiento. Este patrón único también se denomina en el presente documento "geometría de superficie" única. Los identificadores hardware (102, 115) garantizan que el usuario sólo pueda cargar la placa (101) de procesamiento en la posición de apilamiento apropiada de un instrumento analítico en la orientación adecuada. En los lados de la placa (101) de procesamiento, se incluyen elementos de guía (116) y (117) (Fig. 3, Fig. 4). Estos impiden la inclinación de la placa (101) de procesamiento. Los elementos de guía (116, 117) permiten al usuario cargar las placas (101) de procesamiento con elementos de guía (116, 117) como una pila en un instrumento analítico que después se transfiere verticalmente dentro del instrumento en un apilamiento sin inclinación de las placas.

La parte central (120) de los recipientes (103) tiene una sección transversal casi rectangular (Fig. 6, Fig. 7). Está separada a lo largo del lado más largo (118) de la forma casi rectangular mediante una pared (113) común (Fig. 3). La fila de recipientes (103) formada de esta manera tiene la ventaja de que, a pesar del espacio limitado disponible,

tiene un volumen grande, preferentemente de 4 ml. Otra ventaja es que debido al grosor de la pared esencialmente constante, la producción es muy económica. Una ventaja adicional es que los recipientes (103) se afianzan entre sí y, por tanto, puede obtenerse una alta estabilidad de la forma.

5 Entre las filas de los recipientes (103), se localiza un espacio (121) continuo (Fig. 6, Fig. 7). El espacio (121) puede alojar imanes (202, 203) o dispositivos calefactores (128) (Fig. 11). Estos imanes (202, 203) y dispositivos calefactores (128) son preferentemente dispositivos sólidos. Por tanto, las partículas magnéticas (216) incluidas en los líquidos (215) que pueden estar contenidas en los recipientes (103) pueden separarse del líquido (215) ejerciendo un campo magnético en los recipientes (103) cuando los imanes (202, 203) se ponen muy cerca los recipientes (103). O bien, el contenido de los recipientes (103) puede incubarse a una temperatura elevada, controlada cuando la placa (101) de procesamiento se coloca en el dispositivo calefactor (128). Dado que los imanes (202, 203) o los dispositivos calefactores (128) pueden ser sólidos, puede obtenerse una alta densidad de energía. La forma casi rectangular de la parte central (120) de los recipientes (103) (Fig. 10) también optimiza el contacto entre la pared del recipiente (109) y un imán (202) o dispositivo calefactor (128) con forma plana optimizando la superficie de contacto entre el recipiente (103) y el imán (202) o dispositivo calefactor (128) y por tanto potenciando la transferencia de energía en el recipiente (103).

En la zona de la parte inferior cónica (111) de los recipientes, el espacio (121) es aún más pronunciado y puede alojar imanes (203) adicionales. La combinación de imanes (202) grandes en la zona superior y de imanes más pequeños (203) en la zona cónica de los recipientes permite la separación de partículas magnéticas (216) en volúmenes más grandes o más pequeños de líquido (215). Los imanes pequeños (203), por tanto, facilitan que se secuestren las partículas magnéticas (216) durante la transferencia del eluato con la pipeta. Esto posibilita transferir con pipeta el eluato con una pérdida mínima reduciendo el volumen muerto del sedimento de las partículas magnéticas (216). Adicionalmente, la presencia de partículas magnéticas (216) en el eluato transferido se minimiza.

En el extremo superior de los recipientes (103), una de las paredes laterales más cortas (109) del recipiente (103) comprende un canal de entrada de reactivo (105) que se extiende a la costilla (104) circunferencial (Figs. 3, 4, 7). Los reactivos se transfieren con pipeta sobre el canal de entrada de reactivo (105) y drenan el canal (105) en el recipiente (103). De este modo se impide el contacto entre la aguja o la punta (3, 4) de la pipeta y el líquido contenido en el recipiente. Adicionalmente, se impiden las salpicaduras resultantes del líquido que se dispensa directamente en otro líquido (215) contenido en los recipientes (103), lo que puede causar contaminación de la aguja o punta (3, 4) de la pipeta, o de vasos adyacentes (103). La transferencia secuencial con pipeta sobre el canal de entrada de reactivo (105) de pequeños volúmenes de reactivos seguido de un mayor volumen de otro reactivo garantiza que los reactivos que solo se añaden en pequeñas cantidades se drenen completamente en el recipiente (103). Por tanto, es posible efectuar una transferencia con pipeta de pequeños volúmenes de reactivos sin pérdida de precisión del ensayo a realizar.

En el interior, en la parte inferior de los recipientes (111, 112), la forma se hace cónica (111) y acaba con una parte inferior esférica (112) (Fig. 6, Fig. 7). La forma interior del recipiente (114), que incluye la parte central rectangular (120), es redondeada. La combinación de la parte inferior esférica (112), la forma interior redondeada (114), la parte cónica (111) y superficie acrisolada de los recipientes (103) conduce a una fluídica favorable que facilita una separación y purificación eficaces de analitos en la placa (101) de procesamiento. La parte inferior esférica (112) permite un uso esencialmente completo del eluato separado y una reducción del volumen muerto que reduce el traspaso de reactivos o la contaminación cruzada de las muestras.

El borde en la base (129) de la placa (101) de procesamiento comprende recesos (107) que se acoplan con clips de cierre (124) en la estación de procesamiento (201) o dispositivo calefactor (128) o instrumento analítico (126) (Fig. 5, Fig. 9). El acoplamiento de los clips de cierre (124) con los recesos (107) permite colocar y fijar la placa (101) de procesamiento en la estación de procesamiento (201). La presencia de los recesos (107) permite que la fuerza de cierre actúe sobre la placa (101) de procesamiento casi verticalmente a la base (129). Por tanto, solo pueden producirse pequeñas fuerzas que actúan lateralmente. Esto reduce la aparición de tensión, y, por tanto, la deformación de la placa (101) de procesamiento. Las fuerzas de cierre verticales también pueden neutralizar cualquier deformación de la placa (101) de procesamiento lo que conduce a una colocación más precisa de las partes inferiores esféricas (111) dentro de la estación de procesamiento (201). En general, la interfaz exacta entre la placa (101) de procesamiento y la estación de procesamiento (201) o dispositivo calefactor (128) dentro de un analizador reduce los volúmenes muertos y también reduce el riesgo de contaminación cruzada de las muestras.

Una "estación de separación" es un dispositivo o un componente de un sistema analítico que permite el aislamiento del material de soporte sólido desde el otro material presente en la muestra líquida. Dicha estación de separación puede comprender, por ejemplo, pero sin limitación, una centrifuga, una rejilla con tubos de filtro, un imán, u otros componentes adecuados. En una realización preferida de la invención, la estación de separación comprende uno o más imanes. Preferentemente, como soporte sólido, se usan uno o más imanes para la separación de partículas magnéticas, preferentemente partículas de vidrio magnéticas. Si, por ejemplo, la muestra líquida y el material de soporte sólido se combinan conjuntamente en los pocillos de una placa multipocillo, entonces uno o más imanes incluidos en la estación de separación pueden, por ejemplo, ponerse en contacto con la propia muestra líquida introduciendo los imanes en los pocillos, o dicho uno o más imanes pueden acercarse a las paredes más externas

de los pocillos para atraer a las partículas magnéticas y posteriormente separarlas del líquido circundante.

En una realización preferida, la estación de separación es un dispositivo que comprende una placa multipocillo que comprende recipientes con una abertura en la superficie de cubierta de la placa multipocillo y una parte inferior cerrada. Los pocillos comprenden una parte superior, una parte central y una parte inferior, en la que la parte superior está unida a la superficie e cubierta de la placa multipocillo y preferentemente comprende dos lados más largos y dos más cortos. La parte central tiene una sección transversal sustancialmente rectangular con dos lados largos en la que dichos recipientes se alinean en filas. Un espacio continuo se localiza entre dos filas adyacentes para establecer contacto selectivamente de al menos un imán instalado en una fijación con las paredes laterales en al menos dos posiciones en Z. Adicionalmente el dispositivo comprende una estación de separación magnética que comprende al menos una fijación. La fijación comprende al menos un imán que genera un campo magnético. Existe un mecanismo de movimiento que mueve verticalmente dicha al menos una fijación que comprende al menos un imán al menos entre la primera y segunda posición con respecto a los recipientes de la placa multipocillo. Preferentemente, dichas al menos dos posiciones en Z de los recipientes comprenden las paredes laterales y la parte inferior de dichos recipientes. El campo magnético de dicho al menos un imán atrae preferentemente a las partículas magnéticas a una superficie interna del recipiente adyacente a dicho al menos un imán cuando dicho al menos un imán está en dicha primera posición. El efecto de dicho campo magnético es menor cuando dicho al menos un imán está en dicha segunda posición en comparación con cuando dicho al menos un imán está en dicha primera posición. Preferentemente, la fijación que comprende dicho al menos un imán comprende un bastidor. Los recipientes tienen características preferidas como se describe anteriormente en el contexto de una placa multipocillo/placa de procesamiento. Una característica preferida de este tipo es que al menos una parte de dichos recipientes tiene una sección transversal sustancialmente rectangular ortogonal al eje de dichos recipientes.

En dicha primera posición, dicho al menos un imán está adyacente a dicha parte de dichos recipientes. Adyacente se entiende que significa bien en estrecha proximidad, de tal manera que se ejerce un campo magnético en el contenido del recipiente, o bien en contacto físico con el recipiente.

La estación de separación comprende un bastidor para recibir la placa multipocillo, y clips de cierre para unir la placa multipocillo. Preferentemente, la estación de separación comprende dos tipos de imanes. Esta realización preferida se describe adicionalmente más adelante.

A continuación se describe una segunda realización preferida, que comprende un resorte que ejerce una presión en el bastidor que comprende los imanes de tal manera que los imanes se presionan contra los recipientes de la placa multipocillo.

Los primeros imanes están preferentemente contruidos y dispuestos para interactuar con recipientes de una placa multipocillo para ejercer un campo magnético en un gran volumen de líquido que comprende partículas magnéticas contenidas en dichos recipientes. Dichos segundos imanes preferentemente se construyen y disponen para interactuar con recipientes de una placa multipocillo para ejercer un campo magnético en un pequeño volumen de líquido que comprende partículas magnéticas contenidas en dichos recipientes. Dichos primer y segundo imanes pueden moverse a diferentes posiciones en Z.

Es útil en el contexto de la presente divulgación y en dicha estación de separación un método adicional de aislamiento y purificación de un ácido nucleico. El método comprende las etapas de unir un ácido nucleico con partículas magnéticas en un recipiente de una placa multipocillo. El recipiente comprende una abertura superior, una parte central y una parte inferior. El material unido se separa después del material no unido contenido en un líquido cuando la mayor parte del líquido se encuentra por encima de la sección donde la parte cónica del recipiente se reemplaza por la parte central con la forma rectangular, moviendo un imán desde una segunda posición a una primera posición y, en dicha primera posición, aplicando un campo magnético a la parte central y, opcionalmente, aplicando también un campo magnético en la parte inferior de dicho recipiente. Las partículas magnéticas pueden lavarse opcionalmente con una solución de lavado. Un volumen de líquido pequeño, en el que la mayor parte del líquido se encuentra por debajo de la sección donde la parte cónica de los recipientes se reemplaza por la parte central con la forma rectangular se separa de dichas partículas magnéticas aplicando selectivamente un campo magnético a la parte inferior de dicho recipiente.

También es útil en el contexto de la presente invención una estación de separación magnética para separar un ácido nucleico unido a partículas magnéticas, comprendiendo dicha estación de separación primeros imanes que se construyen y disponen para interactuar con recipientes de una placa multipocillo para ejercer un campo magnético en un volumen grande de líquido que comprende partículas magnéticas contenidas en dichos recipientes, y segundos imanes contruidos y dispuestos para interactuar con recipientes de una placa multipocillo para ejercer un campo magnético en un volumen pequeño de líquido que comprende partículas magnéticas contenidas en dichos recipientes, y en el que dicho primer y segundo imanes pueden moverse a diferentes posiciones en Z. En el presente documento se describen realizaciones preferidas de la estación de separación magnética.

A continuación se describe una primera realización preferida de una estación de separación (201) útil para la presente invención. La primera realización preferida de dicha estación de separación (201) comprende al menos dos tipos de imanes (202, 203). El primer tipo de imán (202) alargado se construye y dispone para ajustarse en el interior del espacio (121) de la placa (101) de procesamiento. De este modo, el imán (202) ejerce un campo magnético en 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) y de cualquier material unido a las mismas y al líquido (215) dentro del recipiente (103) cuando está presente un volumen grande de un líquido (215). El imán (202) tiene una estructura alargada y está construido y dispuesto para interactuar con la parte central (120) esencialmente rectangular del recipiente. Por tanto, el imán (202) se usa cuando la mayor parte del líquido (215) se encuentra por encima de la sección en la que la parte cónica (111) del recipiente (103) se reemplaza por la parte central (120) con la forma rectangular. Como se muestra en la Fig. 40, la construcción preferida de los imanes (202) comprende fijaciones (204, 204a) que comprenden imanes (202) que se ajustan en el interior del espacio (121) entre las filas de los recipientes (103) y la placa (101) de procesamiento. Otra realización preferida de imanes (202) comprende imanes (202) dispuestos en fijaciones (204, 204a). Los imanes (203) de la estación de separación (201) preferida son más pequeños, y pueden interactuar con la parte cónica (111) del recipiente (103). Esto se muestra en la Fig. 10. Los imanes (203) se disponen preferentemente en una base (205) que puede moverse en el espacio (121) de la placa (101) de procesamiento. Cada imán (202, 203) se construye preferentemente para interactuar con los dos recipientes (103) en dos filas adyacentes. En una realización preferida, la placa (101) de procesamiento tiene 6 filas de 8 recipientes (103). Una estación de separación (201) que puede interactuar con la placa (101) de procesamiento preferida tiene tres fijaciones (204, 204a) que comprenden imanes (202) y cuatro bases (205) que comprenden imanes (203). También se incluye una realización en la que la estación de separación tiene cuatro fijaciones (204, 204a) magnéticas que comprenden imanes (202) y tres bases (205) magnéticas que comprenden imanes (203).

Los imanes (202, 203) pueden moverse. La estación de separación (201) comprende un mecanismo para mover las fijaciones (204, 204a) y las bases (205). Todas las fijaciones (204, 204a) están interconectadas por una base (217) y por tanto se mueven de manera coordinada. Todos los imanes (203) se unen a una base (218) y por tanto se mueven de manera coordinada. El mecanismo para mover las placas magnéticas (202) y (203) se construye y dispone para mover los dos tipos de placas magnéticas (202, 203) hasta un total de cuatro posiciones finales:

En la Fig. 40 a-c, los imanes (203) se localizan cerca de la parte cónica de los recipientes (103) de la placa (101) de procesamiento. Esta es la parte más superior de los imanes (203), y es la posición de separación. En esta Figura, los imanes (202) se localizan en la posición más inferior. Cuando están en esta posición estos imanes no intervienen en la separación.

En la realización preferida mostrada en la Fig. 10, la base (217) de los imanes (202) establece contacto con una rueda de posicionamiento (206). La base (217) comprende un extremo inferior (207) que establece contacto de manera flexible con un elemento de conexión (208) mediante un elemento de movimiento (209). Dicho elemento de movimiento se construye y dispone para mover el elemento de conexión (208) a lo largo de un rail (212) de un lado al otro. Dicho elemento de movimiento (209) se fija al elemento de conexión (208) con un pasador (220). Dicho elemento de conexión (208) se fija a la rueda de posicionamiento (206) por tornillo (210). El elemento de conexión (208) también está conectado al eje (211). Dicho elemento de conexión (208) es preferentemente una placa rectangular. A medida que una rueda de posicionamiento (206) se mueve excéntricamente, alrededor de un eje (211), de tal manera que el tornillo (210) se mueve desde un punto por encima del eje excéntrico a un punto por debajo del eje excéntrico, el elemento de movimiento (209) y el extremo inferior (207) de la base (204) con los imanes (202) unidos a los mismos se mueven desde la posición más superior a la posición más inferior. La base (218) se instala en una parte inferior (219) y se conecta, en su extremo más inferior, con el pasador (213) a un elemento de movimiento (214), que es preferentemente una rueda, que interactúa con la rueda de posicionamiento (206). Cuando la rueda de posicionamiento (206) gira alrededor del eje (211), la rueda (214) se mueve a lo largo de la rueda de posicionamiento (206). Si la rueda (214) se localiza en una sección de la rueda de posicionamiento (206) donde la distancia desde el eje (211) es corta, los imanes (203) están en su posición más inferior. Cuando la rueda (214) se localiza en una sección de la rueda de posicionamiento (206) donde la distancia desde el eje (211) está hasta un máximo, los imanes (203) están en su posición más superior. Por tanto, en la realización preferida de la primera realización de la estación de separación, la localización de los imanes (203) está controlada por la forma de la rueda de posicionamiento (206). Cuando el elemento de movimiento (209) se mueve a lo largo de la parte central, redonda superior o inferior (212a) del rail (212), el tipo de imanes pequeño (203) se mueve hacia arriba y hacia abajo. Cuando el elemento de movimiento (209) se localiza en el lado (212b) del extremo inferior (207) y se mueve hacia arriba o hacia abajo, los imanes (202) se mueven hacia arriba o hacia abajo. La rueda de posicionamiento puede girar mediante cualquier motor (224).

En una realización preferida, un resorte (225) se une a la base (222) de la estación de separación y a la base (218) de imanes (203) para garantizar que los imanes (203) se mueven hacia el interior de la posición más inferior cuando se mueven hacia abajo.

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

En una segunda realización preferida, la estación de separación (230) comprende al menos una fijación (231) que comprende al menos un imán (232), preferentemente un número de imanes igual a un número de recipientes (103) en una fila (123). Preferentemente la estación de separación (230) comprende un número de fijaciones (231) igual al

número de hileras (123) de la placa (101) multipocillo descrita anteriormente en el presente documento. Más preferentemente, en la estación de separación (230) se instalan seis fijaciones (231). Al menos un imán (232) se instala en una fijación (231). Preferentemente, el número de imanes (232) es igual al número de recipientes (103) en una fila (123). Más preferentemente, se instalan ocho imanes (232) en una fijación (231). Preferentemente un tipo de imán (232) está comprendido en dicha fijación (231). Más preferentemente, el imán (232) está instalado en un lado orientado hacia los recipientes con los que interacciona el imán.

La fijación (231) está instalada en una base (233). Preferentemente, dicha instalación es flexible. La base (233) comprende resortes (234) instalados en su interior. El número de resortes (234) es al menos un resorte por fijación (231) instalado en dicha base (233). Adicionalmente la base comprende un bisel (236) que limita el movimiento del resorte y, por consiguiente, la fijación (231) comprende los imanes (232). Preferentemente, uno cualquiera de dichos resortes (234) se construye y dispone para interaccionar con una fijación (231). Más preferentemente, dicho resorte (234) es un resorte de Yugo. Dicha interacción controla el movimiento horizontal de las fijaciones (231). Adicionalmente, la estación de separación (230) comprende un bastidor (235). La base (233) con fijaciones (231) se conecta al bastidor (235) moviendo un mecanismo como se describe anteriormente en el presente documento para los imanes (232) de la primera realización.

Preferentemente, dicha base (233) y fijación (231) se construye y dispone para moverse verticalmente (en dirección Z).

La placa (101) multipocillo descrita en el presente documento anteriormente se inserta en la estación de separación (230). La fijación (231) que comprende los imanes (232) se mueve verticalmente. Cualquier otra fijación (232) se mueve, por tanto, en un espacio (121) entre dos filas (123) de recipientes (103). El movimiento vertical hace que los imanes (232) instalados en una fijación (231) establezcan contacto con los recipientes (103). La posición en Z se selecciona dependiendo del volumen de líquido (215) dentro de los recipientes (103). Para volúmenes grandes, los imanes (232) se ponen en contacto con los recipientes (103) en una posición central (120) en la que los recipientes (103) son de una forma casi rectangular. Para volúmenes pequeños de líquido (215) en los que la mayor parte del líquido (215) se encuentra por debajo de la parte central (120) de los recipientes (103), los imanes (232) se ponen preferentemente en contacto con la parte cónica (111) de los recipientes (103).

Un resorte se une a la base (233) de cualquier bastidor (231) (Fig. 9a, b)). El resorte presiona los imanes (232) contra los recipientes (103). Esto garantiza un contacto entre los imanes (232) y los recipientes (103) durante la separación magnética. Preferentemente, el imán (232) establece contacto con el recipiente (103) en la pared lateral (109) localizada por debajo de la entrada (105). Esto tiene la ventaja de que el líquido que se añade transfiriendo con pipeta fluye sobre las partículas magnéticas secuestradas y garantiza que las partículas se resuspendan y que todas las muestras en todos los recipientes se traten de manera idéntica.

Esta realización es particularmente adecuada para separar un líquido (215), comprendido en una placa (101) multipocillo como se ha descrito anteriormente en el presente documento, de partículas magnéticas (216) cuando diferentes niveles de líquido (215) están contenidos en los recipientes (103) de dicha placa (101) multipocillo.

Un "tampón de lavado" es un líquido que se diseña para eliminar componentes no deseados, especialmente en un procedimiento de purificación. Dichos tampones son muy conocidos en la técnica. En el contexto de purificación de ácidos nucleicos, el tampón de lavado se ajusta para lavar el material de soporte sólido para separar el ácido nucleico inmovilizado de cualquier componente no deseado. El tampón de lavado puede, por ejemplo, contener etanol y/o agentes caotrópicos en una disolución tamponada o soluciones con un pH ácido sin etanol y/o agentes caotrópicos como se ha descrito anteriormente. A menudo la solución de lavado u otras soluciones se proporcionan como soluciones de reserva que tienen que diluirse antes de su uso.

En el proceso de acuerdo con la invención, el lavado requiere un contacto más o menos exhaustivo del material de soporte sólido y de los ácidos nucleicos inmovilizados en su interior con el tampón de lavado.

Para realizar esto, son posibles diferentes métodos, por ejemplo, agitar el tampón de lavado con el material de soporte sólido en, o junto con, el recipiente o recipientes respectivos. Otro método ventajoso es aspirar y dispensar la suspensión que comprende el tampón de lavado y el material de soporte sólido una o más veces. Este método se realiza preferentemente usando una pipeta, en la que dicha pipeta comprende preferentemente una punta de pipeta desechable en la que dicha suspensión se aspira y desde la cual se dispensa de nuevo. Dicha punta de pipeta puede usarse varias veces antes de desecharse y reemplazarse. Las puntas de pipeta desechables útiles para la invención tienen preferentemente un volumen de al menos 10 µl, más preferentemente de al menos 15 µl, más preferentemente al menos de 100 µl, más preferentemente al menos de 500 µl, más preferentemente al menos de 1 ml, incluso más preferentemente de aproximadamente 1 ml. Las pipetas que se usan en el contexto de la invención también pueden ser agujas para pipeta.

Por tanto, un aspecto preferido de la divulgación es el proceso descrito anteriormente, en el que dicho lavado en la etapa d. comprende aspirar y dispensar el tampón de lavado que comprende el material de soporte sólido.

Para el procesamiento aguas abajo de los ácidos nucleicos aislados, puede ser ventajoso separarlos del material de soporte sólido antes de someterlos a amplificación.

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

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

La elución se realiza preferentemente a temperaturas elevadas, de tal manera que una realización preferida de la invención es el proceso descrito anteriormente, en el que la etapa d. se realiza a una temperatura entre 70 °C y 90 °C, más preferentemente a una temperatura de 80 °C.

"Reactivos de amplificación", en el contexto de la divulgación, son componentes químicos o bioquímicos que permiten la amplificación de ácidos nucleicos. Dichos reactivos comprenden, pero sin limitación, polimerasas de ácido nucleico, tampones, mononucleótidos tales como nucleósido trifosfatos, oligonucleótidos por ejemplo cebadores oligonucleotídicos, sales y sus respectivas soluciones, sondas de detección, colorantes y otros.

Como se sabe en la técnica, un "nucleósido" es una combinación de base y azúcar. La parte base del nucleósido es normalmente una base heterocíclica. Las dos bases más comunes de dichas bases heterocíclicas son las purinas y las pirimidinas

Los "nucleótidos" son nucleósidos que adicionalmente incluyen un grupo fosfato unido por enlace covalente a la parte de azúcar del nucleósido. Para los nucleósidos que incluyen un azúcar pentofuranosilo, el grupo fosfato puede estar unido a cualquiera de los radicales 2', 3' o 5'-hidroxilo del azúcar. Un nucleótido es la unidad monomérica de un "oligonucleótido", que puede denominarse más generalmente como un "compuesto oligomérico", o un "polinucleótido", denominarse más generalmente como un "compuesto polimérico". Otra expresión general para lo anteriormente mencionado es ácido desoxirribonucleico (ADN) y ácido ribonucleico (ARN).

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

Los "oligonucleótidos" y "oligonucleótidos modificados" (o "análogos de oligonucleótidos") son subgrupos de compuestos oligoméricos. En el contexto de la presente invención, el término "oligonucleótido" se refiere a componentes formados a partir de una pluralidad de nucleótidos como sus unidades monoméricas. Los grupos fosfato comúnmente hacen referencia a la formación de la estructura internucleosídica del oligonucleótido. El enlace o cadena principal del ARN y ADN es un enlace fosfodiéster 3' a 5'. Los oligonucleótidos y oligonucleótidos modificados (véase más adelante) útiles para la invención pueden sintetizarse como se describe principalmente en la técnica y como sabe el experto en el campo. En la técnica se conocen métodos para la preparación de compuestos oligoméricos de secuencias específicas, e incluyen, por ejemplo, clonación y restricción de secuencias apropiadas y síntesis química directa. Los métodos de síntesis química pueden incluir, por ejemplo, el método de fosfotriéster descrito por Narang S. A. *et al.*, *Methods in Enzymology* 68 (1979) 90-98, el método de fosfodiéster desvelado por Brown E. L., *et al.*, *Methods in Enzymology* 68 (1979) 109-151, el método de la fosforamida desvelado en Beaucage *et al.*, *Tetrahedron Letters* 22 (1981) 1859, el método del H-fosfonato desvelado en Garegg *et al.*, *Chem. Scr.* 25 (1985) 280-282 y el método de soporte sólido desvelado en el documento US 4.458.066.

En el proceso descrito anteriormente, los oligonucleótidos pueden modificarse químicamente, es decir, el cebador y/o la sonda pueden comprender un nucleótido o un compuesto que no es un nucleótido, modificado. La sonda o el cebador es entonces un oligonucleótido modificado.

Los "nucleótidos modificados" (o "análogos de nucleótidos") se diferencian de un nucleótido natural por alguna modificación, pero siguen estando constituidos por una base, un azúcar pentofuranosilo, una parte fosfato, una parte de tipo base, de tipo azúcar pentofuranosilo y de tipo fosfato o combinaciones de los mismos. Por ejemplo, un marcador puede unirse a la parte base de un nucleótido mediante lo cual se obtiene un nucleótido modificado. También puede reemplazarse una base natural en un nucleótido, por ejemplo, mediante una 7-deazapurina mediante lo que también se obtiene un nucleótido modificado.

Un "oligonucleótido modificado" (o "análogo de oligonucleótido"), que pertenece a otro subgrupo específico de compuestos oligoméricos, posee uno o más nucleótidos y uno o más nucleótidos modificados como unidades monoméricas. Por tanto, el término "oligonucleótido modificado" (o "análogo de oligonucleótido") se refiere a estructuras que funcionan de una manera sustancialmente similar a la de los oligonucleótidos y puede usarse

indistintamente en el contexto de la presente invención. Desde un punto de vista sintético, un oligonucleótido modificado (o un análogo de oligonucleótido) puede prepararse, por ejemplo, por modificación química de oligonucleótidos mediante una modificación apropiada del esqueleto fosfato, unidad de ribosa o las bases de nucleótidos (Uhlmann y Peyman, Chemical Reviews 90 (1990) 543; Verma S., y Eckstein F., Annu. Rev. Biochem. 67 (1998) 99-134). Las modificaciones representativas incluyen enlaces fosforotioato, fosforoditioato, metil fosfonato, fosfotriéster, fosforamidato internucleosídicos en lugar de enlaces fosfodiéster internucleosídicos; deaza- o azapurinas y pirimidinas en lugar de bases de purina y pirimidina naturales, bases de pirimidina que tienen grupos sustituyentes en la posición 5 o 6; bases de purina que tienen grupos sustituyentes alterados en las posiciones 2, 6 u 8 o en la posición 7 como 7-deazapurinas; bases que llevan radicales de alquilo-, alqueno-, alquino o arilo, por ejemplo, grupos alquilo inferior tales como grupos metilo, etilo, propilo, butilo, *terc*-butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo o arilo como fenilo, bencilo, naftilo; azúcares que tienen grupos sustituyentes, por ejemplo, en su posición 2'; o análogos de azúcar carbocíclico o acíclico. Los expertos en la técnica conocen otras modificaciones en consonancia con el espíritu de la invención. Dichos oligonucleótidos modificados (o análogos de oligonucleótidos) se describen mejor como siendo funcionalmente intercambiables con, incluso estructuralmente diferentes de, oligonucleótidos naturales. Con más detalle, se desvelan ejemplos de modificaciones en Verma S., y Eckstein F., Annu. Rev. Biochem. 67 (1998) 99-134 o en el documento WO 02/12263. Además, pueden hacerse modificaciones en las que las unidades de nucleósido se unen mediante grupos que sustituyen los enlaces fosfato internucleosídicos o azúcar fosfato. Dichos enlaces incluyen los desvelados en Verma S., y Eckstein F., Annu. Rev. Biochem. 67 (1998) 99-134. Cuando para unir las unidades nucleosídicas se utilizan enlaces que no son fosfato, dichas estructuras también se han descrito como "oligonucleósidos".

Como sabe el experto en la técnica, un "ácido nucleico", así como el "ácido nucleico diana", es un compuesto polimérico de nucleótidos. En el presente documento, la expresión "ácido nucleico diana" se usa para indicar un ácido nucleico en una muestra que debe analizarse, es decir, cuya presencia o no presencia y/o cantidad debe determinarse en una muestra.

En el presente documento el término "cebador" se usa en la manera que conoce el experto en la técnica y se refiere a compuestos oligoméricos, principalmente a oligonucleótidos, pero también a oligonucleótidos modificados que pueden cebar la síntesis de ADN mediante una ADN polimerasa dependiente de molde, es decir, el extremo 3', por ejemplo, del cebador, proporciona un grupo 3'-OH libre al que pueden unirse otros nucleótidos mediante una ADN polimerasa dependiente de molde estableciendo un enlace fosfodiéster 3'- a 5'-fosfodiéster mediante lo cual se usan desoxinucleósido trifosfatos y por lo cual se libera pirofosfato.

Una "sonda" también indica un oligonucleótido natural o modificado. Como se sabe en la técnica, el objetivo de una sonda es detectar un analito o amplificar. En el caso del proceso descrito anteriormente, las sondas pueden usarse para detectar los amplificadores de los ácidos nucleico diana. Para esta finalidad, las sondas llevan típicamente marcadores.

Los "marcadores", que a menudo reciben el nombre de "grupos indicadores", son generalmente grupos que hacen que un ácido nucleico, en particular oligonucleótidos u oligonucleótidos modificados, así como cualquier ácido nucleico unido a ellos, sea diferenciable del resto de la muestra (los ácidos nucleicos que tienen unidos un marcador también pueden denominarse ácidos nucleicos marcados de unión a compuestos, sondas marcadas o solo sondas). Los marcadores preferidos de acuerdo con la invención son marcadores fluorescentes, que son, por ejemplo, colorantes fluorescentes tales como un colorante de fluoresceína, un colorante de rodamina, un colorante de cianina y un colorante de coumarina. Los colorantes fluorescentes preferidos de acuerdo con la invención son FAM, HEX, JA270, CAL635, Coumarin343, Quasar705, Cyan500, CY5.5, LC-Red 640, LC-Red 705.

En el contexto de la divulgación, cualquier cebador y/o sonda puede modificarse químicamente, es decir, el cebador y/o la sonda puede comprender un nucleótido o un compuesto que no es un nucleótido, modificado. La sonda o el cebador es entonces un oligonucleótido modificado.

Un método preferido de amplificación de ácido nucleico es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) que se desvela, entre otras referencias, en las Patentes de Estados Unidos n.º 4.683.202, 4.683.195, 4.800.159 y 4.965.188. Típicamente, la PCR emplea dos o más cebadores oligonucleotídicos que se unen a un molde de ácido nucleico seleccionado (por ejemplo, ADN o ARN). Los cebadores útiles para el análisis de ácido nucleico incluyen oligonucleótidos capaces de actuar como un punto de inicio de la síntesis de ácido nucleico dentro de las secuencias de ácido nucleico de los ácidos nucleico diana. Un cebador puede purificarse a partir de una digestión con enzimas de restricción mediante métodos convencionales, o puede producirse sintéticamente. Preferentemente el cebador es monocatenario para tener una eficiencia máxima en la amplificación, pero también puede ser bicatenario. Los cebadores bicatenarios se desnaturalizan primero, es decir, se tratan para separar las cadenas. Un método de desnaturalización de ácidos nucleicos bicatenarios es por calentamiento. Una "polimerasa termoestable" es una enzima polimerasa que es termoestable, es decir, es una enzima que cataliza la formación de productos de extensión por cebador complementarios a un molde y no se desnaturaliza irreversiblemente cuando se somete a temperaturas elevadas durante el tiempo necesario para efectuar la desnaturalización de los ácidos nucleico molde bicatenarios. Generalmente, la síntesis se inicia en el extremo 3' de cada cebador y continúa en la dirección 5' a 3' a lo largo de la cadena molde. Las polimerasas termoestables se han aislado, por ejemplo, de *Thermus flavus*, *T.*

*ruber*, *T. thermophilus*, *T. aquaticus*, *T. lacteus*, *T. rubens*, *Bacillus stearothermophilus* y *Methanothermus fervidus*. Sin embargo, en los ensayos de PCR también pueden emplearse polimerasas que no sean termoestables siempre que se reponga la enzima.

5 Si el ácido nucleico molde es bicatenario, es necesario separar las dos cadenas antes de que se use como un molde en la PCR. La separación de las cadenas puede realizarse mediante cualquier método de desnaturalización adecuado, incluyendo medios físicos, químicos o enzimáticos. Un método de separación de las cadenas de ácido nucleico implica el calentamiento del ácido nucleico hasta que esté predominantemente desnaturalizado (por ejemplo, desnaturalizado más del 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 95 %). Las condiciones de calentamiento necesarias para desnaturalizar ácido nucleico molde dependerán, por ejemplo, de la concentración salina del tampón y de la longitud y composición de nucleótidos de los ácidos nucleicos que se van a desnaturalizar, pero típicamente varían de aproximadamente 90 °C a aproximadamente 105 °C durante un tiempo dependiendo de las características de la reacción, tales como la temperatura y la longitud del ácido nucleico. La desnaturalización se realiza típicamente durante aproximadamente 5 segundos a 9 minutos. Para no exponer la polimerasa respectiva, como por ejemplo la ADN polimerasa Z05, a dichas temperaturas elevadas durante demasiado tiempo, y por tanto arriesgando una pérdida de enzima funcional, se prefiere el uso de etapas cortas de desnaturalización.

En una realización preferida de la divulgación, la etapa de desnaturalización es de hasta 30 segundos, adicionalmente de un modo preferente de hasta de 20 segundos, preferentemente aún de hasta 10 segundos, además preferentemente de hasta 5 segundos, más preferentemente es de aproximadamente 5 segundos.

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

25 Preferentemente, la temperatura de hibridación es de aproximadamente 35 °C a aproximadamente 70 °C, más preferentemente de aproximadamente 45 °C a aproximadamente 65 °C; más preferentemente de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 60 °C, más preferentemente de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 58 °C. Los tiempos de hibridación pueden ser de aproximadamente 10 segundos a aproximadamente 1 minuto (por ejemplo, de aproximadamente 20 segundos a aproximadamente 50 segundos, de aproximadamente 30 segundos a aproximadamente 40 segundos). En este contexto, puede ser ventajoso usar diferentes temperaturas de hibridación para aumentar la inclusividad del ensayo respectivo. En resumen, esto significa que a temperaturas de hibridación relativamente bajas, los cebadores también pueden unirse a dianas que tienen emparejamientos erróneos sencillos, de manera que también pueden amplificarse variantes de determinadas secuencias. Esto puede ser deseable si, por ejemplo, un determinado organismo, que también ha de detectarse, tiene variantes genéticas conocidas o desconocidas. Por otro lado, las temperaturas de hibridación relativamente elevadas suponen la ventaja de proporcionar mayor especificidad, ya que contra temperaturas más altas la probabilidad de que el cebador se una a secuencias diana no exactamente emparejadas, disminuye de manera continua. Para beneficiarse de ambos fenómenos, en algunas realizaciones de la invención se prefiere que el proceso descrito anteriormente comprenda la hibridación a diferentes temperaturas, preferentemente primero a una temperatura más baja y después a una temperatura más alta. Si, por ejemplo, se produce una primera incubación a 55 °C durante aproximadamente 5 ciclos, las secuencias diana no exactamente emparejadas pueden (pre)amplificarse. Esto puede ir seguido de, por ejemplo, aproximadamente 45 ciclos a 58 °C, proporcionando una mayor especificidad durante la mayor parte del experimento. De esta forma, no se pierden variantes genéticas posiblemente importantes, aunque la especificidad siga siendo relativamente alta.

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

65

Dentro del ámbito de la divulgación, puede realizarse una PCR en la que las etapas de hibridación y extensión se realizan en la misma etapa (PCR de una etapa) o, como se ha descrito anteriormente, en etapas distintas (PCR de dos etapas). El realizar la hibridación y extensión a la vez y, por tanto, en las mismas condiciones físicas y químicas, con una enzima adecuada, tal como, por ejemplo, la ADN polimerasa Z05, conlleva la ventaja de ahorrarse el tiempo que supone una etapa adicional en cada ciclo y también anula la necesidad de tener que realizar un ajuste de temperatura adicional entre la hibridación y la extensión. Por tanto, la PCR de una etapa reduce la complejidad global del ensayo respectivo.

En general, se prefieren tiempos más reducidos para la amplificación global, dado que se reduce el tiempo frente al resultado y conduce a un posible diagnóstico más temprano.

Otros métodos preferidos de amplificación de ácido nucleico a usar en el contexto de la invención comprenden la Reacción en Cadena de la Ligasa (LCR; Wu D. Y. y Wallace R. B., *Genomics* 4 (1989) 560-69; y Barany F., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 (1991)189-193); la Reacción en Cadena de la Polimerasa (Barany F., *PCR Methods y Applic.* 1 (1991) 5-16); LCR con huecos (gap) (documento WO 90/01069); la Reacción en Cadena con Reparación (documento EP 0439182 A2), 3SR (Kwoh D. Y. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 1173-1177; Guatelli J. C., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 (1990) 1874-1878; documento WO 92/08808) y NASBA (documento US 5.130.238). Adicionalmente, está la amplificación con desplazamiento de cadena (SDA), la amplificación mediada por transcripción (TMA) y la amplificación 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).

El ácido nucleico de control interno usado en la presente divulgación muestra preferentemente las siguientes propiedades relacionadas con su secuencia:

- una temperatura de fusión de 55 °C a 90 °C, más preferentemente de 65 °C a 85 °C, más preferentemente de 70 °C a 80 °C, lo más preferentemente de aproximadamente 75 °C
- una longitud de hasta 500 bases o pares de bases, más preferentemente de 50 a 300 bases o pares de bases, más preferentemente de 100 a 200 bases o pares de bases, lo más preferentemente aproximadamente 180 bases o pares de bases
- un contenido en GC de 30 % a 70 %, más preferentemente de 40 % a 60 %, lo más preferentemente de aproximadamente 50 %.

En el contexto de la divulgación una "secuencia" es la estructura primaria de un ácido nucleico, es decir, la disposición específica de las nucleobases sencillas que constituyen los respectivos ácidos nucleicos. Ha de entenderse que el término "secuencia" no significa un tipo específico de ácido nucleico, tal como ARN o ADN, sino que se aplica también tanto a otros tipos de ácidos nucleicos, tal como, por ejemplo, PNA como a otros ácidos nucleicos. Cuando las nucleobases se corresponden entre sí, particularmente en el caso de uracilo (presente en ARN) y timina (presente en ADN), estas bases pueden considerarse equivalentes entre las secuencias de ARN y ADN, como se sabe en la técnica en cuestión.

A menudo los ácidos nucleicos clínicamente relevantes son ADN que puede proceder, por ejemplo, de virus de ADN, por ejemplo, virus de la hepatitis B (HBV), citomegalovirus (CMV) y otros, o de bacterias, como por ejemplo, de *Chlamydia trachomatis* (CT), *Neisseria gonorrhoeae* (NG) y otras. En dichos casos, puede ser ventajoso usar un ácido nucleico de control interno que consista en ADN, para reflejar las propiedades de los ácidos nucleicos diana.

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

Por otro lado, numerosos ácidos nucleicos relevantes para diagnósticos clínicos son los ácidos ribonucleicos, como por ejemplo, los ácidos nucleicos de virus de ARN tales como, por ejemplo, el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), el virus de la hepatitis C (HCV), el virus del Nilo occidental (WNV), el virus del papiloma humano (HPV), el virus de la encefalitis japonesa (JEV), el virus de la encefalitis de St. Louis (SLEV) y otros. La presente invención puede aplicarse fácilmente a dichos ácidos nucleicos. En este caso, puede ser ventajoso usar un ácido nucleico de control interno que consista en ARN, para reflejar las propiedades de los ácidos nucleicos diana. Si en el proceso descrito anteriormente va a analizarse tanto el ARN como el ADN, se prefiere que el ácido nucleico de control interno sea ARN, ya que el ácido nucleico de control interno imita preferentemente la diana más sensible de un ensayo en el que intervienen dianas múltiples, y las dianas de ARN normalmente han de controlarse más de cerca.

Por tanto, un aspecto preferido de la divulgación es el método descrito anteriormente, en el que dicho ácido nucleico de control interno es ARN.

Dado que el ARN es más propenso a la degradación que el ADN, debido a influencias tales como un pH alcalino, ribonucleasas etc., los ácidos nucleicos de control interno de ARN se proporcionan preferentemente como partículas blindadas. Por ejemplo, en el documento EP910643, se describen partículas blindadas, tales como, especialmente,

ARN blindado. En resumen, el AR, que puede producirse químicamente o, preferentemente, de manera heteróloga, por ejemplo, por bacterias, tales como, por ejemplo, *E. coli*, está al menos parcialmente encapsulado en una proteína de recubrimiento vírico. La última confiere resistencia al ARN contra influencias externas, en particular ribonucleasas. Debe entenderse que el ADN de control interno también puede proporcionarse como una partícula blindada. Ambos ADN y ARN blindados son útiles como ácidos nucleicos de control interno en el contexto de la invención. En una realización preferida, los ácidos nucleicos de control de ARN están blindados con la proteína de recubrimiento MS2 en *E. coli*. En una realización preferida adicional, los ácidos nucleicos de control de ADN están blindados usando el fago lambda GT11.

Por lo tanto, un aspecto preferido de la divulgación es el método descrito anteriormente, en el que dicho ácido nucleico de control interno es un ácido nucleico blindado.

Típicamente, en el diagnóstico de ácido nucleico basado en amplificación, los moldes de ARN se transcriben en ADN antes de la amplificación y detección.

Por tanto, un aspecto preferido de la divulgación es el proceso descrito anteriormente, en el que dichos reactivos de amplificación comprenden una polimerasa con actividad transcriptasa inversa, comprendiendo adicionalmente dicho proceso, entre la etapa e. y la etapa f., la etapa de incubar, en dichos recipientes de reacción, dichos ácidos nucleicos purificados, con dicho uno o más reactivos de amplificación durante un periodo de tiempo y en condiciones adecuadas para que se produzca la transcripción de ARN por dicha polimerasa con actividad transcriptasa inversa.

Una "polimerasa con actividad transcriptasa inversa" es una polimerasa de ácido nucleico capaz de sintetizar ADN basándose en un molde de ARN. También es capaz de formar un ADN bicatenario una vez que se ha efectuado la transcripción inversa del ARN en un ADNc monocatenario. En una realización preferida de la invención, la polimerasa con actividad transcriptasa inversa es termoestable.

En una realización preferida, el proceso de acuerdo con la invención, comprende incubar una muestra que contenga un molde de ARN con un cebador oligonucleotídico suficientemente complementario a dicho molde de ARN para hibridar con el último, y una ADN polimerasa preferentemente termoestable en presencia de al menos los cuatro desoxirribonucleósidos trifosfato naturales o modificados, en un tampón apropiado que comprenda un tampón de iones metálicos que, en una realización preferida, tampone tanto el pH como la concentración de iones metálicos. Esta incubación se realiza a una temperatura que es suficiente para que dicho cebador hibride con dicho molde de ARN y dicha ADN polimerasa catalice la polimerización de dichos desoxirribonucleósidos trifosfato, para formar una secuencia de ADNc complementaria a la secuencia de dicho molde de ARN.

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

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

En la amplificación de una molécula de ARN mediante una ADN polimerasa, la primera reacción de extensión es una transcripción inversa que utiliza un molde de ARN, y se produce una cadena de ADN. La segunda reacción de extensión, usando el molde de ADN, produce una molécula de ADN bicatenaria. Por tanto, la síntesis de una cadena de ADN complementaria de un molde de ARN por una ADN polimerasa proporciona el material de partida para la amplificación.

En una reacción de transcripción inversa/amplificación de una enzima acoplada pueden usarse ADN polimerasas termoestables. El término "homogéneo", en este contexto, se refiere a una sola reacción de adición en dos etapas para la transcripción inversa y amplificación de un ARN diana. Homogéneo significa que después de la etapa de transcripción inversa (RT, *reverse transcription*), no hay necesidad de abrir el recipiente de reacción o de otra manera ajustar los componentes de la reacción antes de la etapa de amplificación. En una reacción RT/PCR no homogénea, después de la transcripción inversa y antes de la amplificación uno o más de los componentes de la reacción, tales como los reactivos de amplificación, por ejemplo, se ajustan, se añaden, o se diluyen, para lo cual el recipiente de reacción debe estar abierto, o al menos su contenido ha de poder manipularse. Aunque ambas realizaciones homogéneas y no homogéneas estén incluidas en el alcance de la invención, se prefiere el formato homogéneo para realizar la RT/PCR.

La transcripción inversa es una etapa importante en una RT/PCR. Por ejemplo se sabe en la técnica que los moldes de ARN muestran una tendencia hacia la formación de estructuras secundarias que pueden obstaculizar la unión con el cebador y/o la elongación de la cadena de ADNc por la transcriptasa inversa respectiva. Por tanto, temperaturas relativamente altas para una reacción RT son ventajosas con respecto a la eficiencia de la transcripción. Por otro lado, el aumento de la temperatura de incubación también implica mayor especificidad, es decir, los cebadores de RT no se hibridarán con secuencias que exhiban emparejamientos erróneos con la secuencia o secuencias esperada(s). Particularmente en el caso de ARN diana múltiples diferentes, puede ser deseable transcribir también y posteriormente amplificar y detectar secuencias con emparejamientos erróneos sencillos, por ejemplo, en el caso de la posible presencia de subcepas o subespecies desconocidas o raras de

organismos en la muestra líquida.

Para beneficiarse de las dos ventajas descritas anteriormente, es decir, la reducción de estructuras secundarias y la transcripción inversa de moldes con emparejamientos erróneos, se prefiere llevar a cabo la incubación RT a más de una temperatura diferente.

Por lo tanto, un aspecto preferido de la divulgación es el proceso descrito anteriormente, en el que dicha incubación de la polimerasa con actividad transcriptasa inversa se realiza a diferentes temperaturas de 30 °C a 75 °C, preferentemente de 45 °C a 70 °C, adicionalmente preferentemente de 55 °C a 65 °C.

Como un aspecto adicional importante de la transcripción inversa, etapas RT largas pueden dañar los moldes de ADN que puedan estar presentes en la muestra líquida. Si la muestra líquida contiene especies tanto de ARN como de ADN, es por tanto favorable mantener la duración de las etapas RT tan cortas como sea posible, pero al mismo tiempo garantizando la síntesis de cantidades suficientes de ADNc para la amplificación posterior y detección opcional de amplificadores.

Por tanto, un aspecto preferido de la divulgación es el proceso descrito anteriormente, en el que el periodo de tiempo para la incubación de la polimerasa con actividad transcriptasa inversa es de hasta 30 minutos, 20 minutos, 15 minutos, 12,5 minutos, 10 minutos, 5 minutos, o 1 minuto.

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

- a) una ADN polimerasa CS5
- b) una ADN polimerasa CS6
- c) una ADN polimerasa de *Thermotoga maritima*
- d) una ADN polimerasa de *Thermus aquaticus*
- e) una ADN polimerasa de *Thermus thermophilus*
- f) una ADN polimerasa de *Thermus flavus*
- g) una ADN polimerasa de *Thermus filiformis*
- h) una ADN polimerasa de *Thermus sp. sps17*
- i) una ADN polimerasa de *Thermus sp. Z05*
- j) una ADN polimerasa de *Thermotoga neapolitana*
- k) una ADN polimerasa de *Termosipho africanus*
- l) una ADN polimerasa de *Thermus caldophilus*

Particularmente adecuadas para estos requisitos son las enzimas que llevan una mutación en el dominio polimerasa que potencia su eficacia de transcripción inversa en cuanto a una velocidad de extensión más rápida.

Por lo tanto, un aspecto preferido de la divulgación es el proceso descrito anteriormente, en el que la polimerasa con actividad transcriptasa inversa es una polimerasa que comprende una mutación que confiere una velocidad de extensión de ácido nucleico mejorada y/o una actividad transcriptasa inversa mejorada con respecto a la polimerasa de tipo silvestre respectiva.

En una realización más preferida, en el proceso descrito anteriormente, la polimerasa con actividad transcriptasa inversa es una polimerasa que comprende una mutación que confiere una actividad transcriptasa inversa mejorada con respecto a la polimerasa de tipo silvestre respectiva.

En el documento WO 2008/046612 se desvelan polimerasas que llevan mutaciones puntuales que hace que sean particularmente útiles en el contexto de la invención. En particular, las polimerasas preferidas a usar en el contexto de la presente invención son ADN polimerasas mutadas que comprenden al menos el siguiente motivo en el dominio polimerasa: T-G-R-L-S-S-X<sub>b7</sub>-X<sub>b8</sub>-P-N-L-Q-N; en el que X<sub>b7</sub> es un aminoácido seleccionado de S o T y en el que X<sub>b8</sub> es un aminoácido seleccionado de G, T, R, K, o L, en el que la polimerasa comprende actividad exonucleasa 3'-5' y tiene una velocidad de extensión de ácido nucleico mejorada y/o una eficiencia de transcripción inversa mejorada con respecto a la ADN polimerasa de tipo silvestre, en el que en dicha ADN polimerasa de tipo silvestre X<sub>b8</sub> es un

aminoácido seleccionado de D, E o N.

Un ejemplo particularmente preferido es los mutantes de la ADN polimerasa termoestable de *Thermus sp. Z05* (descrita, por ejemplo, en el documento US 5.455.170), comprendiendo dichas variaciones mutaciones en el dominio polimerasa en comparación con la enzima Z05 de tipo silvestre respectiva. Especialmente preferida para el método de acuerdo con la invención es una ADN polimerasa Z05 mutante en la que el aminoácido en la posición 580 se selecciona del grupo que consiste en G, T, R, K y L.

Para la transcripción inversa usando una polimerasa termoestable, como catión bivalente se prefiere  $Mn^{2+}$  y está típicamente incluido como una sal, por ejemplo, cloruro de manganeso ( $MnCl_2$ ), acetato de manganeso ( $Mn(OAc)_2$ ), o sulfato de manganeso ( $MnSO_4$ ). Si se incluye  $MnCl_2$  en una reacción que contenga tampón de Tricina 50 mM, por ejemplo, el  $MnCl_2$  estará generalmente presente a una concentración de 0,5-7,0 mM; prefiriéndose una concentración de 0,8-1,4 mM cuando se utilizan 200 mM de cada dGTP, dATP, dUTP y dCTP; y siendo más preferida una concentración de 2,5-3,5 mM de  $MnCl_2$ . Adicionalmente, el uso de  $Mg^{2+}$  como un catión divalente para la transcripción inversa también se prefiere en el contexto de la presente invención.

Dado que la transcripción inversa de los ácidos nucleicos diana de ARN en ADNc se incluye en el ámbito de los métodos descritos, conservando al mismo tiempo los ácidos nucleicos diana de ADN, tanto el ADNc como el ADN, pueden usarse para la amplificación posterior, el proceso internamente controlado descrito anteriormente es particularmente útil para la amplificación simultánea de ácidos nucleicos diana procedentes tanto de organismos que tienen un genoma de ARN como de organismos que tienen un genoma de ADN. Esta ventaja aumenta considerablemente el espectro de diferentes organismos, especialmente patógenos, que pueden analizarse en las mismas condiciones físicas.

Por lo tanto, un aspecto preferido de la divulgación es el proceso descrito anteriormente, en el que al menos dos ácidos nucleicos diana comprenden ARN y ADN.

Un "organismo", como se usa en el presente documento, significa cualquier forma viva multicelular o unicelular. En el contexto de la invención, un virus es un organismo.

Especialmente, debido a una temperatura óptima apropiada, enzimas como la polimerasa de Tht o, preferentemente, la ADN polimerasa Z05 mutante mencionada anteriormente, son idóneas para llevar a cabo la etapa de amplificación posterior de los ácidos nucleicos diana. El aprovechamiento de la misma enzima tanto para la transcripción inversa como para la amplificación, contribuye a facilitar la realización del proceso y facilitar su automatización, dado que la muestra líquida no tiene que manipularse entre la etapa de RT y la de amplificación.

Por lo tanto, en una realización preferida, en el proceso descrito anteriormente, se usa la misma polimerasa con actividad transcriptasa inversa para realizar la transcripción inversa y para realizar la amplificación en la etapa f. Preferentemente, la enzima es la ADN polimerasa Z05 mutante descrita anteriormente.

Para no exponer la polimerasa u otros componentes de la mezcla de reacción usados en el contexto de la invención a temperaturas elevadas durante tiempos más largos de los necesarios, en una realización preferida, las etapas por encima de 90 °C tienen una duración de hasta 20 s, preferentemente de hasta 15 s, más preferentemente de hasta 10 s, más preferentemente de hasta 5 s y lo más preferentemente de 5 s. Esto también reduce el tiempo hasta obtener el resultado y acorta el tiempo necesario global del ensayo.

En dicha configuración homogénea, puede ser una ventaja considerable sellar los recipientes de reacción antes de iniciar la RT y la amplificación, reduciendo de este modo el riesgo de contaminación. El sellado puede realizarse, por ejemplo, aplicando una lámina que sea preferentemente transparente, un tapón o añadiendo aceite en los recipientes de reacción y formando una fase lipófila como una capa de sellado en la parte superior del líquido.

Por tanto, un aspecto preferido de la divulgación es el proceso descrito anteriormente, que comprende adicionalmente, después de la etapa e., la etapa de sellado de al menos dos recipientes de reacción.

Para simplificar la manipulación y facilitar la automatización, es preferible combinar los al menos dos recipientes de reacción en una disposición integral, de manera que puedan manipularse conjuntamente.

En consecuencia, un aspecto preferido de la divulgación es el proceso descrito anteriormente, en el que al menos dos recipientes de reacción se combinan en la misma disposición integral.

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

La diana de la etapa de amplificación puede ser una molécula híbrida de ARN/ADN. La diana puede ser un ácido nucleico monocatenario o bicatenario. Aunque el procedimiento de PCR más ampliamente utilizado se realiza con una diana bicatenaria, esto no es un requisito. Después del primer ciclo de amplificación de una diana de ADN monocatenario, la mezcla de reacción contiene una molécula de ADN bicatenaria que consiste en la diana monocatenaria y una cadena complementaria recién sintetizada. De manera similar, después del primer ciclo de amplificación de una diana de ARN/ADNc, la mezcla de reacción contiene una molécula de ADNc bicatenario. En este punto, se realizan ciclos de amplificación sucesivos como se describe anteriormente.

Dado que la amplificación del ácido nucleico, especialmente aunque no solo en el caso de la PCR, es muy eficaz si se realiza como una reacción de ciclado, un aspecto preferido de la invención es el proceso descrito anteriormente, en el que la reacción de amplificación en la etapa f. consta de etapas de ciclado múltiples.

5 El experto en el campo conoce métodos de detección de ácido nucleico adecuados y se describen en libros de texto convencionales tales como en Sambrook J. *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989 y Ausubel F. *et al.*: Current Protocols in Molecular Biology 1987, J. Wiley and Sons, NY. También puede haber etapas de purificación adicionales antes de realizar la etapa de detección de ácido nucleico, tal como, por ejemplo, una etapa de precipitación. Los métodos de detección pueden  
10 incluir, pero sin limitación, la unión o intercalación de colorantes específicos, tales como bromuro de etidio que se intercala en el ADN bicatenario y cambia su fluorescencia después de ello. El ácido nucleico purificado también puede separarse por métodos electroforéticos opcionalmente después de una digestión con enzimas de restricción y después de esto visualizarse. Hay también ensayos basados en sondas que aprovechan la hibridación de oligonucleótidos con secuencias específicas y posterior detección del híbrido.

15 Para evaluar el resultado del análisis, se prefiere detectar los ácidos nucleicos diana amplificados durante o después de la reacción de amplificación. Particularmente para la detección en tiempo real, es ventajoso usar sondas de ácido nucleico.

20 Por tanto, un aspecto preferido de la divulgación es el proceso descrito anteriormente, en el que una etapa de ciclado comprende una etapa de amplificación y una etapa de hibridación, comprendiendo dicha etapa de hibridación hibridar con sondas los ácidos nucleicos amplificados.

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

Por lo tanto, un aspecto preferido de la invención es el proceso descrito anteriormente, en el que las sondas se marcan con un radical fluorescente donante y un radical fluorescente aceptor correspondiente. Los métodos expuestos anteriormente se basan preferentemente en la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) entre un radical fluorescente donante y un radical fluorescente aceptor. Un radical fluorescente donante representativo es la fluoresceína, y los radicales fluorescentes aceptores correspondientes representativos incluyen LC-Red 640, LC-Red 705, Cy5 y Cy5.5. Típicamente, la detección incluye excitar la muestra a una longitud de onda absorbida por el radical fluorescente donante y visualizar y/o medir la longitud de onda emitida por el radical fluorescente aceptor correspondiente. En el proceso de acuerdo con la invención, la detección viene preferentemente seguida de cuantificación de FRET. Preferentemente, la detección se realiza después de cada etapa de ciclado. Más preferentemente, la detección se realiza en tiempo real. Usando instrumentación PCR en tiempo real disponible en el comercio (por ejemplo, LightCycler™ o TaqMan®), la amplificación por PCR y la detección del producto de amplificación pueden combinarse en una sola cubeta cerrada con un tiempo de ciclado drásticamente reducido. Dado que la detección se produce simultáneamente con la amplificación, los métodos de  
30 PCR en tiempo real obvian la necesidad de manipular el producto de amplificación, y se disminuye el riesgo de contaminación cruzada entre los productos de amplificación. La PCR en tiempo real reduce enormemente el tiempo de respuesta y es una alternativa atractiva a las técnicas de PCR convencionales en el laboratorio clínico.

35 Las siguientes solicitudes de patente describen la PCR en tiempo real como se usa en la tecnología LightCycler™: WO 97/46707, WO 97/46714 y WO 97/46712. El instrumento LightCycler™ es un termociclador rápido combinado con un fluorómetro de microvolumen que utiliza óptica de alta calidad. Esta técnica de termociclado rápido utiliza cubetas de vidrio fino como recipientes de reacción. El calentamiento y enfriamiento de la cámara de reacción se controlan alternando el aire caliente y ambiental. Debido a la baja masa de aire y a la alta proporción del área de superficie con respecto al volumen de las cubetas, pueden conseguirse velocidades de cambio de temperatura muy  
40 rápidas dentro de la cámara térmica.

La tecnología TaqMan® utiliza una sonda de hibridación monocatenaria marcada con dos radicales fluorescentes. Cuando un primer radical fluorescente se excita con luz de una longitud de onda adecuada, la energía absorbida se transfiere a un segundo radical fluorescente de acuerdo con los principios de FRET. El segundo radical fluorescente generalmente es una molécula inactivadora. Los colorantes fluorescentes típicos usados en este formato son, por ejemplo, entre otros, FAM, HEX, CY5, JA270, Cyan y CY5.5. Durante la etapa de hibridación de la reacción PCR, la sonda de hibridación marcada se une al ácido nucleico diana (es decir, al producto de amplificación) y se degrada por la actividad exonucleasa 5' a 3' de la Taq u otra polimerasa adecuada como sabe el experto en la técnica, tal como la polimerasa Z05 mutante preferida, durante la fase de elongación posterior. Como resultado, el radical fluorescente excitado y el radical inactivador comienzan a separarse espacialmente entre sí. Como consecuencia, después de la excitación del primer radical fluorescente en ausencia del inactivador, puede detectarse la emisión de fluorescencia desde el primer radical fluorescente.  
55

60 En los dos formatos de detección descritos anteriormente, la intensidad de la señal emitida puede correlacionarse con el número de moléculas de ácido nucleico diana originales.  
65

Como una alternativa a FRET, un producto de amplificación puede detectarse usando un colorante que se une a ADN bicatenario, tal como un colorante fluorescente que se une a ADN (por ejemplo, SYBRGREEN I® o SYBRGOLD® (Molecular Probes)). Después de la interacción con el ácido nucleico bicatenario, dichos colorantes fluorescentes de unión a ADN emiten una señal de fluorescencia después de la excitación con luz a una longitud de onda adecuada. También puede usarse un colorante que se une a ADN bicatenario, tal como un colorante intercalante para ácidos nucleicos. Cuando se usan colorantes de unión a ADN bicatenarios, se realiza normalmente un análisis de curva de fusión para confirmar la presencia del producto de amplificación.

También es posible usar balizas moleculares (*molecular beacons*) junto con FRET para detectar la presencia de un producto de amplificación usando los métodos de PCR en tiempo real de la invención. La tecnología de baliza molecular usa una sonda de hibridación marcada con un primer radical fluorescente y un segundo radical fluorescente. El segundo radical fluorescente es generalmente un inactivador (*quencher*), y las sondas fluorescentes están típicamente localizadas en cada extremo de la sonda. La tecnología de baliza molecular utiliza un oligonucleótido sonda que tiene secuencias que permiten la formación de una estructura secundaria (por ejemplo, una horquilla). Como un resultado de la formación de la estructura secundaria dentro de la sonda, ambos radicales fluorescentes se aproximan cuando la sonda está en solución. Después de la hibridación con los productos de amplificación, la estructura secundaria de la sonda se altera y los radicales fluorescentes comienzan a separarse entre sí de tal manera que después de excitación con luz de una longitud de onda adecuada, la emisión del primer radical fluorescente puede detectarse.

Por tanto, un método preferido de acuerdo con la invención es el método descrito anteriormente que utiliza FRET, en el que dichas sondas comprenden una secuencia de ácido nucleico que permite la formación de una estructura secundaria, dan como resultado dicha formación de estructura secundaria un acercamiento entre dichos primer y segundo radicales fluorescentes.

La tecnología FRET eficaz solo puede tener lugar cuando los radicales fluorescentes están en proximidad local directa y cuando el espectro de emisión del radical fluorescente donante solapa con el espectro de absorción del radical fluorescente aceptor.

Por tanto, en un aspecto preferido, dichos radicales fluorescentes donante y aceptor, están a una distancia entre sí no superior a 5 nucleótidos en dicha sonda.

En una realización adicional preferida, dicho radical fluorescente aceptor es un inactivador.

Como se ha descrito anteriormente, en el formato TaqMan, durante la etapa de emparejamiento (*annealing*) de la reacción de PCR, la sonda de hibridación marcada se une al ácido nucleico diana (es decir, el producto de amplificación) y durante la fase de elongación posterior, es degradada por la actividad exonucleasa en dirección de 5' a 3' de la Taq polimerasa u otra polimerasa adecuada como sabe el experto en la técnica, tal como la polimerasa Z05 mutante preferida.

Por tanto, en una realización preferida, en el proceso descrito anteriormente, la amplificación emplea una enzima polimerasa que tiene actividad exonucleasa en dirección de 5' a 3'.

Es adicionalmente ventajoso seleccionar cuidadosamente la longitud del amplicón que se produce como resultado del proceso descrito anteriormente. Generalmente, los amplicones relativamente cortos aumentan la eficacia de la reacción de amplificación. Por tanto, un aspecto preferido de la invención es el proceso descrito anteriormente, en el que los fragmentos amplificados comprenden hasta 450 bases, preferentemente hasta 300 bases, adicionalmente preferentemente hasta 200 bases, y más preferentemente hasta 150 bases.

El ácido nucleico de control interno usado en la presente divulgación puede servir como un "ácido nucleico patrón cuantitativo" que es apto para ser y usarse como una referencia para cuantificar, es decir, determinar la cantidad de ácidos nucleicos diana. Para esta finalidad, uno o más ácidos nucleicos patrón cuantitativos se someten a todas las posibles etapas de preparación de muestras junto con los ácidos nucleicos diana. Además, en todo el método, un ácido nucleico patrón cuantitativo se procesa dentro de la misma mezcla de reacción. Esto puede generar, directa o indirectamente, una señal detectable tanto en presencia como en ausencia del ácido nucleico diana. Para esta finalidad, la concentración del ácido nucleico patrón cuantitativo tiene que optimizarse cuidadosamente en cada ensayo para no interferir con la sensibilidad, pero también para generar una señal detectable, por ejemplo, a concentraciones diana muy altas. En términos del límite de detección (LDD, véase más adelante) del ensayo respectivo, el intervalo de concentración para el "ácido nucleico patrón cuantitativo" es preferentemente de 20-5000x LDD, más preferentemente de 20-1000x LDD, lo más preferentemente de 20-5000x LDD. La concentración final del ácido nucleico patrón cuantitativo en la mezcla de reacción depende del intervalo de medición cuantitativo llevado a cabo.

Por "límite de detección" o "LDD" se entiende la cantidad o concentración detectable más baja de un ácido nucleico en una muestra. Una "LDD" baja se corresponde con sensibilidad alta y viceversa. La "LDD" se expresa normalmente bien mediante la unidad "cp/ml", particularmente si el ácido nucleico es un ácido nucleico vírico, o

como UI/ml. La expresión "cp/ml" significa "copias por mililitro", siendo la "copia" una copia del ácido nucleico respectivo. La expresión UI/ml representa "unidades internacionales/ml", refiriéndose a la norma de la OMS.

5 Un método muy usado para realizar el cálculo de un LDD es el "análisis de Probit", que es un método que analiza la relación entre un estímulo (dosis) y la respuesta cuántica (todo o nada). En un experimento típico de respuesta cuántica, grupos de animales reciben dosis diferentes de un fármaco. El porcentaje de colorante a cada nivel de dosis se registra. Estos datos pueden después analizarse usando el análisis de Probit. El modelo Probit supone que el porcentaje de respuesta está relacionado con la dosis logarítmica como la distribución normal acumulativa. Esto es, las dosis logarítmicas pueden usarse como variables para leer el porcentaje de colorante a partir del normal  
10 acumulado. El uso de la distribución normal, en lugar de otras distribuciones de probabilidad, influye en la velocidad de respuesta prevista en los extremos superior e inferior de posibles dosis, pero apenas influye cerca del centro.

15 El análisis de Probit puede aplicarse a "índices de acierto" distintos. Como se sabe en la técnica, un "índice de acierto" se expresa normalmente en porcentaje [%] e indica el porcentaje de resultados positivos a una concentración específica de un analito. Por tanto, por ejemplo, un LDD puede determinarse a un índice de acierto de 95 %, lo que significa que la LDD se calcula para una configuración en la que el 95 % de los resultados válidos son positivos.

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

25 Con respecto a algunos ejemplos de posibles ácidos nucleicos diana procedentes de determinados virus, el proceso descrito anteriormente proporciona preferentemente los siguientes LDD:

- HIV: hasta 60 cp/ml, más preferentemente hasta 50 cp/ml, más preferentemente hasta 40 cp/ml, más preferentemente hasta 30 cp/ml, más preferentemente hasta 20 cp/ml, más preferentemente hasta 15 cp/ml
- HBV: hasta 10 UI/ml, más preferentemente hasta 7,5 UI/ml, más preferentemente hasta 5 UI/ml
- HCV: hasta 10 UI/ml, más preferentemente hasta 7,5 UI/ml, más preferentemente hasta 5 UI/ml
- WNV I: hasta 20 cp/ml, más preferentemente hasta 15 cp/ml, más preferentemente hasta 10 cp/ml
- WNV II: hasta 20 cp/ml, más preferentemente hasta 15 cp/ml, más preferentemente hasta 10 cp/ml, más preferentemente hasta 5 cp/ml
- JEV: hasta 100 cp/ml, más preferentemente hasta 75 cp/ml, más preferentemente hasta 50 cp/ml, más preferentemente hasta 30 cp/ml
- SLEV: hasta 100 cp/ml, más preferentemente hasta 75 cp/ml, más preferentemente hasta 50 cp/ml, más preferentemente hasta 25 cp/ml, más preferentemente hasta 10 cp/ml.

45 A continuación se describe un ejemplo de cómo realizar un cálculo de resultados cuantitativos en el formato TaqMan basándose en un ácido nucleico de control interno que sirve como un ácido nucleico patrón cuantitativo: se calcula un título de datos de entrada de valores de fluorescencia corregidos con el instrumento de un desarrollo de PCR completo. Un conjunto de muestras que contiene un ácido nucleico diana y un ácido nucleico de control interno sirve como ácido nucleico patrón cuantitativo sometido a PCR en un termociclador usando un perfil de temperatura específico. A los perfiles de temperatura y tiempo seleccionados durante la PCR las muestras se iluminan con luz filtrada y se recogen datos de fluorescencia filtrados de cada muestra para el ácido nucleico diana y el ácido nucleico de control interno. Después de completar un desarrollo de PCR completo, las lecturas de fluorescencia se procesan para producir un conjunto de datos de concentración de colorante para el ácido nucleico de control interno y un conjunto de datos de concentración de colorante para el ácido nucleico diana. Cada conjunto de datos de concentración de colorante se procesa de la misma manera. Después de diversas comprobaciones de verosimilitud,  
50 se calculan los valores de codo (CT) para el ácido nucleico de control interno y el ácido nucleico diana. El valor de codo se define como el punto en el cual la fluorescencia del ácido nucleico diana o del ácido nucleico interno atraviesa un umbral previamente definido (concentración de fluorescencia). La determinación del título se basa en la hipótesis de que el ácido nucleico diana y el ácido nucleico de control interno se amplifican con la misma eficacia y que al valor de codo calculado se detectan y amplifican las mismas cantidades de copias de amplicón de ácido nucleico diana y de ácido nucleico de control interno. Por lo tanto, el (CTQS - CTdiana) es lineal al logaritmo (conc diana/conc QS). En este contexto, QS representa el ácido nucleico de control interno (*quantitative standard*) que sirve como un ácido nucleico patrón cuantitativo. Después, el título T puede calcularse, por ejemplo, usando una fórmula de calibrado polinómica como en la siguiente ecuación:

$$65 \quad T' = 10 (a(CTQS - CTdiana)^2 + b(CTQS - CTdiana) + c)$$

Las constantes polinómicas y la concentración del ácido nucleico patrón cuantitativo se conocen, por lo tanto la única variable en la ecuación es la diferencia entre (CTQS - CTdiana).

Además, en el sentido de la divulgación, el ácido nucleico de control interno puede servir como un "ácido nucleico de control interno cualitativo". Un "ácido nucleico de control interno cualitativo" es particularmente útil para confirmar la validez del resultado del ensayo de un ensayo de detección cualitativo: Incluso en el caso de un resultado negativo, el control interno cualitativo debe detectarse, en caso contrario se considera que el propio ensayo es inoperante. Sin embargo, en una configuración cualitativa, no es necesario tener que detectar en caso de un resultado positivo. Como una consecuencia, su concentración debe ser relativamente baja. Debe adaptarse cuidadosamente al ensayo respectivo y a su sensibilidad. Preferentemente, el intervalo de concentración para el ácido nucleico interno cualitativo, es decir, el segundo ácido nucleico de control, comprenderá un intervalo de 1 copia por reacción a 1.000 copias por reacción. En relación al límite de detección (LDD) del ensayo respectivo, su concentración varía preferentemente entre el LDD de un ensayo y 25 veces el valor del LDD, más preferentemente entre el LDD y 10 veces el valor de LDD (10x LDD) Más preferentemente, varía entre 2 veces y 10 veces el LDD (2x y 10x LDD). Incluso más preferentemente, varía entre 5x y 10x LDD. Más preferentemente, entre 5x o 10x LDD.

El ácido nucleico de control interno, como se usa en la presente divulgación, no está limitado a una secuencia particular. Puede ser ventajoso añadir diferentes ácidos nucleicos de control interno a las muestras líquidas, pero usar solo uno de ellos para la amplificación, por ejemplo, añadiendo únicamente cebadores para uno de dichos ácidos nucleicos de control interno. En dichas realizaciones, el experto en la técnica puede seleccionar el ácido nucleico de control interno a amplificar en un determinado experimento, aumentando de este modo la flexibilidad del análisis a realizar. En realizaciones particularmente ventajosas, dichos ácidos nucleicos de control interno diferentes pueden comprender una sola construcción de ácido nucleico, por ejemplo, un plásmido o una molécula de ácido nucleico adecuada diferente.

Por lo tanto, un aspecto preferido de la divulgación es el proceso descrito anteriormente, en el que en la etapa a., se añade más de un ácido nucleico de control interno, pero solo uno de dichos ácidos nucleicos de control interno se amplifica en la etapa f.

Los resultados descritos anteriormente pueden adulterarse y, por ejemplo, comprender positivos falsos, en el caso de contaminación cruzada con ácidos nucleicos de fuentes distintas a las de la muestra líquida. En particular, los amplificados de experimentos anteriores pueden contribuir a dichos efectos indeseados. Un método particular para minimizar los efectos de contaminación cruzada de la amplificación de ácidos nucleicos se describe en la patente de Estados Unidos n.º 5.035.996. El método implica introducir en el producto amplificado bases de nucleótidos no convencionales, tales como dUTP, y exponer productos secundarios a tratamiento enzimático y/o fisicoquímico para hacer que el producto de ADN no pueda servir como un molde para amplificaciones posteriores. En la técnica se conocen enzimas para realizar dichos tratamientos. Por ejemplo, la uracil-ADN glucosilasa, también conocida como uracil-N-glucosilasa o UNG, retirará restos de uracilo de productos de PCR que contengan esa base. El tratamiento con enzimas da como resultado la degradación de productos contaminantes secundarios de la PCR y sirve para "esterilizar" la reacción de amplificación.

Por tanto, un aspecto preferido de la divulgación es el proceso descrito anteriormente, que adicionalmente comprende, entre la etapa d) y la etapa e), las etapas de

- tratar la muestra líquida con una enzima en condiciones en las que los productos resultantes de amplificaciones de ácidos nucleicos con contaminación cruzada de otras muestras, se degradan enzimáticamente;
- inactivar dicha enzima.

Preferentemente, la enzima es uracil-N-glucosilasa.

En el proceso de acuerdo con la divulgación, es preferible que todas las etapas estén automatizadas. "Automatizadas" significa que las etapas de un proceso son adecuadas para realizar con un aparato o una máquina que puede funcionar con escaso o ningún control externo o influencia externa, por parte de un ser humano. Únicamente las etapas de preparación del método pueden realizarse manualmente, por ejemplo, los envases almacenados deben despacharse y colocarse en su sitio, la elección de las muestras debe efectuarla una persona y otras etapas conocidas por el experto en la técnica, por ejemplo, el funcionamiento de un ordenador controlador. El aparato o máquina puede añadir, por ejemplo, automáticamente líquidos, mezclar las muestras o realizar etapas de incubación a temperaturas específicas. Típicamente, dicha máquina o aparato es un robot controlado por un ordenador que realiza un programa en el que se especifican etapas e instrucciones individuales.

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

65

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

- 5
- una estación de amplificación (405) que comprende al menos dos recipientes de reacción, comprendiendo dichos recipientes de reacción reactivos de amplificación, al menos un primer ácido nucleico diana purificado en al menos un primer recipiente de reacción y al menos un segundo ácido nucleico diana purificado en al menos un segundo recipiente de reacción, en el que el segundo ácido nucleico diana no está presente en el primer recipiente de reacción, un ácido nucleico de control interno y una polimerasa con actividad transcriptasa inversa, comprendiendo adicionalmente dicha polimerasa una mutación que confiere una velocidad de extensión de ácido nucleico mejorada y/o una actividad transcriptasa inversa mejorada con respecto a la polimerasa de tipo silvestre respectiva
- 10

15 Uno "sistema analítico" es una disposición de componentes, tal como instrumentos que interaccionan entre sí con el objetivo final de analizar una muestra determinada.

Las ventajas de dicho sistema analítico son las mismas que las descritas anteriormente con respecto al proceso de acuerdo con la invención.

20 El sistema analítico (440, Fig. 11) de la presente invención es un sistema (440) que comprende un módulo (401) para aislar y/o para purificar un analito. Adicionalmente, el sistema (440) comprende adicionalmente un módulo (403) para analizar dicho analito para obtener una señal detectable. La señal detectable puede detectarse en el mismo módulo (401, 402, 403) o, como alternativa, en un módulo distinto. El término "módulo" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier localización espacialmente definida dentro del analizador (400). Dos módulos (401, 403) pueden estar separados por paredes, o pueden estar en relación abierta. Cualquier módulo (401,402, 403) puede estar autónomamente controlado, o el control del módulo (401,402, 403) puede estar compartido con otros módulos. Preferentemente, todos los módulos se controlan centralmente. La transferencia entre módulos (401,402, 403) puede ser manual, pero preferentemente está automatizada. Por tanto, en la presente invención se incluyen diversas realizaciones diferentes de analizadores (400) automatizados.

25

30 La "estación de separación" se describe anteriormente.

Una "estación de amplificación" comprende una incubadora a una temperatura controlada para incubar el contenido de al menos dos recipientes de reacción. Adicionalmente comprende una variedad de recipientes de reacción como tubos o placas, en los que se realiza una reacción, tal como PCR, para el análisis de la muestra. Los límites externos o las paredes externas de dichos recipientes son químicamente inertes de tal manera que no interfieren con la reacción de amplificación que se realiza en su interior. Para simplificar la manipulación y facilitar la automatización, es preferible combinar los al menos dos recipientes de reacción en una disposición integral, de manera que puedan manipularse a la vez.

35

40 Por consiguiente, un aspecto preferido de la invención es el sistema analítico descrito anteriormente, en el que al menos dos recipientes de reacción se combinan en una disposición integral.

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

Preferentemente, dicha placa multipocillo se sostiene en una estación de sujeción. En una realización más preferida, un manipulador transporta un recipiente multipocillo desde una estación de sujeción a un compartimento hermético (460), y un segundo manipulador transporta dicha placa multipocillo desde dicho compartimento hermético a dicha estación de amplificación, en el que ambos manipuladores interaccionan con dicha placa multipocillo a través de una interacción hermética.

50

En una realización preferida, el sistema analítico está completamente automatizado.

55 En una realización, los al menos dos recipientes de reacción combinados en una disposición integral se transportan entre estaciones del sistema.

60 En una segunda realización, el ácido nucleico diana purificado se transfiere desde dicha estación de separación a dicha estación de amplificación. Preferentemente, un pipeteador, que comprende pipetas con puntas de pipeta unidas, transfiere el líquido que comprende el ácido nucleico purificado.

65 En una tercera realización, el ácido nucleico purificado se transfiere desde dicha estación de separación a un recipiente de reacción en una disposición integral que sujeta una estación de sujeción. Preferentemente, dicho recipiente de reacción en una disposición integral se transfiere después desde dicha estación de sujeción a dicha estación de amplificación.

El sistema analítico de acuerdo con la invención comprende adicionalmente de un modo preferido una unidad de pipeteo. Dicha unidad de pipeteo comprende al menos una pipeta, preferentemente pipetas múltiples. En una realización preferida, dichas pipetas múltiples se combinan en una o más disposiciones integrales, dentro de las cuales las pipetas pueden manipularse preferentemente de un modo individual. Las pipetas usadas en el contexto de la invención son preferentemente pipetas que comprenden puntas de pipeta como se describe anteriormente. En otra realización preferida, las pipetas son agujas para pipeta.

Como alternativa, un recipiente de reacción o disposición de recipientes de reacción usados para la preparación de las muestras en la estación de separación y que contienen el líquido que comprende los ácidos nucleicos diana purificados, pueden transferirse desde la estación de separación a la estación de amplificación.

Para esta finalidad, el sistema analítico de acuerdo con la invención comprende adicionalmente de un modo preferido una unidad de transferencia, comprendiendo preferentemente dicha unidad de transferencia un dispositivo robótico, comprendiendo preferentemente dicho dispositivo un manipulador.

Por las razones expuestas anteriormente en el contexto del proceso de acuerdo con la invención, lo que se indica a continuación son aspectos adicionales preferidos de la invención:

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

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

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

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

Para sellar cualquiera de los vasos usados en relación con el sistema analítico de acuerdo con la invención, se construye y dispone un "sellador" (410). Dicho sellador puede sellar, por ejemplo, tubos con tapones apropiados, o placas multipocillo con láminas u otros materiales de sellado adecuados.

Un "módulo de almacenamiento" (1008) almacena los reactivos necesarios para efectuar una reacción química o biológica importante para el análisis de la muestra líquida. También puede comprender otros componentes útiles para el método de la invención, por ejemplo, desechables, tales como puntas de pipeta o recipientes para usar como recipientes de reacción dentro de la estación de separación y/o de la estación de amplificación.

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

Dicha una "unidad de control (1006) puede comprender software para garantizar que los diferentes componentes de dicho sistema analítico funcionan e interaccionan correctamente y con una sincronización correcta, por ejemplo, moviendo y manipulando componentes, tales como pipetas, de una manera coordinada. La unidad de control también puede comprender un procesador que desarrolla un sistema operativo en tiempo real (RTOS, *real-time operating system*), que es un sistema operativo multitarea destinado para aplicaciones en tiempo real. En otras palabras el procesador del sistema puede manejar limitaciones en tiempo real, es decir, fechas límite operativas de acontecimientos con respecto a la respuesta del sistema independientemente de la carga del sistema. Controla en tiempo real que las diferentes unidades dentro del sistema funcionen y respondan correctamente de acuerdo con instrucciones dadas.

En una realización preferida, la presente invención se refiere a un sistema analítico (440) para procesar un analito, que comprende

a. una primera posición que comprende primeros receptáculos (1001) en disposición lineal que comprenden muestras líquidas (1010), una placa (101) de procesamiento que comprende receptáculos (103) en disposición nxm que contienen una muestra líquida (1011), un primer dispositivo de pipeteo (700) que comprende al menos dos unidades de pipeteo (702) en disposición lineal, estando dichas dos unidades de pipeteo (702) acopladas a puntas de pipeta (3, 4), y a una rejilla con puntas (70) que comprende puntas de pipeta (3, 4) en una disposición ax(nxm);

b. una segunda posición que comprende un soporte (201, 128) para dicha placa (101) de procesamiento, un soporte (330) para una placa multipocillo, un soporte (470) para dicha rejilla con puntas (70) y un segundo dispositivo de pipeteo (35), comprendiendo dicho segundo dispositivo de pipeteo (35) unidades de pipeteo (702) en una disposición nxm para acoplar las puntas de pipeta (3, 4) (Fig. 12). El término "soporte" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier disposición capaz de recibir una rejilla o una placa de procesamiento.

Las ventajas del sistema analítico (440) de la presente invención son como se ha descrito anteriormente para el método de la presente invención.

Preferentemente, la posición de dichas unidades de pipeteo (702) de dicho primer dispositivo de pipeteo (700) es variable. A continuación, en lo sucesivo en el documento, se describen realizaciones preferidas de dicho primer sistema de pipeteo (700).

En una realización, la rejilla con puntas (70) comprende puntas de pipeta (3, 4) en una disposición ax(nxm). Preferentemente, un primer tipo (4) y un segundo tipo (3) de puntas de pipeta están incluidos en la rejilla con puntas (70). En esta realización, el primer tipo de puntas de pipeta (4) se dispone en una disposición nxm, y el segundo tipo de puntas de pipeta (3) se dispone en la disposición nxm. En este contexto, "n" significa el número de filas y m el número de columnas, en el que n es preferentemente 6 y m es preferentemente 8. Más preferentemente, el primer tipo de puntas de pipeta (4) tiene un volumen diferente al segundo tipo de puntas de pipeta (3), más preferentemente, el volumen del primer tipo de puntas de pipeta (4) es mayor de 500 ul, y el volumen del segundo tipo de puntas de pipeta (3) es menor de 500 ul. En esta realización, a=2. Sin embargo, las realizaciones de la invención con más de dos tipos de puntas de pipeta, y por tanto un valor >2 también se incluyen en la presente invención.

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

En un aspecto de la invención, el sistema comprende adicionalmente un sistema de transferencia (480) para transferir dicha placa (101) de procesamiento y dicha rejilla (70) entre la primera (402) y segunda (401) posición. Las realizaciones preferidas de dicho sistema de transferencia (480) son cintas transportadoras o, más preferentemente, uno o más manipuladores.

Adicionalmente, de manera preferente, dichas unidades de pipeta de dicho segundo dispositivo de pipeteo (35) se acoplan a puntas de pipeta (3, 4) que se usaron en la primera posición (402).

Una realización preferida del sistema (440) de la presente invención comprende adicionalmente una tercera estación (403) que comprende una incubadora a una temperatura controlada para incubar dicho analito con reactivos necesarios para obtener una señal detectable. A continuación, en lo sucesivo en el documento, se describen realizaciones preferidas adicionales de este sistema.

Se obtiene un control más óptimo de la asignación de las muestras y ensayos en la disposición nxm con un primer procesador (1004) que está comprendido en dicha primera posición (402) con respecto a la cual dicha unidad de control (1006) transfiere instrucciones para asignar tipos de muestras y ensayos individuales en posiciones específicas en la disposición nxm de los recipientes (103) de la placa (101) de procesamiento y un segundo procesador (1005) que está comprendido en dicha segunda posición (401) con respecto a la cual dicha unidad de control (1006) transfiere instrucciones para asignar tipos de muestras y ensayos individuales en posiciones específicas en la disposición nxm de los recipientes (103) de la placa de procesamiento.

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

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

Todas las restantes realizaciones preferidas y descripciones específicas de realizaciones del sistema analítico de acuerdo con la divulgación son las mencionadas para el proceso de acuerdo con la divulgación.

Breve descripción de las figuras

Figura 1:

Representación esquemática del flujo de trabajo de la preparación de muestras como se usa en una realización de la divulgación.

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

Ha de entenderse que los volúmenes que se usan pueden ajustarse de manera flexible dentro del espíritu de la invención, preferentemente al menos aproximadamente hasta el 30 % de los valores desvelados. En particular, en el caso de la etapa 2, el volumen de la muestra es preferentemente variable para tener en cuenta los diferentes tipos de muestras líquidas que, como sabe el experto, pueden requerir más o menos material de partida para obtener resultados adecuados. Preferentemente, el intervalo es de aproximadamente 100 ul a aproximadamente 850 ul. Más preferentemente, es de aproximadamente 100 ul, de aproximadamente 500 ul o de aproximadamente 850 ul. Preferentemente, el volumen en los recipientes respectivos se ajusta a un volumen total idéntico con el diluyente en la etapa 3. Preferentemente, como se muestra en el esquema de la Fig. 1, el volumen total se añade hasta aproximadamente 850 ul.

Figura 2:

Curvas de crecimiento de las amplificaciones de los ácidos nucleico diana procedentes de HIV, HBV y CT realizadas en un LightCycler480 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DE) como se describe en el Ejemplo 1. La "señal" indicada en el eje y es una señal fluorescente normalizada. El eje x muestra el número de ciclos respectivos de la PCR.

Las curvas de crecimiento de HIV y HBV se muestran junto con las curvas de crecimiento del ácido nucleico de control interno correspondiente. Las curvas de ácido nucleico diana respectivas se representan con líneas rectas, las curvas de ácido nucleico de control con líneas de puntos.

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

Fig. 2b: ensayo HIV cualitativo medido en el canal para la detección de la sonda de control.

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

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

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

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

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

Figura 3:

Vista en perspectiva de la placa de procesamiento.

Figura 4:

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

Figura 5:

Vista superior de la placa de procesamiento.

Figura 6:

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

Figura 7:

Una vista parcial de la vista transversal.

Figura 8:

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

Figura 9:

a) a d) muestran diferentes vistas de la segunda realización de la estación de separación magnética.

Figura 10:

(a) a (c) muestran una vista de la primera realización de la estación de separación magnética sujetando la placa de procesamiento, 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 esquemáticos de un analizador que comprende diferentes estaciones, módulos o celdas.

Figura 12:

Muestra un sistema analítico de la presente invención.

Figura 13:

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

5 Figura 14:

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

Figura 15:

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

Figura 16:

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

Figura 17:

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

**Ejemplos**

15 Los siguientes ejemplos describen una realización en la que puede llevarse a cabo la invención. Para un experto en la materia está claro que estos ejemplos no están limitados y que pueden modificarse sin alejarse del espíritu de la divulgación.

20 Ejemplo 1:

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

25 En resumen, en la realización representada, se realiza PCR en tiempo real simultáneamente y en las mismas condiciones en un panel de diversas dianas diferentes que comprende bacterias (*Chlamydia trachomatis*, CT) así como un virus de ADN (HBV) y un virus de ARN (HIV). Todas las muestras se procesaron y analizaron en el mismo experimento, es decir, en la misma placa de pocillos profundos (para la separación de las muestras) o en una placa multipocillo (para la amplificación y la detección), respectivamente.

30 Se prepararon las siguientes muestras y posteriormente se analizaron:

| Reactivo                               | Fabricante: |
|--|-------------|
| HIV-1M Patrón Secundario, 50.000 cp/ml | Roche       |
| HBV Patrón Secundario, 400 UI/ml       | Roche       |
| CT (ADN POS CTL pCHL-1)                | Roche       |

35 El experto en la técnica dispone de patrones adecuados o de otros tipos de dianas.

Los instrumentos indicados en la siguiente tabla se usaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante respectivo.

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

40 Para la preparación de las muestras se usaron los siguientes reactivos como diluyentes:

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

45 Se prepararon las siguientes diluciones por adelantado y se conservaron durante una noche (diluciones en plasma a una temperatura de -60 a -90 °C, diluciones PreservCyt a 2-8 °C):

## ES 2 606 688 T3

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

Cada muestra respectiva (500 ul) y cada diluyente de espécimen respectivo (350 ul) se pipetearon manualmente a una placa de pocillos profundos, en la que cada muestra se añadió a tres pocillos diferentes para realizar análisis por triplicado. A cada pocillo que contenía una muestra de HIV o HBV, se añadieron manualmente 50 ul de un ácido nucleico de control interno. Para el ensayo HIV cualitativo, se añadió un ARN que servía como un control cualitativo (100 partículas blindadas/muestra). Para el ensayo HIV cuantitativo, se añadió un ARN que servía como un patrón cuantitativo (500 partículas blindadas/muestra). Para el ensayo HBV cuantitativo, se añadió un ADN que servía como un patrón cuantitativo (1E4 copias/muestra). La secuencia de dichos ácidos nucleicos de control era idéntica en todos los casos y se seleccionó del grupo de SEQ ID NOs: 45-48.

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

| Tampón de Conservación IC/IQS | Conc. o pH |
|-------------------------------|------------|
| Tris (mM)                     | 10         |
| EDTA (mM)                     | 0,1        |
| Azida Sódica (p/v, %)         | 0,05       |
| ARN poli rA (mg/l)            | 20         |
| pH                            | 8          |

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

| Reactivo Proteasa      | Conc. o pH |
|------------------------|------------|
| Tris (mM)              | 10         |
| EDTA (mM)              | 1          |
| Cloruro de Calcio (mM) | 5          |
| Acetato de Calcio (mM) | 5          |
| Esperasa (mg/ml)       | 80         |
| Glicerina (p/v, %)     | 50         |
| pH                     | 5,5        |

| Reactivo MGP           | Conc. o pH |
|------------------------|------------|
| Polvo MPG (mg/ml)      | 60         |
| Tris (mM)              | 30         |
| Metilparabeno (p/v, %) | 0,1        |
| Azida Sódica (p/v, %)  | 0,095      |
| pH                     | 8,5        |

ES 2 606 688 T3

|                             |            |
|-----------------------------|------------|
| Reactivo de Lisis           | Conc. o pH |
| Tiocianato de Guanidina (M) | 4          |
| Citrato de Sodio (mM)       | 50         |
| Polidocanol (p/v, %)        | 5          |
| Ditiotreitol (p/v, %)       | 2          |
| pH                          | 5,8        |

|                        |            |
|------------------------|------------|
| Tampón de Lavado       | Conc. o pH |
| Citrato de Sodio (mM)  | 7,5        |
| Metilparabeno (p/v, %) | 0,1        |
| pH                     | 4,1        |

|                        |            |
|------------------------|------------|
| Tampón de Elución      | Conc. o pH |
| Tris (mM)              | 30         |
| Metilparabeno (p/v, %) | 0.2        |
| pH                     | 8,5        |

- 5 Después de la etapa final, el cabezal del aparato Star Hamilton del proceso añadió a cada pocillo las mezclas de reacción (Mreac.) respectivas que contenían los reactivos de amplificación, se mezclaron los líquidos que contenían los ácidos nucleicos aislados con las Mreac. y cada mezcla resultante se transfirió a un pocillo correspondiente de una placa de micropocillos en la que se realizó la amplificación.
- 10 Se utilizaron las siguientes mezclas de reacción (consistiendo cada una de ellas en dos reactivos R1 y R2):  
Para HIV:

| Reactivo R1   | Concentración/ 50 µl-PCR [µM] |
|---|-------------------------------|
| Agua (de calidad PCR)   |                               |
| Mn(Ac) <sub>2</sub> * 4H <sub>2</sub> O (pH 6,1 ajustado con Ácido Acético) | 3'000                         |
| NaN3/Ri, tamponado con Tris 10 mM a pH7 [%]                                 | 0,018                         |
| Reactivo R2   | Concentración/50 µl-PCR [µM]  |
| DMSO [%]  | 5,000 %                       |
| NaN3/Ri, tamponado con Tris 10 mM a pH7 [%]                                 | 0,027 %                       |
| Acetato de potasio pH 7,0   | 110'000                       |
| Glicerol [%]  | 3,000 %                       |
| Tricina pH 8,0  | 50'000                        |
| Igepal [%]  | 0,024 %                       |
| dGTP  | 337,5                         |
| dATP  | 337,5                         |
| dCTP  | 337,5                         |
| dUTP  | 675                           |
| Cebadores/sondas seleccionados de las SEQ ID NO 1-35                        | 0,1-0,15                      |
| SEQ ID NO 42  | 0,1                           |

ES 2 606 688 T3

| Reactivo R2          | Concentración/50 µl-PCR [µM] |
|----------------------|------------------------------|
| SEQ ID NO 43         | 0,1                          |
| SEQ ID NO 44         | 0,1                          |
| Uracil-N-Glicosilasa | 10 (U/reacción)              |
| Polimerasa Z05-D     | 40 (U/reacción)              |
| Aptámero NTQ21-46A   | 0,222                        |
| Agua                 |                              |

Para HBV:

| Reactivo R2          | Concentración/50 ml-PCR |              |
|----------------------|-------------------------|--------------|
| H2O                  | 100                     | %            |
| Tricina 7,7          | 40                      | mM           |
| Tween                | 0,03                    | % (v/v)      |
| Glicerol             | 5                       | % (v/v)      |
| KOH                  | 25,2                    | mM           |
| KOAc                 | 121,8                   | mM           |
| NTQ21-46A (Aptámero) | 0,2625                  | uM           |
| dGTP                 | 0,42                    | uM           |
| dATP                 | 0,42                    | uM           |
| dCTP                 | 0,42                    | uM           |
| dUTP                 | 0,84                    | uM           |
| SEQ ID NO 36         | 1,2                     | uM           |
| SEQ ID NO 37         | 0,1                     | uM           |
| SEQ ID NO 38         | 1,2                     | uM           |
| SEQ ID NO 42         | 0,6                     | uM           |
| SEQ ID NO 43         | 0,6                     | uM           |
| SEQ ID NO 44         | 0,15                    | uM           |
| Polimerasa Z05D      | 35                      | (U/reacción) |
| Uracil-N-Glicosilasa | 2                       | (U/reacción) |
| Azida Sódica         | 0,027                   | % (m/v)      |
|                      |                         |              |
|                      |                         |              |
| Reactivo R1          | Concentración/50 ml-PCR |              |
| H2O                  | 100                     | %            |
| MgOAc                | 2,5                     | mM           |
| MnOAc pH6,1          | 2,5                     | mM           |
| Azida Sódica         | 0,018                   | % (m/v)      |

## ES 2 606 688 T3

Para CT:

| Reactivo R1  | Concentración/50 ml-PCR |
|--|-------------------------|
| Agua (de calidad PCR)  |                         |
| Mn(Ac) <sub>2</sub> (pH 6,5 en Ácido Acético Glacial 0,002% (V/V)) | 2,7 mM                  |
| NaN <sub>3</sub>   | 0,0135 % (p/v)          |
|  |                         |
| Reactivo R2  | Concentración/50 µl-PCR |
| NaN <sub>3</sub> /Ri, tamponado con Tris 10 mM a pH7 [%]           | 0,0315 %                |
| Acetato de potasio   | 112,4 mM                |
| Glicerol [%]   | 3,5%                    |
| Tricina  | 61 mM                   |
| Hidróxido de potasio   | 28,4 mM                 |
| dGTP   | 525 uM                  |
| dATP   | 525 uM                  |
| dCTP   | 525 uM                  |
| dUTP   | 1,05 mM                 |
| SEQ ID NO 39   | 750 nM                  |
| SEQ ID NO 40   | 600 nM                  |
| SEQ ID NO 41   | 116 nM                  |
| Aptámero NTQ-46A   | 175 nM                  |
| Uracil-N-Glicosilasa   | 5 U/reacción            |
| Z05-D Polimerasa   | 31 U/reacción           |

5 Para la amplificación y la detección, la placa de micropocillos se selló con un sellador de placa automático (véase anteriormente) y la placa se transfirió a un LightCycler 480 (véase anteriormente).

Se usó el siguiente perfil de PCR:

Perfil de termociclado

| Nombre del Programa | Diana (°C) | Modo de Adquisición | Tiempo (hh:mm:ss) | Índice de Rampa (°C/s) | 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         | Sencillo            | 00:00:30          | 2,2                    |        |                  |
| 2ª Medición         | 91         | Ninguno             | 00:00:05          | 4,4                    | 45     | Cuantificación   |
|                     | 58         | Sencillo            | 00:00:25          | 2,2                    |        |                  |
| Enfriamiento        | 40         | Ninguno             | 00:02:00          | 2,2                    | 1      | Ninguno          |

Formato de Detección (Manual)

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

5 El programa Pre-PCR comprende desnaturalización inicial e incubación a 55, 60 y 65 °C para la transcripción inversa de los moldes de ARN. La incubación a tres temperaturas combina los efectos ventajosos de que a temperaturas más bajas, también se transcriben secuencias diana ligeramente mal emparejadas (tales como variantes genéticas de un organismo), mientras que a temperaturas más altas la formación de estructuras secundarias de ARN se suprime, conduciendo de este modo a una transcripción más eficaz.

10 El ciclado de la PCR se divide en dos mediciones, en el que ambas mediciones aplican una configuración de una etapa (combinación de hibridación y extensión). Los 5 primeros ciclos a 55 °C permiten un aumento de la inclusividad por pre-amplificación de secuencias diana ligeramente mal emparejadas, mientras que los 45 ciclos de la segunda medición proporcionan un aumento de especificidad usando una temperatura de hibridación/extensión de 58 °C.

15 Usando este perfil en todas las muestras comprendidas en la placa de micropocillos mencionada anteriormente, se realizó la amplificación y la detección en todas las muestras, como se representa en la Fig. 2. Esto muestra que la preparación de las muestras antes de la amplificación también se realizó de un modo satisfactorio.

20 En la Fig. 2 se representan por separado, para mayor claridad, los resultados para los controles internos HIV cualitativos y cuantitativos y para el control interno HBV cuantitativo. Puede observarse que, en todos los casos, los controles también se amplificaron satisfactoriamente. La cuantificación de las dianas HIV y HBV en la configuración cuantitativa se calculó por comparación con el ácido nucleico de control interno que servía como un patrón cuantitativo.

25 **Ejemplo 2**

El proceso de amplificación genérico descrito anteriormente en el presente documento se realizó en una serie de diferentes ácidos nucleico diana en experimentos distintos pero en las mismas condiciones. El aislamiento del ácido nucleico respectivo se realizó como se describe en el Ejemplo 1.

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

35 En todas las dianas se usó el siguiente perfil de PCR:

|             |                                | Diana (°C) | Modo de Adquisición | Meseta [hh:mm:ss] | Medición [hh:mm:ss] | Índice de Rampa [°C/s] |
|-------------|--------------------------------|------------|---------------------|-------------------|---------------------|------------------------|
| Pre-PCR     | Etapa UNG                      | 50         | ninguno             | 00:02:00          | 00:00:00            | 2,2                    |
|             | UNG/Desnaturalización de Molde | 94         | ninguno             | 00:00:05          | 00:00:00            | 4,4                    |
|             | Etapa 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                             | sencillo   | 00:00:30            | 00:00:08          | 2,2                 |                        |
| 2ª Medición | 91                             | ninguno    | 00:00:05            | 00:00:00          | 4,4                 |                        |
|             | 58                             | sencillo   | 00:00:25            | 00:00:08          | 2,2                 |                        |

ES 2 606 688 T3

|              | Diana (°C) | Modo de Adquisición | Meseta [hh:mm:ss] | Medición [hh:mm:ss] | Índice de Rampa [°C/s] |
|--------------|------------|---------------------|-------------------|---------------------|------------------------|
| Enfriamiento | 40         | ninguno             | 00:02:00          | 00:00:00            | 2,2                    |

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

En detalle, se realizó los siguientes experimentos:

5 1. Análisis múltiple cualitativo de HBV, HCV y HIV

a. Mezcla de reacción

R1:

10

|  | Conc. en 50 ul-PCR [uM] |
|--|-------------------------|
| Mn(Ac) <sub>2</sub> *4H <sub>2</sub> O (pH 6,1 ajustado con Ácido Acético) | 3.300                   |
| NaN <sub>3</sub> /Ri, tamponado con Tris 10 mM a pH7                       | 0,018                   |
|  | pH: 6,41                |

R2:

| Reactivo  | Conc. en 50 ul-PCR (uM) |
|---|-------------------------|
| DMSO (%)  | 5,4                     |
| NaN <sub>3</sub> /Ri, tamponado con Tris 10 mM a pH7  | 0,027                   |
| KOAc (pH 7,0)   | 120'000                 |
| Glicerol (%)  | 3                       |
| Tween 20 (%)  | 0,015                   |
| Tricina pH 8,0  | 60'000                  |
| Aptámero NTQ21-46A                                    | 0,2222                  |
| Uracil-N-Glicosilasa (U/ul)                           | 0,2                     |
| dGTP  | 400,0                   |
| dATP  | 400,0                   |
| dCTP  | 400,0                   |
| dUTP  | 800,0                   |
| Polimerasa ZO5-D (U/ul)*                              | 0,9                     |
| Cebadores/sondas seleccionados de las SEQ ID NO 1-35  | 0,125-0,3               |
| SEQ ID NO 36  | 0,100                   |
| SEQ ID NO 37  | 0,100                   |
| SEQ ID NO 38  | 0,150                   |
| Cebadores/sondas seleccionados de las SEQ ID NO 60-76 | 0,050-0,250             |

|              |                         |
|--------------|-------------------------|
| Reactivo     | Conc. en 50 ul-PCR (uM) |
| SEQ ID NO 42 | 0,200                   |
| SEQ ID NO 43 | 0,200                   |
| SEQ ID NO 44 | 0,100                   |

Sensibilidad analítica/LDD

5 Para cada virus detectado (grupo M HIV-1, grupo O HIV-1, HIV-2, HBV y HCV), a diversas concentraciones/niveles a y aproximadamente el LDD esperado para plasma EDTA. Se ensayó un panel por virus y concentración con al menos 20 copias válidas por concentración. El LDD se determinó mediante análisis de PROBIT (véanse las Tablas 1-5).

10 HIV

Tabla 1: grupo M HIV-1 índices de acierto y LDD Probit de panel individual

| Concentración  | Número de copias | Número de positivos | Índice de acierto |
|--|------------------|---------------------|-------------------|
| 32 cp/ml   | 21               | 21                  | 100 %             |
| 16 cp/ml   | 21               | 21                  | 100 %             |
| 8 cp/ml  | 21               | 21                  | 100 %             |
| 4 cp/ml  | 21               | 20                  | 95 %              |
| 2 cp/ml  | 21               | 15                  | 71 %              |
| 1 cp/ml  | 21               | 9                   | 43 %              |
| 0 cp/ml (control negativo)                               | 12               | 0                   | 0 %               |
| LDD por análisis PROBIT (índice de acierto 95 %)         |                  |                     | 4,06 cp/ml        |
| Intervalo de confianza 95 % para LDD por análisis PROBIT |                  |                     | 2,85-9,24 cp/ml   |

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

$$Título \left( en \frac{UI}{ml} \right) = \frac{Título \left( en \frac{cp}{ml} \right)}{0,6}$$

15

Por lo tanto, el LDD del Grupo M HIV-1 en UI/ml es

LDD por análisis PROBIT (índice de acierto 95 %): 6,77 UI/ml  
 Intervalo de confianza 95 % para LDD por análisis PROBIT: 4,75 - 15,4 UI/ml

20

Tabla 2: índices de acierto Grupo O HIV-1 y LDD Probit de panel individual

| Concentración | Número de copias | Número de positivos | Índice de acierto |
|---------------|------------------|---------------------|-------------------|
|               | 21               | 21                  | 100 %             |
|               | 20               | 20                  | 100 %             |
|               | 21               | 21                  | 100 %             |
|               | 21               | 19                  | 90 %              |
|               | 21               | 15                  | 71 %              |
|               | 21               | 12                  | 57 %              |
|               | 12               | 0                   | 0                 |

## ES 2 606 688 T3

| Concentración  | Número de copias | Número de positivos | Índice de acierto |
|--|------------------|---------------------|-------------------|
| LDD por análisis PROBIT (índice de acierto 95 %)         |                  |                     | 14,9 cp/ml        |
| Intervalo de confianza 95 % para LDD por análisis PROBIT |                  |                     | 10,9-31,5 cp/ml   |

El título del Patrón Primario para el Grupo O HIV-1 se reasignó al panel de Grupo O CBER HIV-1; el factor de cálculo es 0,586.

5 Por lo tanto el LDD del Grupo O HIV-1 es

LDD por análisis PROBIT (índice de acierto 95 %): 8,8 cp/ml  
Intervalo de confianza 95 % para LDD por análisis PROBIT: 6,4 - 18,5 cp/ml

Tabla 3: Índices de acierto de HIV-2 y LDD Probit de panel individual

| Concentración  | Número de copias | Número de positivos | Índice de acierto |
|--|------------------|---------------------|-------------------|
| 4 cp/ml  | 21               | 21                  | 100 %             |
| 2 cp/ml  | 21               | 21                  | 100 %             |
| 1 cp/ml  | 21               | 20                  | 95 %              |
| 0,5 cp/ml  | 21               | 13                  | 62 %              |
| 0,25 cp/ml   | 21               | 13                  | 62 %              |
| 0,125 cp/ml  | 21               | 7                   | 33 %              |
| 0 cp/ml (control negativo)                               | 12               | 0                   | 0 %               |
| LDD por análisis PROBIT (índice de acierto 95 %)         |                  |                     | 1,29 cp/ml        |
| Intervalo de confianza 95 % para LDD por análisis PROBIT |                  |                     | - 3,11 cp/ml      |

10 El título para el Patrón Primario para HIV-2 se reasignó al panel HIV-2 CBER; el factor de cálculo es 26,7.

Por lo tanto el LDD de HIV-2 es

LDD por análisis PROBIT (índice de acierto 95 %): 34,44 cp/ml  
Intervalo de confianza 95 % para LDD por análisis PROBIT: 21,89- 83,04 cp/ml

15 HBV

Tabla 4: Índices de acierto de HBV y LDD Probit de panel individual

| Concentración  | Número de copias | Número de positivos | Índice de acierto |
|--|------------------|---------------------|-------------------|
| 7,6 UI/ml  | 21               | 21                  | 100 %             |
| 3,8 UI/ml  | 21               | 21                  | 100 %             |
| 1,9 UI/ml  | 21               | 20                  | 95 %              |
| 0,95 UI/ml   | 21               | 14                  | 67 %              |
| 0,6 UI/ml  | 19               | 12                  | 63 %              |
| 0,4 UI/ml  | 21               | 12                  | 57 %              |
| 0 UI/ml (control negativo)                               | 12               | 0                   | 0 %               |
| LDD por análisis PROBIT (índice de acierto 95 %)         |                  |                     | 2,27 UI/ml        |
| Intervalo de confianza 95 % para LDD por análisis PROBIT |                  |                     | 1,48-6,54 UI/ml   |

HCV

Tabla 5: Índices de acierto de HCV y LDD Probit de panel individual

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

## 5 2. Análisis cualitativo de WNV

Mezclas de reacción

R1:

10

| Reactivo   | Conc. en PCR 50 ul [uM] |
|--|-------------------------|
| Mn(Ac) <sub>2</sub> *4H <sub>2</sub> O (pH 6,1 ajustado con Ácido Acético) | 3.300                   |
| NaN <sub>3</sub> /Ri, tamponado con Tris 10 mM a pH7                       | 0,018                   |
|  | pH: 6,41                |

R2:

| Reactivo  | Conc. en PCR 50 ul (uM) |
|---|-------------------------|
| DMSO (%)  | 5,4                     |
| NaN <sub>3</sub> /Ri, tamponado con Tris 10 mM a pH7  | 0,027                   |
| Acetato sódico pH 7,0                                 | 120'000                 |
| Glicerol (%)  | 3                       |
| Tween 20 (%)  | 0,015                   |
| Tricina pH 8,0  | 60'000                  |
| Aptámero NTQ21-46A                                    | 0,2222                  |
| Uracil-N-Glicosilasa (U/ul)                           | 0,2                     |
| dGTP  | 400,0                   |
| dATP  | 400,0                   |
| dCTP  | 400,0                   |
| dUTP  | 800,0                   |
| Polimerasa Z05-D (U/ul)*                              | 0,9                     |
| Cebadores/sondas seleccionados de las SEQ ID NO 53-59 | 0,08-0,4                |
| SEQ ID NO 42  | 0,150                   |

|              |                         |
|--------------|-------------------------|
| Reactivo     | Conc. en PCR 50 ul (uM) |
| SEQ ID NO 43 | 0,150                   |
| SEQ ID NO 44 | 0,100                   |

Sensibilidad analítica/LDD

- 5 Para los virus (WNV, SLEV y JEV) se preparó un panel independiente como una serie de dilución de los patrones respectivos que incluían diversas concentraciones/niveles a y aproximadamente el LDD esperado. Se ensayó un panel por virus y concentración con al menos 20 copias válidas por concentración. El LDD se determinó por análisis PROBIT.

Tabla 6: índices de acierto WNV y LDD Probit para panel individual

| Concentración  | Número de copias | Número de positivos | Índice de acierto |
|--|------------------|---------------------|-------------------|
| 20 cp/ml   | 21               | 21                  | 100 %             |
| 12 cp/ml   | 21               | 21                  | 100 %             |
| 8 cp/ml  | 21               | 21                  | 100 %             |
| 5 cp/ml  | 21               | 17                  | 81 %              |
| 2,5 cp/ml  | 21               | 15                  | 71,4 %            |
| 0,5 cp/ml  | 21               | 1                   | 4,8 %             |
| 0 cp/ml (control negativo)                               | 12               | 0                   | 0 %               |
| LDD por análisis PROBIT (índice de acierto 95 %)         |                  |                     | 6,57 cp/ml        |
| Intervalo de confianza 95 % para LDD por análisis PROBIT |                  |                     | 4,74-11,03 cp/ml  |

10

Tabla 7: índices de acierto SLEV y LDD Probit para panel individual

| Concentración  | Número de copias | Número de positivos | Índice de acierto  |
|--|------------------|---------------------|--------------------|
| 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 %                |
| LDD por análisis PROBIT (índice de acierto 95 %)         |                  |                     | 78,9 cp/ml         |
| Intervalo de confianza 95 % para LDD por análisis PROBIT |                  |                     | 55,4 – 145,7 cp/ml |

Tabla 8: índices de acierto JEV y LDD Probit para panel individual

| Concentración | Número de copias | Número de positivos | Índice de acierto |
|---------------|------------------|---------------------|-------------------|
| 20 cp/ml      | 21               | 20                  | 95,2 %            |
| 12 cp/ml      | 21               | 20                  | 95,2 %            |
| 8 cp/ml       | 21               | 18                  | 85,7 %            |
| 5 cp/ml       | 21               | 17                  | 81,0 %            |

## ES 2 606 688 T3

|  |    |    |                 |
|--|----|----|-----------------|
| 2,5 cp/ml  | 21 | 14 | 66,7 %          |
| 0,5 cp/ml  | 21 | 2  | 9,52 %          |
| 0 cp/ml (control negativo)                               | 12 | 0  | 0 %             |
| LDD por análisis PROBIT (Índice de acierto 95 %)         |    |    | 13.55 cp/ml     |
| Intervalo de confianza 95 % para LDD por análisis PROBIT |    |    | 8.78-27.7 cp/ml |

### 3. Análisis cuantitativo de HBV

#### Mezclas de reacción

5

R1:

| Reactivo   | Conc. Final en PCR 50 ul (uM) |
|--|-------------------------------|
| Mn(Ac) <sub>2</sub> *4H <sub>2</sub> O (pH 6,1 ajustado con Ácido Acético) | 3.300                         |
| NaN <sub>3</sub> /Ri, tamponado con Tris 10 mM a pH7                       | 0,018                         |
|  | pH: 6,41                      |

R2:

10

| Reactivo             | Conc. Final en PCR 50 ul (uM) |
|----------------------|-------------------------------|
| Glicerol (% p/v)     | 3 %                           |
| Tricina              | 60 mM                         |
| DMSO (% v/v)         | 5,4 %                         |
| KOAc                 | 120 mM                        |
| Tween 20 (v/v)       | 0,015 %                       |
| Aptámero NTQ21-46 A  | 0,222 µM                      |
| Polimerasa ZO5D      | 0,9 U/µl (45 U/rxn)           |
| Uracil-N-Glicosilasa | 0,2 U/µl (10 U/rxn)           |
| Azida Sódica (p/v)   | 0,027 %                       |
| 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/LDD

15 Se prepararon cuatro paneles de dilución con Patrón Secundario HBV (que representaba el Genotipo A), es decir, dos en suero negativo a HBV para de volúmenes de entrada de muestra de 20 µl y 500 µl y dos en plasma EDTA

negativo a HBV para volúmenes de entrada de muestra de 200 µl y 500 µl. Cada panel incluía 7 niveles de concentración a y aproximadamente el LDD esperado. Se ensayó un panel por matriz con ≥21 copias por nivel de concentración. Era preciso que al menos 20 copias fuesen válidas. El LDD se determinó por análisis PROBIT a un índice de acierto de 95% y mediante análisis de índice de acierto de ≥ 95%.

5

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

| Concentración  | Número de copias | Número de positivos | Índice de acierto |
|--|------------------|---------------------|-------------------|
| 25 UI/ml   | 41               | 41                  | 100 %             |
| 15 UI/ml   | 41               | 39                  | 95,1 %            |
| 10 UI/ml   | 41               | 40                  | 97,6 %            |
| 7 UI/ml  | 41               | 40                  | 97,6 %            |
| 4 UI/ml  | 24               | 20                  | 83,3 %            |
| 1 UI/ml  | 24               | 4                   | 16,7 %            |
| 0 UI/ml (control negativo)   | 24               | 0                   | 0 %               |
| LDD por análisis PROBIT (índice de acierto 95 %)   |                  |                     | 8,2 UI/ml         |
| Intervalo de confianza 95 % para LDD por análisis PROBIT                                       |                  |                     | 4,8-26,0 UI/ml    |
| * Se ensayaron copias adicionales para estrechar el intervalo de confianza del 95 % observado. |                  |                     |                   |

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

| Concentración  | Número de copias | Número de positivos | Índice de acierto |
|--|------------------|---------------------|-------------------|
| 10 UI/ml   | 21               | 21                  | 100 %             |
| 7 UI/ml  | 21               | 21                  | 100 %             |
| 4 UI/ml  | 21               | 21                  | 100 %             |
| 2,5 UI/ml  | 21               | 20                  | 95,2 %            |
| 1 UI/ml  | 21               | 14                  | 66,7 %            |
| 0,2 UI/ml  | 21               | 1                   | 4,8 %             |
| 0 UI/ml (control negativo)                               | 21               | 0                   | 0 %               |
| LDD por análisis PROBIT (índice de acierto 95 %)         |                  |                     | 2,3 UI/ml         |
| Intervalo de confianza 95 % para LDD por análisis PROBIT |                  |                     | 1,6-4,2 UI/ml     |

10

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

| Concentración              | Número de copias | Número de positivos | Índice de acierto |
|----------------------------|------------------|---------------------|-------------------|
| 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 %               |

| Concentración  | Número de copias | Número de positivos | Índice de acierto |
|--|------------------|---------------------|-------------------|
| LDD por análisis PROBIT (índice de acierto 95 %)         |                  |                     | 9,4 UI/ml         |
| Intervalo de confianza 95 % para LDD por análisis PROBIT |                  |                     | 6,2-19,0 UI/ml    |

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

| Concentración  | Número de copias | Número de positivos | Índice de acierto |
|--|------------------|---------------------|-------------------|
| 10 UI/ml   | 21               | 21                  | 100 %             |
| 7 UI/ml  | 21               | 21                  | 100 %             |
| 4 UI/ml  | 21               | 21                  | 100 %             |
| 2,5 UI/ml  | 21               | 16                  | 76,2 %            |
| 1 UI/ml  | 21               | 16                  | 76,2 %            |
| 0,2 UI/ml  | 21               | 7                   | 33,3 %            |
| 0 UI/ml (control negativo)                               | 21               | 0                   | 0 %               |
|  |                  |                     |                   |
| LDD por análisis PROBIT (índice de acierto 95 %)         |                  |                     | 4,1 UI/ml         |
| Intervalo de confianza 95 % para LDD por análisis PROBIT |                  |                     | 2,4-10,0 UI/ml    |

Resumen LDD:

5 Plasma EDTA: El análisis PROBIT a un índice de acierto de 95 % dio como resultado un LDD de 8,2 UI/ml para un volumen de entrada de muestra de 200 µl y 2,3 UI/ml para un volumen de entrada de muestra de 500 µl para plasma EDTA.

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

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

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

Linealidad

20 Usando el genotipo A del HBV (proporcionado por RMD Research Pleasanton, plásmido linealizado, pHBV-PC\_ADW2) se preparó un panel de plasma EDTA y un panel de suero. Cada uno de los paneles se analizó a 12 niveles de concentración para la determinación del rango dinámico esperado (4-2E + 09 UI/ml) del ensayo. Todos los niveles de concentración/miembros de los paneles (MP) se ensayaron en 21 copias.

25 Este estudio se realizó con un volumen de entrada de muestra de 500 µl. Los niveles de concentración se seleccionaron de la siguiente manera: un nivel por debajo del Límite de Cuantificación Inferior (LDCl) esperado, uno al LDQI esperado, uno por encima del LDQI esperado, diversas concentraciones a niveles intermedios, al límite de cuantificación superior (LDQS) esperado y uno por encima del LDQS esperado:

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

MP 11 - 1,0E + 09 UI/ml - al LDQS esperado

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

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

MP 8 - 1,0E + 06 UI/ml - nivel de concentración intermedio

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

## ES 2 606 688 T3

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

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

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

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

10 MP 3 - 5,0E + 01 UI/ml – por encima del LDQI esperado

MP 2 - 1,0E + 01 UI/ml – al LDQI esperado

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

Para cada muestra válida del panel de linealidad, el título del ADN del HBV observado se transformó a un título de log10 y el título de log10 medio se calculó por nivel de concentración.

20 **Tabla 13: linealidad en plasma EDTA**

| Título nominal (UI/ml) | Título asignado (UI/ml) | Título Log10 asignado | Título Log 10 medio observado | Copias |
|------------------------|-------------------------|-----------------------|-------------------------------|--------|
| 4,00E+00               | 3,50E+00                | 0,54                  | 0,52                          | 17     |
| 1,00E+01               | 8,70E+00                | 0,94                  | 0,91                          | 21     |
| 5,00E+01               | 4,40E+01                | 1,64                  | 1,69                          | 21     |
| 1,00E+02               | 8,70E+01                | 1,94                  | 2,04                          | 21     |
| 1,00E+03               | 8,70E+02                | 2,94                  | 3,01                          | 21     |
| 1,00E+04               | 8,70E+03                | 3,94                  | 3,9                           | 21     |
| 1,00E+05               | 8,70E+04                | 4,94                  | 4,88                          | 21     |
| 1,00E+06               | 8,70E+05                | 5,94                  | 5,87                          | 21     |
| 1,00E+07               | 8,70E+06                | 6,94                  | 6,92                          | 21     |
| 1,00E+08               | 8,70E+07                | 7,94                  | 8,01                          | 21     |
| 1,00E+09               | 8,70E+08                | 8,94                  | 9,04                          | 21     |
| 2,00E+09               | 1,70E+09                | 9,24                  | 9,38                          | 21     |

En la Fig. 13 se muestra una representación gráfica de estos resultados.

**Tabla 14: Linealidad en suero**

| Título nominal (UI/ml) | Título asignado (UI/ml) | Título Log10 asignado | Título Log 10 medio observado | Copias |
|------------------------|-------------------------|-----------------------|-------------------------------|--------|
| 4,00E+00               | 3,30E+00                | 0,52                  | 0,7                           | 21     |
| 1,00E+01               | 8,30E+00                | 0,92                  | 0,99                          | 21     |
| 5,00E+01               | 4,10E+01                | 1,62                  | 1,73                          | 21     |
| 1,00E+02               | 8,30E+01                | 1,92                  | 2,03                          | 21     |
| 1,00E+03               | 8,30E+02                | 2,92                  | 2,93                          | 21     |
| 1,00E+04               | 8,30E+03                | 3,92                  | 3,8                           | 21     |
| 1,00E+05               | 8,30E+04                | 4,92                  | 4,78                          | 21     |
| 1,00E+06               | 8,30E+05                | 5,92                  | 5,75                          | 21     |
| 1,00E+07               | 8,30E+06                | 6,92                  | 6,73                          | 21     |
| 1,00E+08               | 8,30E+07                | 7,92                  | 7,78                          | 21     |

## ES 2 606 688 T3

| Título nominal (UI/ml) | Título asignado (UI/ml) | Título Log10 asignado | Título Log 10 medio observado | Copias |
|------------------------|-------------------------|-----------------------|-------------------------------|--------|
| 1,00E+09               | 8,30E+08                | 8,92                  | 8,92                          | 21     |
| 2,00E+09               | 1,70E+09                | 9,22                  | 9,22                          | 21     |

En la Fig. 14 se muestra una representación gráfica de estos resultados.

Resumen de linealidad:

5 El rango lineal, definido como el rango de concentración para el cual la desviación log10 de los títulos log10 medios observados está dentro de  $\pm 0,3$  del título nominal log10 se determinó como: 3,5E+00 UI/ml – 1,7E+ 09 UI/ml para plasma EDTA y 3,E+00 UI/ml – 1,7E+09 UI/ml para suero. Se encontró que el Límite de Cuantificación Inferior era: 4,0E+00 UI/ml para plasma EDTA y suero.

10 4. Análisis cuantitativo de HCV

Mezcla de reacción

R1:

| Reactivo   | Conc. Final en PCR 50 ul (uM) |
|--|-------------------------------|
| Mn(Ac)2 * 4H2O (pH 6,1 ajustado con Ácido Acético) | 3'300                         |
| NaN3/Ri, tamponado con Tris 10 mM a pH7            | 0,018                         |
|  | pH: 6,41                      |

15

R2:

| Reactivo  | Conc. Final en PCR 50 ul  |
|---|---------------------------|
| Glicerol (% , p/v)                                | 3 %                       |
| Tricina   | 60 mM                     |
| DMSO (% , v/v)                                    | 5,4 %                     |
| KOAc  | 120 mM                    |
| Tween 20 (v/v)                                    | 0,015 %                   |
| NTQ21-46 A  | 0,222 $\mu$ M             |
| ZO5D  | 0,9 U/ $\mu$ l (45 U/rxn) |
| UNG   | 0,2 U/ $\mu$ l (10 U/rxn) |
| Azida Sódica (p/v)                                | 0,027                     |
| dCTPs   | 400 $\mu$ M               |
| dGTPs   | 400 $\mu$ M               |
| dATPs   | 400 $\mu$ M               |
| dUTPs   | 800 $\mu$ M               |
| Cebadores/sondas seleccionados de SEQ ID NO 60-76 | 0,1 $\mu$ M               |
| SEQ ID NO 42                                      | 0,3 $\mu$ M               |
| SEQ ID NO 43                                      | 0,3 $\mu$ M               |
| SEQ ID NO 44                                      | $\mu$ M                   |

Sensibilidad analítica/LDD

Se preparó un panel de dilución con un Patrón Secundario HCV Roche en plasma EDTA negativo a HCV y en suero usando volúmenes de entrada de muestra de 200 µl y 500 µl. Cada nivel de concentración se ensayó con 21 copias. Al menos ≥ 20 copias tenían que ser válidas. El LDD se determinó por análisis PROBIT a un índice de acierto de 95 % y ≥ 95 % por análisis de índice de acierto.

5

Tabla 15: Índices de acierto y Probit con un volumen de entrada de proceso de muestra de 200 µl para plasma EDTA

| Concentración   | Número de copias | Número de positivos | Índice de acierto |
|---|------------------|---------------------|-------------------|
| 55 UI/ml  | 21               | 21                  | 100 %             |
| 38 UI/ml  | 21               | 21                  | 100 %             |
| 25 UI/ml  | 21               | 20                  | 95 %              |
| 12,5 UI/ml  | 21               | 19                  | 90 %              |
| 6 UI/ml   | 21               | 15                  | 71 %              |
| 3 UI/ml   | 21               | 6                   | 29 %              |
| 0 UI/ml (control negativo)                                  | 21               | 0                   | 0 %               |
|   |                  |                     |                   |
| LDD por análisis PROBIT (índice de acierto 95 %)            |                  |                     | 17,4 UI/ml        |
| Intervalo de confianza de 95 % para LDD por análisis PROBIT |                  |                     | 12,1-34,3 UI/ml   |

10

Tabla 16: Índices de acierto y Probit con un volumen de entrada de proceso de muestra de 500 µl para plasma EDTA

| Concentración   | Número de copias | Número de positivos | Índice de acierto |
|---|------------------|---------------------|-------------------|
| 22 UI/ml  | 21               | 21                  | 100 %             |
| 15 UI/ml  | 21               | 21                  | 100 %             |
| 10 UI/ml  | 20               | 20                  | 100 %             |
| 5 UI/ml   | 21               | 19                  | 76 %              |
| 2,5 UI/ml   | 21               | 15                  | 71 %              |
| 1 UI/ml   | 21               | 6                   | 57 %              |
| 0 UI/ml (control negativo)                                  | 21               | 0                   | 0 %               |
|   |                  |                     |                   |
| LDD por análisis PROBIT (índice de acierto 95 %)            |                  |                     | 9,0 UI/ml         |
| Intervalo de confianza de 95 % para LDD por análisis PROBIT |                  |                     | 5,5 – 25,4 UI/ml  |

Tabla 17: Índices de acierto y Probit con un volumen de entrada de proceso de muestra de 200 µl para suero

| Concentración              | Número de copias | Número de positivos | Índice de acierto |
|----------------------------|------------------|---------------------|-------------------|
| 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 %               |

| Concentración   | Número de copias | Número de positivos | Índice de acierto |
|---|------------------|---------------------|-------------------|
| LDD por análisis PROBIT (índice de acierto 95 %)            |                  |                     | 20,2 UI/ml        |
| Intervalo de confianza de 95 % para LDD por análisis PROBIT |                  |                     | 14,0-39,3 UI/ml   |

Tabla 18: Índices de acierto y Probit con un volumen de entrada de proceso de muestra de 500 µl para suero

| Concentración   | Número de copias | Número de positivos | Índice de acierto |
|---|------------------|---------------------|-------------------|
| 22 UI/ml  | 21               | 21                  | 100 %             |
| 15 UI/ml  | 21               | 21                  | 100 %             |
| 10 UI/ml  | 21               | 20                  | 95 %              |
| 5 UI/ml   | 21               | 18                  | 86 %              |
| 2,5 UI/ml   | 21               | 12                  | 57 %              |
| 1 UI/ml   | 21               | 4                   | 19 %              |
| 0 UI/ml (control negativo)                                  | 21               | 0                   | 0 %               |
| LDD por análisis PROBIT (índice de acierto 95 %)            |                  |                     | 8,2 UI/ml         |
| Intervalo de confianza de 95 % para LDD por análisis PROBIT |                  |                     | 5,8 – 15,0 UI/ml  |

Resumen LDD:

5 1. El análisis PROBIT a un índice de acierto de 95% dio como resultado un LDD de 17,4 UI/ml para un volumen de entrada de proceso de muestra de 200 µl y 9,0 UI/ml para un volumen de entrada de proceso de muestra de 500 µl de para plasma EDTA. El intervalo de confianza de 95% para estas concentraciones es de 12,1-34,3 UI/ml para un volumen de entrada de proceso de muestra de 200 µl y 5,5-25,4 UI/ml para un volumen de entrada de proceso de muestra de 500 µl.

10 2. Los valores del análisis PROBIT a un índice de acierto de 95% es de 20,2 UI/ml para un volumen de entrada de proceso de muestra de 200 µl y 8,2 UI/ml para un volumen de entrada de proceso de muestra de 500 µl para el suero. El intervalo de confianza de 95% para estas concentraciones es de 14,0-39,3 UI/ml para un volumen de entrada de proceso de muestra de 200 µl y 5,8-15,0 UI/ml para un volumen de entrada de proceso de muestra de 500 µl.

Linealidad

20 Se analizó una preparación de un panel de plasma EDTA y una preparación de un panel de suero de ARNa HCV trazable para la norma de la OMS del HCV. Se prepararon paneles de linealidad por dilución en serie y se analizaron a 10 concentraciones diferentes. El estudio se realizó con un volumen de entrada de proceso de muestra de 500 µl. Las concentraciones se seleccionaron de la siguiente manera: un nivel por debajo del Límite de Cuantificación Inferior (LDQI) esperado, uno al LDQI, uno por encima del LDQI, diversas concentraciones a niveles intermedios, al límite de cuantificación superior (LDQS) esperado y uno a o por encima del LDQS. Para todas las concentraciones se ensayaron 21 copias.

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

30 MP 2 - 1,0E+08 UI/ml - al LDQS esperado

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

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

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

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

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

## ES 2 606 688 T3

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

MP 9 - 1,0E+01 UI/ml – al LDQI esperado

5 MP 10 - 8,0E+00 UI/ml – por debajo del LDQI esperado

Tabla 19: linealidad en Plasma EDTA

| Título nominal (UI/ml) | Título asignado (UI/ml) | Título Log10 asignado | Título Log 10 medio observado | Copias |
|------------------------|-------------------------|-----------------------|-------------------------------|--------|
| 8,00E+00               | 4,87E+00                | 0,7                   | 0,6                           | 15     |
| 1,00E+01               | 6,09E+00                | 0,8                   | 0,8                           | 17     |
| 1,00E+02               | 6,09E+01                | 1,8                   | 1,7                           | 21     |
| 1,00E+03               | 6,09E+02                | 2,8                   | 2,8                           | 21     |
| 1,00E+04               | 6,09E+03                | 3,8                   | 3,8                           | 21     |
| 1,00E+05               | 6,09E+04                | 4,8                   | 4,7                           | 21/20  |
| 1,00E+06               | 6,09E+05                | 5,8                   | 5,6                           | 21/20  |
| 1,00E+07               | 6,09E+06                | 6,8                   | 6,7                           | 21     |
| 1,00E+08               | 6,09E+07                | 7,8                   | 7,8/7,7                       | 21/18  |
| 2,00E+08               | 1,22E+08                | 8,1                   | 8                             | 21/20  |

En la Fig. 15 se muestra una representación gráfica de estos resultados.

Tabla 20: linealidad en suero

| Título nominal (UI/ml) | Título asignado (UI/ml) | Título Log10 asignado | Título Log 10 medio observado | Copias |
|------------------------|-------------------------|-----------------------|-------------------------------|--------|
| 8,00E+00               | 3,90E+00                | 0,6                   | 0,7                           | 10     |
| 1,00E+01               | 4,96E+00                | 0,7                   | 0,7                           | 14     |
| 1,00E+02               | 4,96E+01                | 1,7                   | 1,6                           | 21     |
| 1,00E+03               | 4,96E+02                | 2,7                   | 2,8                           | 21     |
| 1,00E+04               | 4,96E+03                | 3,7                   | 3,7                           | 21     |
| 1,00E+05               | 4,96E+04                | 4,7                   | 4,7                           | 21     |
| 1,00E+06               | 4,96E+05                | 5,7                   | 5,7                           | 21     |
| 1,00E+07               | 4,96E+06                | 6,7                   | 6,7                           | 21     |
| 1,00E+08               | 4,96E+07                | 7,7                   | 7,7                           | 21     |
| 2,00E+08               | 9,92E+07                | 8                     | 8,1                           | 21     |

En la Fig. 16 se muestra una representación gráfica de estos resultados.

10

Resumen de linealidad:

15

El rango lineal, definido como el rango de concentración para el cual la desviación log10 de los títulos log10 medios observados está dentro de  $\pm 0,3$  del título nominal log10 se determinó como: 4,87+00 UI/ml – 1,22E+08 UI/ml para plasma EDTA y 3,90E+00 UI/ml – 9,92E+07 UI/ml para suero.

5. Análisis cuantitativo de HIV

20

Mezcla de reacción

## ES 2 606 688 T3

R1:

| Reactivo  | Conc. Final en PCR 50 ul (uM) |
|---|-------------------------------|
| Mn(Ac)2 * 4H <sub>2</sub> O (pH 6,1 ajustado con Ácido Acético) | 3'300                         |
| NaN <sub>3</sub> /Ri, tamponado con Tris 10 mM a pH7            | 0,018                         |
|   | pH: 6,41                      |

R2:

5

| Reactivo   | Conc. Final en PCR 50 ul |
|--|--------------------------|
| Glicerol (% , p/v)                               | 3 %                      |
| Tricina  | 60 mM                    |
| DMSO (% , v/v)                                   | 5,4 %                    |
| KOAc   | 120 mM                   |
| Tween 20 (v/v)                                   | 0,02 %                   |
| Aptámero NTQ21-46 A                              | 0,222 µM                 |
| Polimerasa ZO5D                                  | 0,9 U/µl (45 U/rxn)      |
| UNG  | 0,2 U/µl (10 U/rxn)      |
| Azida Sódica (p/v)                               | 0,027                    |
| dCTPs  | 400 µM                   |
| dGTPs  | 400 µM                   |
| dATPs  | 400 µM                   |
| dUTPs  | 800 µM                   |
| Cebadores/sondas seleccionados de SEQ ID NO 1-35 | 0,1 µM-0,3 µM            |
| SEQ ID NO 50                                     | 0,3 µM                   |
| SEQ ID NO 51                                     | 0,3 µM                   |
| SEQ ID NO 52                                     | µM                       |

Sensibilidad analítica/LDD

10 Se preparó un panel de dilución con un Patrón Secundario HIV-1M en plasma EDTA negativo para HIV-1 para volúmenes de entrada de muestra de 200 µl y 500 µl. Cada nivel de concentración se ensayó con 21 copias. Al menos ≥20 copias debían de ser válidas. El LDD se determinó por análisis PROBIT a un índice de acierto de 95 % y ≥ 95 % por análisis de índice de acierto.

Tabla 21: análisis LDD para un volumen de entrada de 200 µl en plasma EDTA

| Concentración              | Número de copias | Número de positivos | Índice de acierto |
|----------------------------|------------------|---------------------|-------------------|
| 200 cp/ml                  | 21               | 21                  | 100 %             |
| 100 cp/ml                  | 21               | 21                  | 100 %             |
| 80 cp/ml                   | 21               | 21                  | 100 %             |
| 50 cp/ml                   | 21               | 20                  | 95,2 %            |
| 30 cp/ml                   | 21               | 18                  | 85,7 %            |
| 20 cp/ml                   | 21               | 17                  | 81,0 %            |
| 10 cp/ml                   | 21               | 8                   | 38,1 %            |
| 0 cp/ml (control negativo) | 21               | 0                   | 0 %               |

| Concentración   | Número de copias | Número de positivos | Índice de acierto |
|---|------------------|---------------------|-------------------|
| LDD por análisis PROBIT (índice de acierto 95 %)            |                  |                     | 41,8 cp/ml        |
| Intervalo de confianza de 95 % para LDD por análisis PROBIT |                  |                     | 30,9-74,9 cp/ml   |

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

| Concentración   | Número de copias | Número de positivos | Índice de acierto |
|---|------------------|---------------------|-------------------|
| 30 cp/ml  | 21               | 21                  | 100 %             |
| 25 cp/ml  | 21               | 20                  | 95,2 %            |
| 20 cp/ml  | 21               | 21                  | 100 %             |
| 13,5 cp/ml  | 21               | 18                  | 85,7 %            |
| 9 cp/ml   | 21               | 13                  | 61,9 %            |
| 6 cp/ml   | 21               | 9                   | 42,9 %            |
| 0 cp/ml (control negativo)                                  | 21               | 0                   | 0 %               |
| LDD por análisis PROBIT (índice de acierto 95 %)            |                  |                     | 18,9 cp/ml        |
| Intervalo de confianza de 95 % para LDD por análisis PROBIT |                  |                     | 14,9-29,4 cp/ml   |

Resumen LDD:

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

Linealidad

Las muestras usadas en el estudio de Linealidad/Rango Dinámico/Precisión consistía en un panel de dilución de un material de sobrenadante de cultivo celular de HIV-1, grupo M HIV-1 subtipo B.

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

Las concentraciones se seleccionaron de la siguiente manera: un nivel por debajo del Límite de Cuantificación Inferior (LDQI) esperado, uno a LDQI, uno por encima de LDQI, diversas concentraciones a niveles intermedios, al Límite de Cuantificación Superior (LDQS) esperado y uno por encima del LDQS. Para todas las concentraciones se ensayaron 21 copias. El estudio de linealidad se realizó con un volumen de entrada de 500 µl):

MP 1 - 2,0E+07 cp/ml – por encima del LDQS esperado

MP 2 - 1,0E+07 cp/ml – al LDQS al esperado

MP 3 - 1,0E+06 cp/ml – por debajo del LDQS esperado

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

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

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

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

MP 8 - 1,0E+02 cp/ml - nivel de concentración intermedio

MP 9 - 5.0E+01 cp/ml – por encima del LDQI



# ES 2 606 688 T3

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

ES 2 606 688 T3

5 <210> 9  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador/sonda  
 10 <400> 9  
 ggtactagta gttctgcta tgcacttcc 30  
 <210> 10  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 15 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador/sonda  
 20 <400> 10  
 ctatgtcact tccccttggc ttctct 25  
 <210> 11  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 25 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador/sonda  
 30 <400> 11  
 ggtactagta gttctgcta taccacttcc 30  
 <210> 12  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 35 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador/sonda  
 40 <400> 12  
 tcctgtctt atgtccagaa 20  
 <210> 13  
 <211> 28  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 50 <220>  
 <223> cebador/sonda  
 <400> 13  
 ttggctctt gtcttatgca cagaatgc 28  
 <210> 14  
 <211> 28  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 60 <220>  
 <223> cebador/sonda  
 <400> 14  
 65 tactagtagt tctgctatg tcaactcc 28

ES 2 606 688 T3

<210> 15  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> cebador/sonda  
 <400> 15  
 10 tgtgtatga tgggtttaa atc 23  
 <210> 16  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 15 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador/sonda  
 20 <400> 16  
 actctaaagg gtccttgg 20  
 <210> 17  
 <211> 33  
 25 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador/sonda  
 30 <400> 17  
 tctgcagctt cctcattgat ggtatctttt aac 33  
 <210> 18  
 <211> 29  
 35 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador/sonda  
 40 <400> 18  
 tcagcattat cagaaggagc cacccaca 29  
 <210> 19  
 <211> 32  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 50 <220>  
 <223> cebador/sonda  
 <400> 19  
 55 tctgcagctt cctcattgag gtatctttaa ac 32  
 <210> 20  
 <211> 41  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 60 <220>  
 <223> cebador/sonda  
 <400> 20  
 65 atcctgggat taaataaaat agtaagaatg tatagcccta c 41

ES 2 606 688 T3

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

ES 2 606 688 T3

<210> 27  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> cebador/sonda  
 <400> 27  
 10 ccgctaagcc gagcccttg cgtcgga 27  
 <210> 28  
 <211> 17  
 <212> ADN  
 15 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador/sonda  
 20 <400> 28  
 ggtctgaggg atctcta 17  
 <210> 29  
 <211> 24  
 25 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador/sonda  
 30 <400> 29  
 ctgctagaga tttccacac tgac 24  
 <210> 30  
 <211> 23  
 35 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador/sonda  
 40 <400> 30  
 ggctccacgc ttgcttgctt aaa 23  
 <210> 31  
 <211> 18  
 45 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador/sonda  
 50 <400> 31  
 55 ggctccacgc ttgcttgctt 18  
 <210> 32  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 60 <220>  
 <223> cebador/sonda  
 <400> 32  
 65 ttccaaagc aagaagggtc ctaacagacc a 31

# ES 2 606 688 T3

|    |   |    |
|----|---|----|
| 5  | <210> 33<br><211> 28<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial<br><br><220><br><223> cebador/sonda |    |
| 10 | <400> 33<br>tctctagcag tggcgcccga acagggac  | 28 |
| 15 | <210> 34<br><211> 34<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial<br><br><220><br><223> cebador/sonda |    |
| 20 | <400> 34<br>accagagtca cacaacagac gggcacacac tact   | 34 |
| 25 | <210> 35<br><211> 31<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial<br><br><220><br><223> cebador/sonda |    |
| 30 | <400> 35<br>tcctagtcgc cgcctggtca ttcggtgtc a   | 31 |
| 35 | <210> 36<br><211> 25<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial<br><br><220><br><223> cebador/sonda |    |
| 40 | <400> 36<br>catgcaactt tttcacctct gccta   | 25 |
| 45 | <210> 37<br><211> 27<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial<br><br><220><br><223> cebador/sonda |    |
| 50 | <400> 37<br>aactccacag tagctcaaaa ttctta  | 27 |
| 55 | <210> 38<br><211> 33<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial<br><br><220><br><223> cebador/sonda |    |
| 60 | <400> 38<br>ccaagctgtg ccttggtgg cttggggca tgg  | 33 |

ES 2 606 688 T3

|    |                               |    |
|----|-------------------------------|----|
|    | <210> 39                      |    |
|    | <211> 23                      |    |
|    | <212> ADN                     |    |
|    | <213> Secuencia artificial    |    |
| 5  | <220>                         |    |
|    | <223> cebador/sonda           |    |
|    | <400> 39                      |    |
| 10 | gggattcctg taacaacaag tca     | 23 |
|    | <210> 40                      |    |
|    | <211> 24                      |    |
|    | <212> ADN                     |    |
| 15 | <213> Secuencia artificial    |    |
|    | <220>                         |    |
|    | <223> cebador/sonda           |    |
|    | <400> 40                      |    |
| 20 | tctccccag aacaataaga acac     | 24 |
|    | <210> 41                      |    |
|    | <211> 26                      |    |
| 25 | <212> ADN                     |    |
|    | <213> Secuencia artificial    |    |
|    | <220>                         |    |
|    | <223> cebador/sonda           |    |
| 30 | <400> 41                      |    |
|    | ggcttgacaga gttctatagt gctatg | 26 |
|    | <210> 42                      |    |
| 35 | <211> 25                      |    |
|    | <212> ADN                     |    |
|    | <213> Secuencia artificial    |    |
|    | <220>                         |    |
| 40 | <223> cebador/sonda           |    |
|    | <400> 42                      |    |
|    | ttgatagcaa tccgctatcg actaa   | 25 |
| 45 | <210> 43                      |    |
|    | <211> 28                      |    |
|    | <212> ADN                     |    |
|    | <213> Secuencia artificial    |    |
| 50 | <220>                         |    |
|    | <223> cebador/sonda           |    |
|    | <400> 43                      |    |
| 55 | gcttcgatac tcagtcattc cggataa | 28 |
|    | <210> 44                      |    |
|    | <211> 27                      |    |
|    | <212> ADN                     |    |
|    | <213> Secuencia artificial    |    |
| 60 | <220>                         |    |
|    | <223> cebador/sonda           |    |
|    | <400> 44                      |    |
| 65 | tctctcgcca tctcctaccg cattggc | 27 |

ES 2 606 688 T3

<210> 45  
 <211> 269  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> ácido nucleico de control interno

10

**aattcaagct tagatctagc tttgcctgct tgatagcaat cggctatcga ctaatgactg 60**  
**tctctggcgggt ctctcgccat ctccctaccgc attggctcat aggtaagctc gctgtcacc 120**  
**agtacggagg tgccagtaga ttattagaga cagtcgcca togatcgtta 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**  
**agtatatatgc catctttaac acttagaccg aagtgtgctg aagttccagt ggccggccca 120**  
**gacctgggaa gttgcaagga cttaaocgaa tgcaagcgat catatcttga aaaattataa 180**  
**ccagaggatc gatgaaaaaa atttcttaga gctttggatc ccggggogag ctccc 235**

25

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

30

<220>  
 <223> ácido nucleico de control interno

<400> 47

**cgactctaga tgaagggagc cttagaacgg ggctgcgcta gctggcatca aagtccgtca 60**  
**gagctcaacc ctccaacgag gattcctgaa tactcgaaag tcagtgtgca gttactaaca 120**  
**acagctgctc gaocctgggg totogaacaa tccatacctg ctatcgctgc cttcagacat 180**  
**acggatgggc taggaggcaa gagctacctg tctcaacgaa ctatcggagt gggaccgat 240**  
**gaagctgtca gcgccacttc cggcggtaag gctttaaacc gcgcccggcg gttatcacgc 300**  
**gcggggagca cagcggggac tgacgtgctg ggaagcaccg gttaaggatc 350**

35

<210> 48  
 <211> 470

ES 2 606 688 T3

<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

5 <220>  
<223> ácido nucleico de control interno

<400> 48

|  |     |
|--|-----|
| cgactctaga aactgggtag taactgcggg ggcgaatgat gcaggcttca gaaattaaac  | 60  |
| tcaatagtat cgggtgtctc aatctttttc gggccaggcg gcggtggacg acagacaatt  | 120 |
| ttacgatttt ggttcgggtc acaaccgctc catacatgtc aagaatgaag tgggcgaacg  | 180 |
| ctagaaaact gacgccagca attaagtgag tccggggcgtg gtgactccca cgtaaaaagc | 240 |
| ccctaccccg caccgttaag aagtatcaaa acgggacgctg cacgaaccga cgattggtac | 300 |
| tgtataagcg gcccgacgaa ctcaaaatcc caagtgaatc tatgaaatct acatcgcggt  | 360 |
| tataatctac ggggtgtaaa cggatgagaa ttggccaaac ggaggcacac acgcgtgcaa  | 420 |
| tgcgccgacc ctgagaaaag tatcatgtgc gtcggccaca ggatccccgg             | 470 |

10 <210> 49  
<211> 350  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> ácido nucleico de control interno

<400> 49

|   |     |
|---|-----|
| cgactctaga tgaagggagc cttagaacgg ggctgcgcta gctggcatca aagtccgtca   | 60  |
| gagctcaacc ctccaacgag gattcctgaa tactcgaaaag tcagtgtgca gttactaaca  | 120 |
| acagctgctc gacctcgggg tctcgaacaa tccatacctg ctatcgctgc cttcagacat   | 180 |
| acggatgggc taggaggcaa gagctacctg tctcaacgaa ctatcggagt gggacccgat   | 240 |
| gaagctgtca gcgccacttc cggcggtgtaag gctttaaaac gcgcccggcg gttatcacgc | 300 |
| gcggggagca cagcgcggac tgacgtgctg ggaagcaccg gttaaggatc              | 350 |

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

30 <220>  
<223> cebador/sonda

<400> 50  
acaaccgctc catacatgtc aagaa 25

35 <210> 51  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 606 688 T3

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

ES 2 606 688 T3

|    |                                |    |  |
|----|--------------------------------|----|--|
|    | <220>                          |    |  |
|    | <223> cebador/sonda            |    |  |
| 5  | <400> 57                       |    |  |
|    | gtaagccctc agaaccgtct cgaa     | 25 |  |
|    | <210> 58                       |    |  |
|    | <211> 28                       |    |  |
| 10 | <212> ADN                      |    |  |
|    | <213> Secuencia artificial     |    |  |
|    | <220>                          |    |  |
|    | <223> cebador/sonda            |    |  |
| 15 | <400> 58                       |    |  |
|    | ggactagagg ttagaggaga ccccgagg | 28 |  |
|    | <210> 59                       |    |  |
|    | <211> 28                       |    |  |
| 20 | <212> ADN                      |    |  |
|    | <213> Secuencia artificial     |    |  |
|    | <220>                          |    |  |
|    | <223> cebador/sonda            |    |  |
| 25 | <400> 59                       |    |  |
|    | aaggactaga ggtagagga gacccgcg  | 28 |  |
|    | <210> 60                       |    |  |
|    | <211> 21                       |    |  |
| 30 | <212> ADN                      |    |  |
|    | <213> Secuencia artificial     |    |  |
|    | <220>                          |    |  |
|    | <223> cebador/sonda            |    |  |
| 35 | <400> 60                       |    |  |
|    | aaaccactc tatgtccggt c         | 21 |  |
|    | <210> 61                       |    |  |
|    | <211> 21                       |    |  |
| 40 | <212> ADN                      |    |  |
|    | <213> Secuencia artificial     |    |  |
|    | <220>                          |    |  |
|    | <223> cebador/sonda            |    |  |
| 45 | <400> 61                       |    |  |
|    | gtacgccgga attgccgga a         | 21 |  |
| 50 | <210> 62                       |    |  |
|    | <211> 21                       |    |  |
|    | <212> ADN                      |    |  |
| 55 | <213> Secuencia artificial     |    |  |
|    | <220>                          |    |  |
|    | <223> cebador/sonda            |    |  |
| 60 | <400> 62                       |    |  |
|    | cctcaaagaa aaaccaaag a         | 21 |  |
|    | <210> 63                       |    |  |
|    | <211> 26                       |    |  |
| 65 | <212> ADN                      |    |  |
|    | <213> Secuencia artificial     |    |  |

ES 2 606 688 T3

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

ES 2 606 688 T3

<220>  
 <223> cebador/sonda  
  
 <400> 69  
 5 gcaagcacc taccaggcag taccacaa 28  
  
 <210> 70  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 10 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador/sonda  
  
 <400> 70  
 15 gcaagcacc taccaggcag taccaca 27  
  
 <210> 71  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 20 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador/sonda  
  
 <400> 71  
 25 ttgccggaaa gactgggtcc tttc 24  
  
 <210> 72  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 30 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador/sonda  
  
 <400> 72  
 35 ttgccggaaa gactgggtcc tttc 24  
  
 <210> 73  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 40 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador/sonda  
  
 <400> 73  
 45 ccagcccatc ccgaaagatc ggcg 24  
  
 <210> 74  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 50 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador/sonda  
  
 <400> 74  
 55 tgtccgtca tttgggcg 18  
  
 <210> 75  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 60 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador/sonda  
  
 <400> 74  
 65 tgtccgtca tttgggcg 18  
  
 <210> 75  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 65 <213> Secuencia artificial

# ES 2 606 688 T3

<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

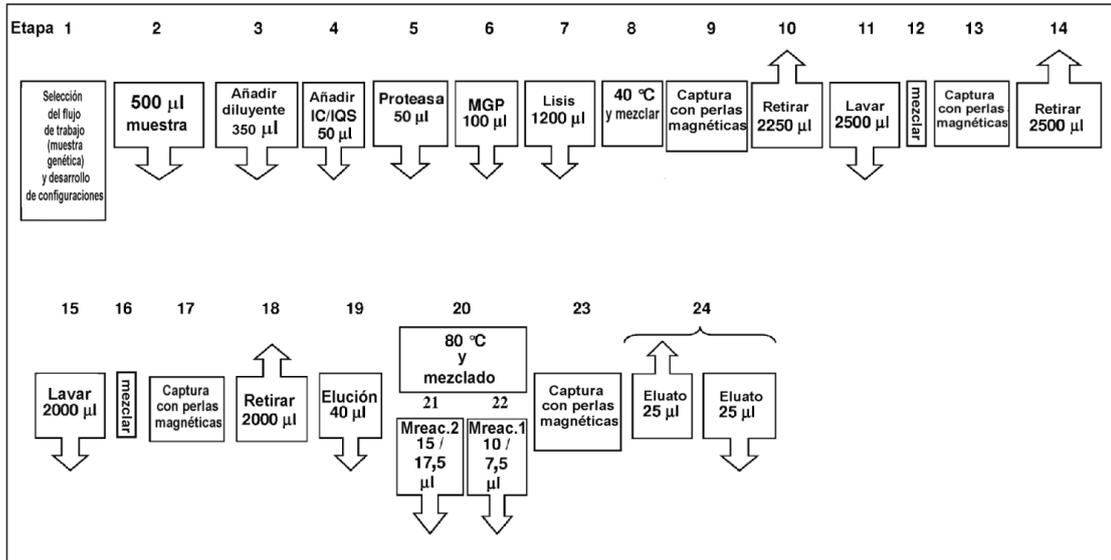
<400> 76  
tctctcgccc atctcctacc gcattggc 28

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un proceso para aislar y amplificar simultáneamente al menos un primer y un segundo ácido nucleico diana que pueden estar presentes en una o más muestras líquidas, comprendiendo dicho proceso las etapas automatizadas de:
- 10 a. añadir un ácido nucleico de control interno mezclado, seleccionado del grupo de SEQ ID NO: 45 a 49, a cada una de dichas muestras líquidas, en el que la secuencia de dicho ácido nucleico de control interno es idéntica para dicho al menos primer y segundo ácido nucleico diana
- 15 b. combinar a la vez un material de soporte sólido y dicha una o más muestras líquidas en uno o más recipientes durante un período de tiempo y en condiciones suficientes para permitir a los ácidos nucleicos que comprenden los ácidos nucleicos diana y el ácido nucleico de control interno, inmovilizarse en el material de soporte sólido
- 20 c. aislar el material de soporte sólido del otro material presente en las muestras líquidas en una estación de separación
- 25 d. purificar los ácidos nucleicos en dicha estación de separación y lavar el material de soporte sólido una o más veces con un tampón de lavado
- 30 e. poner en contacto los ácidos nucleicos diana purificados y el ácido nucleico de control interno purificado con reactivos de amplificación que comprenden una polimerasa con actividad transcriptasa inversa y al menos un conjunto de cebadores distinto para cada uno de dichos ácidos nucleico diana y para dicho ácido nucleico de control interno en al menos dos recipientes de reacción, en el que al menos un primer recipiente de reacción comprende cebadores para al menos dicho primer ácido nucleico diana y al menos un segundo recipiente de reacción comprende cebadores para al menos dicho segundo ácido nucleico diana y en el que los cebadores para el segundo ácido nucleico diana no están en el primer recipiente de reacción
- 35 e2. incubar en dichos recipientes de reacción dichos ácidos nucleicos purificados con dichos reactivos de amplificación durante un periodo de tiempo y en condiciones adecuadas para que se produzca la transcripción del ARN por dicha polimerasa con actividad transcriptasa inversa, en el que el periodo de tiempo es de hasta 10 minutos
- 40 f. incubar en dichos recipientes de reacción dichos ácidos nucleicos diana purificados y dicho ácido nucleico de control interno purificado con dichos reactivos de amplificación durante un periodo de tiempo y en condiciones suficientes para que se produzca una reacción de amplificación indicadora de la presencia o de la ausencia de dichos ácidos nucleicos diana
- 45 g. detectar y medir las señales generadas por los productos de amplificación de dichos ácidos nucleico diana y que son proporcionales a la concentración de dichos ácidos nucleico diana, y detectar y medir una señal generada por dicho ácido nucleico de control interno,
- 50 en el que las condiciones para la amplificación y la detección en las etapas e. a g. son idénticas para dichos al menos primer y segundo ácidos nucleicos diana purificados y dicho ácido nucleico de control interno, y en el que el primer y/o el segundo ácido nucleico diana es un ácido nucleico bacteriano, y en el que los al menos dos ácidos nucleicos diana comprenden ARN y ADN.
- 55 2. El proceso de la reivindicación 1, en el que la presencia de un producto de amplificación de dicho ácido nucleico de control interno es indicadora de que en la mezcla de reacción se produce una amplificación, incluso en ausencia de productos de amplificación para uno o más de dichos ácidos nucleicos diana.
- 60 3. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que adicionalmente comprende la siguiente etapa:
- 65 h. determinar la cantidad de uno o más de dichos ácidos nucleicos diana.
4. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho ácido nucleico de control interno es ADN.
5. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho ácido nucleico de control interno es ARN.
6. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho ácido nucleico de control interno es un ácido nucleico blindado.
7. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la secuencia del ácido nucleico de control interno es diferente de las secuencias de los otros ácidos nucleicos presentes en la muestra líquida.
8. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho ácido nucleico de control interno tiene una concentración entre el LDD y 20xLDD.
9. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho ácido nucleico de control interno tiene una concentración entre el LDD y 5000xLDD.

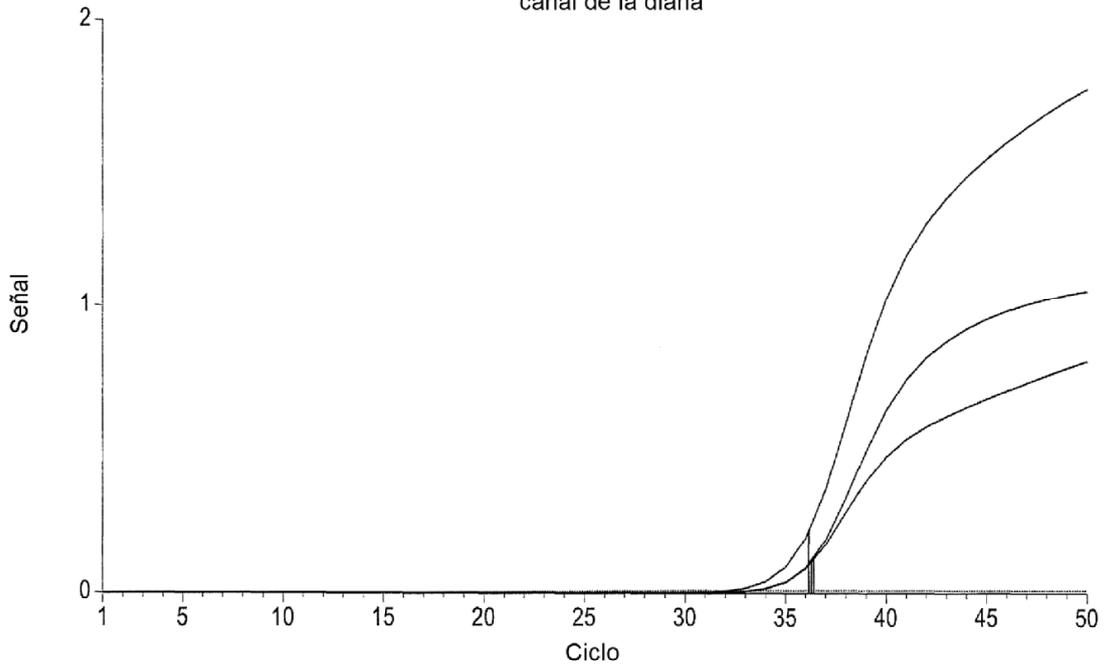
10. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que en la etapa a. se añade más de un ácido nucleico de control interno, pero solamente uno de dichos ácidos nucleicos de control interno se amplifica en la etapa f.
- 5
11. Uso de un ácido nucleico mezclado seleccionado del grupo de SEQ ID NO: 45 a 49 como un ácido nucleico de control.
  12. Un ácido nucleico mezclado seleccionado del grupo de SEQ ID NO: 45 a 49.

Fig. 1



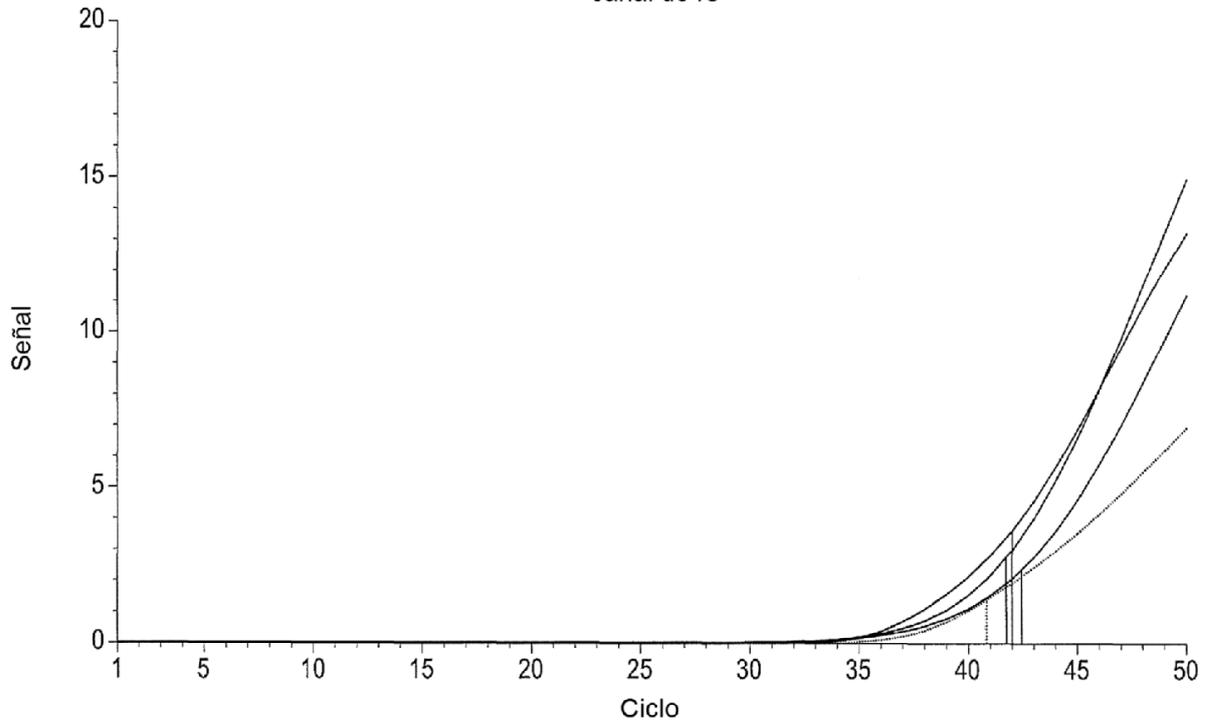
**Fig. 2a**

Señales normalizadas  
ensayo cualitativo con HIV,  
canal de la diana



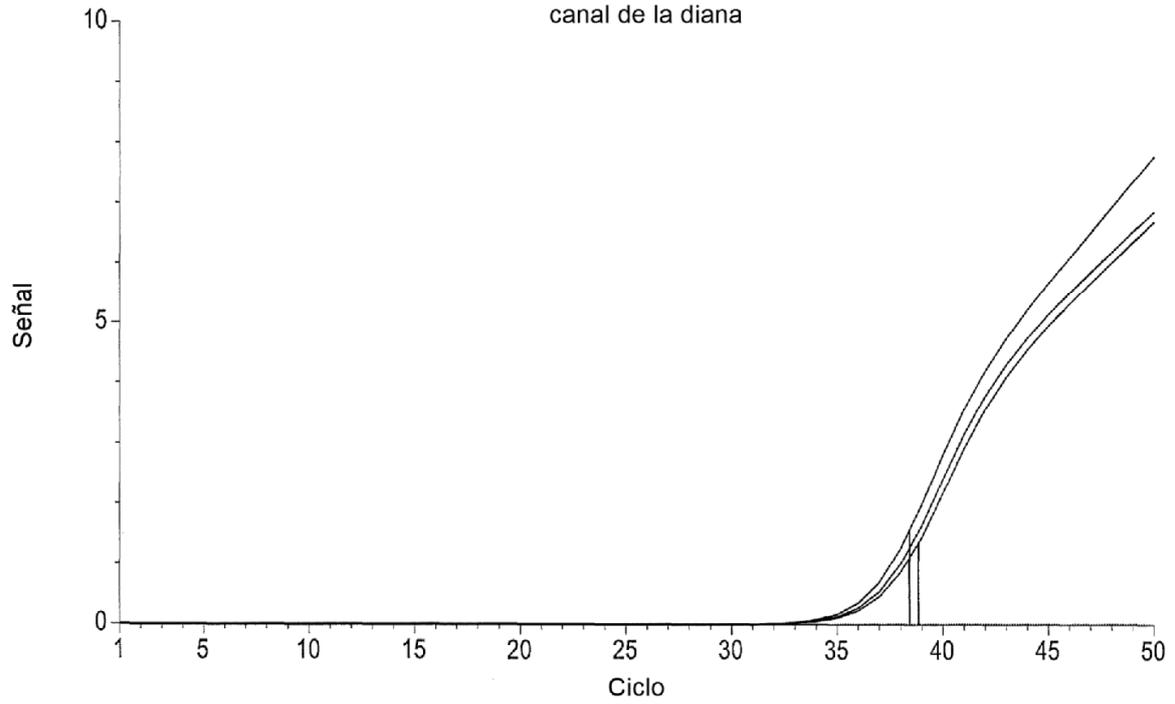
**Fig. 2b**

Señales normalizadas  
ensayo cualitativo con HIV,  
canal de IC



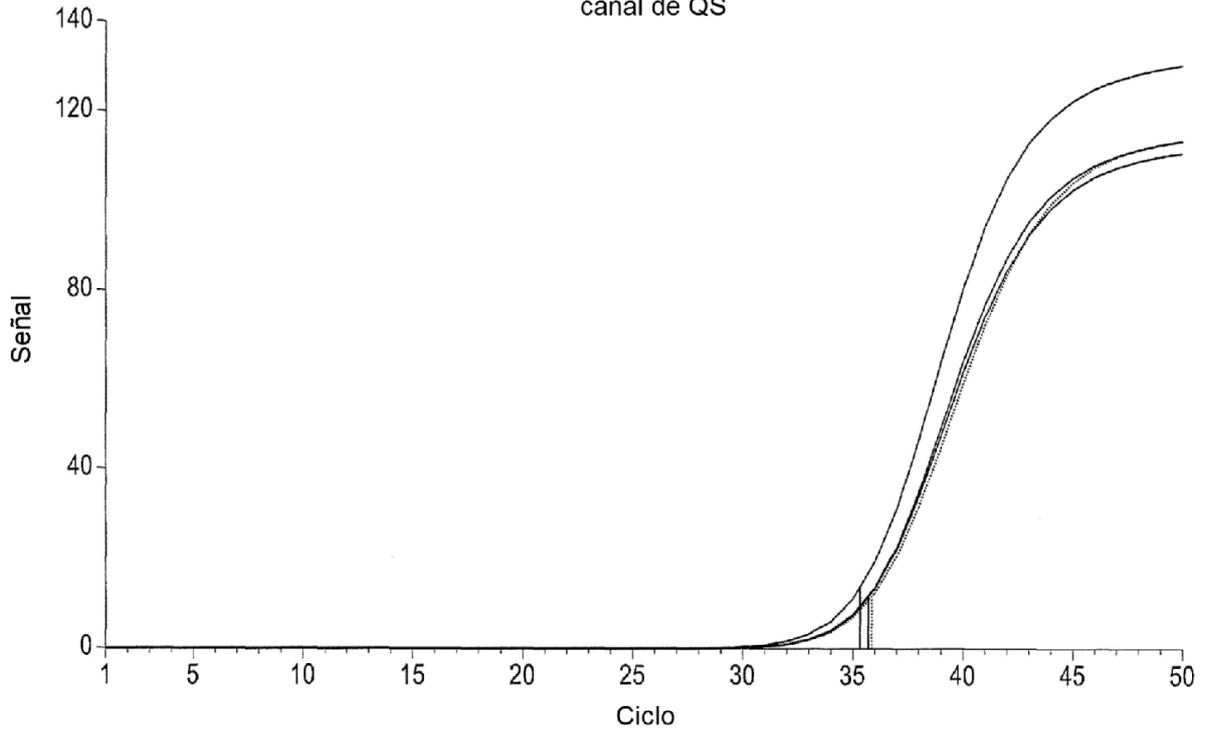
**Fig. 2c**

Señales normalizadas  
ensayo cualitativo con HIV,  
canal de la diana



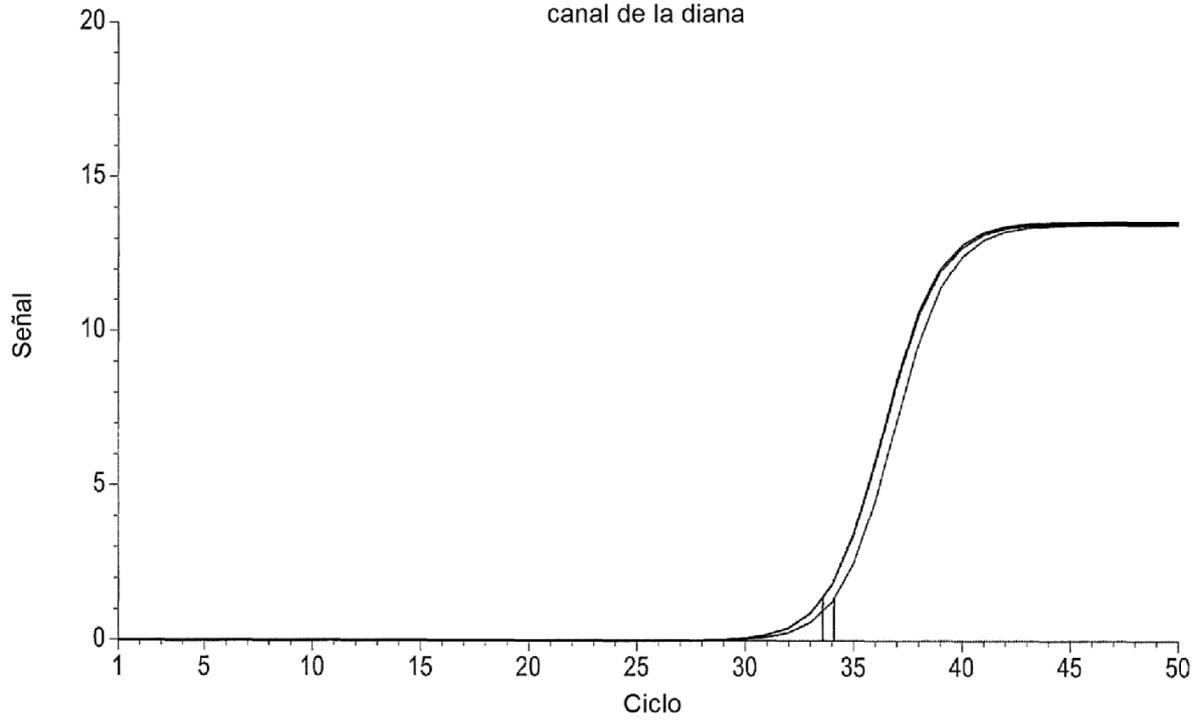
**Fig. 2d**

Señales normalizadas  
ensayo cualitativo con HIV,  
canal de QS



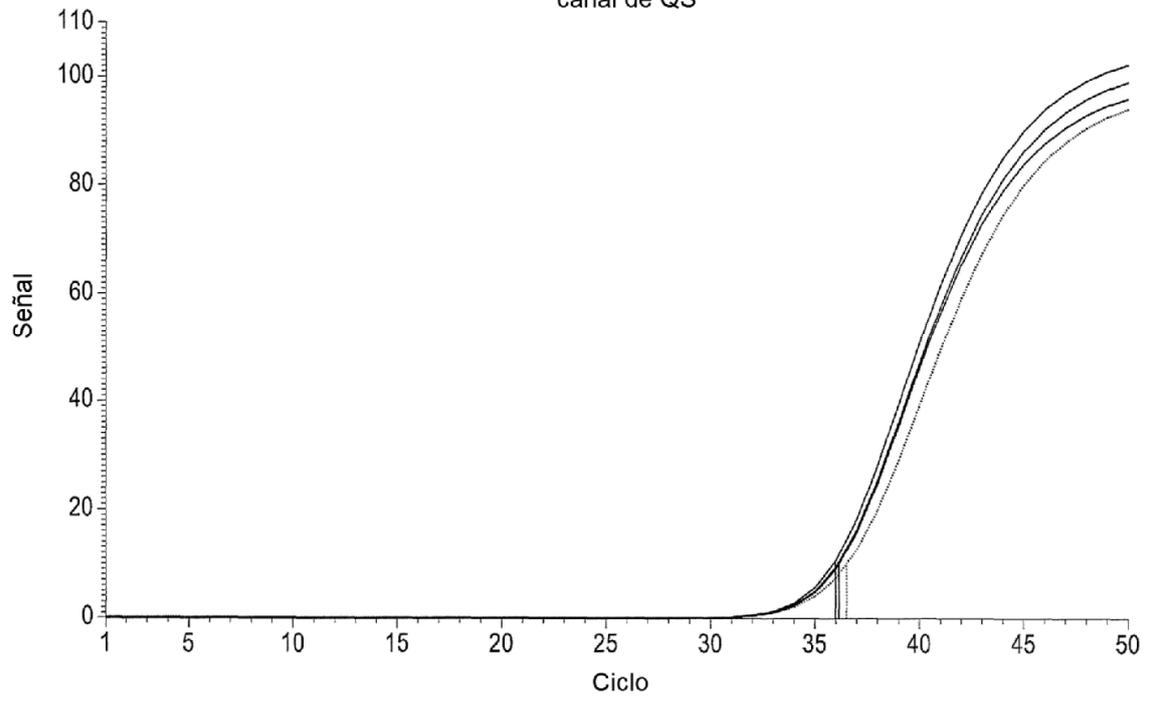
**Fig. 2e**

Señales normalizadas  
ensayo cuantitativo con HBV,  
canal de la diana



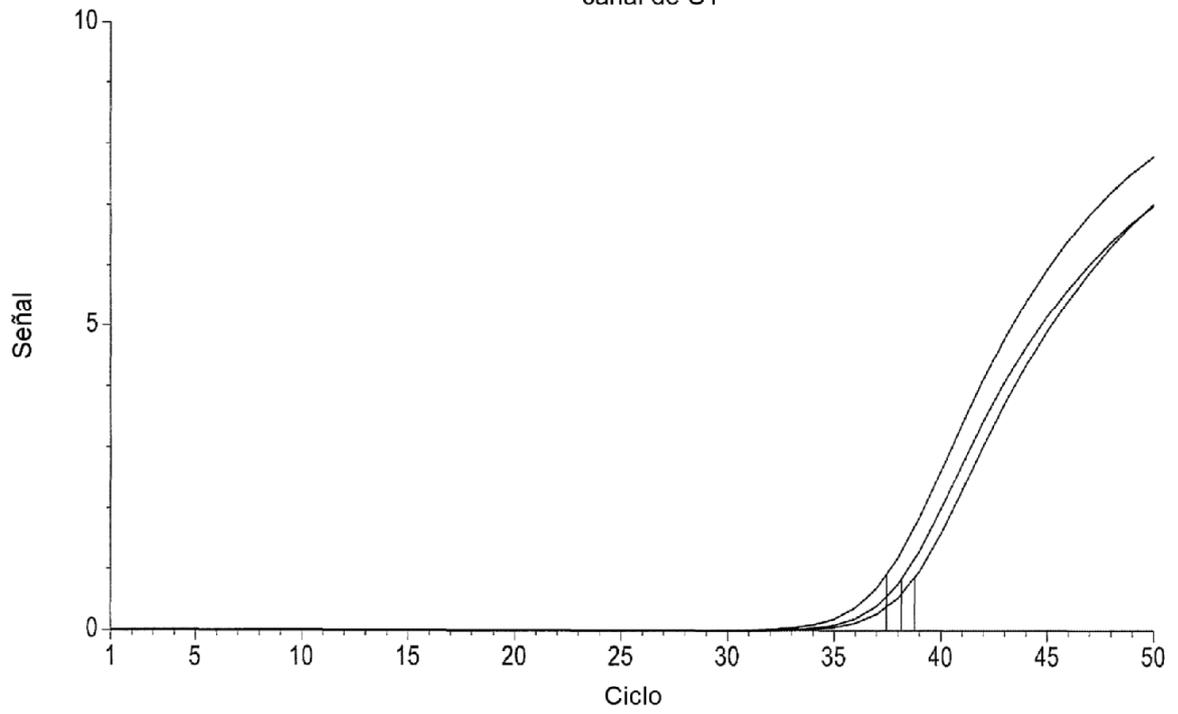
**Fig. 2f**

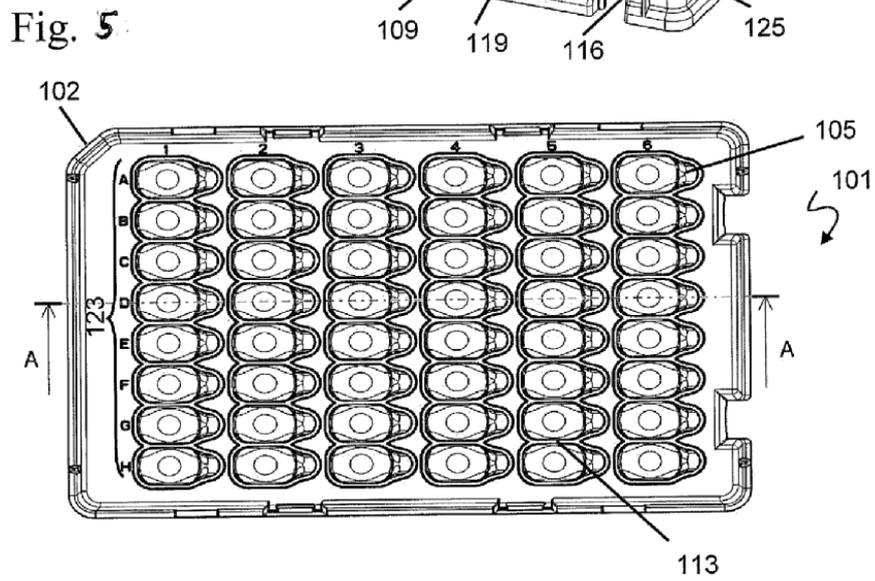
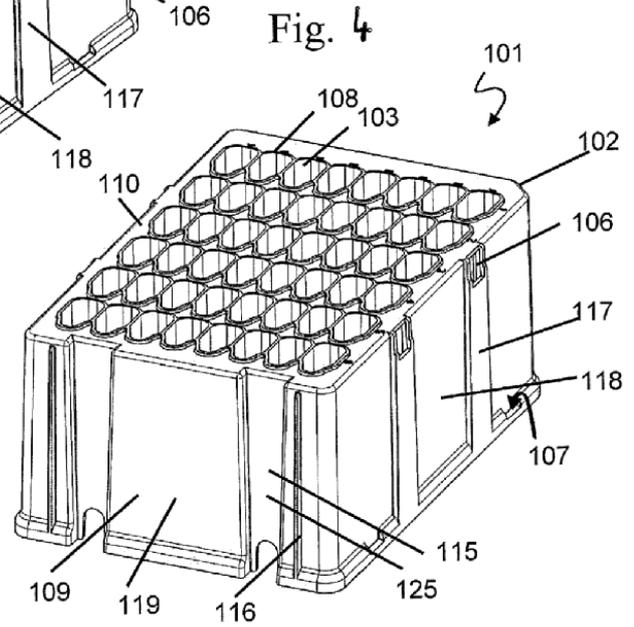
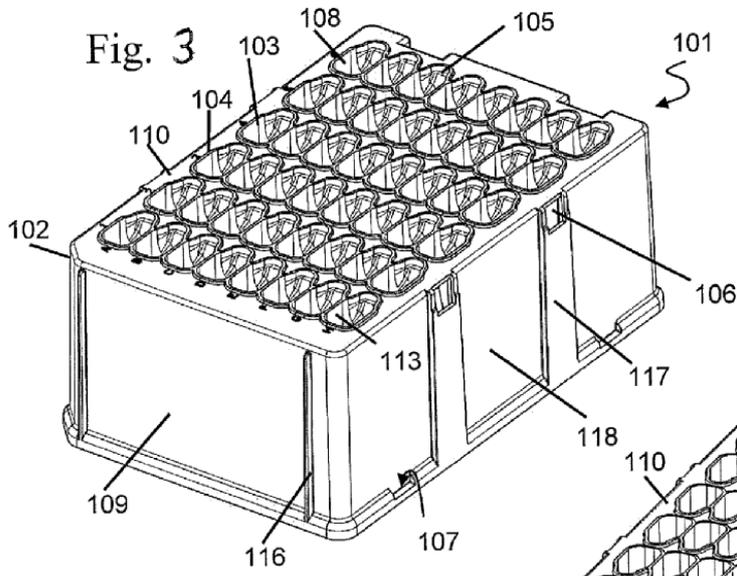
Señales normalizadas  
ensayo cuantitativo de HBV,  
canal de QS

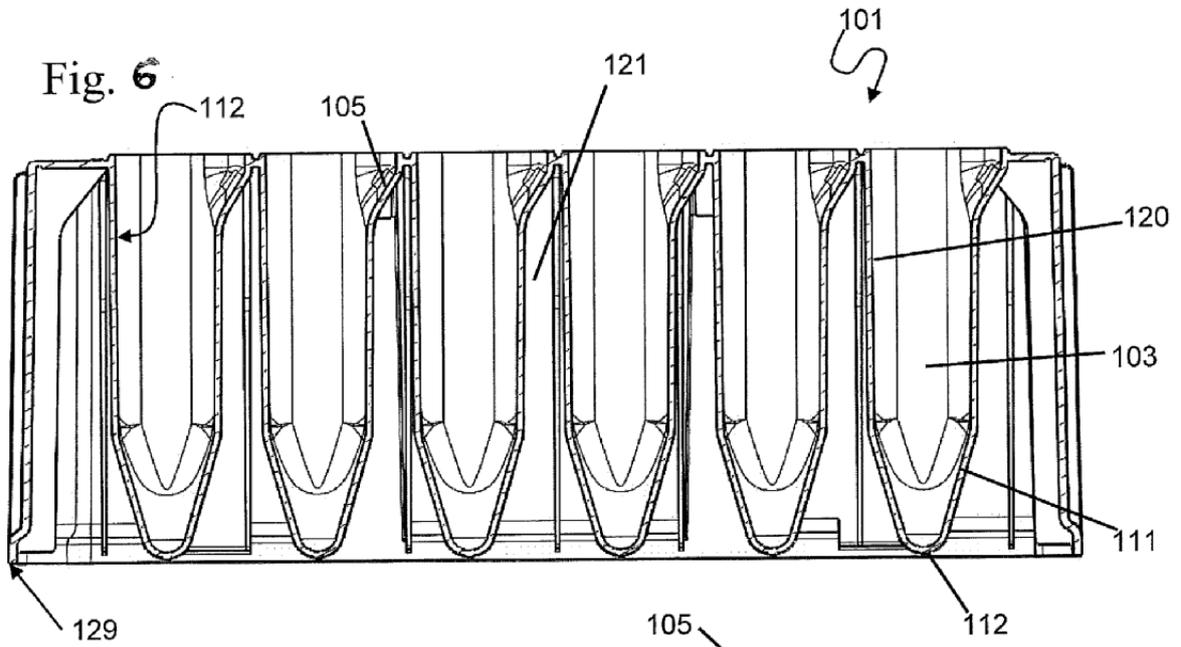


**Fig. 2g**

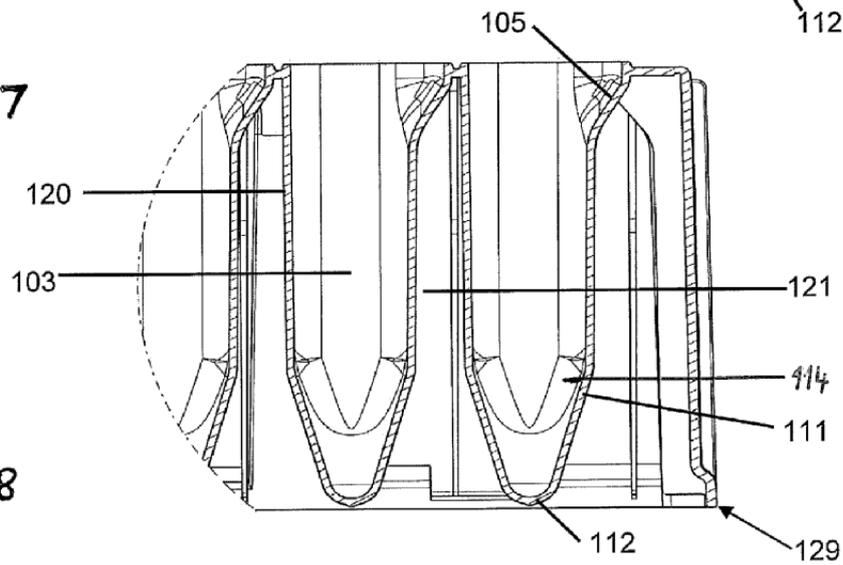
Señales normalizadas  
ensayo con CT/NG,  
canal de CT







**Fig. 7**



**Fig. 8**

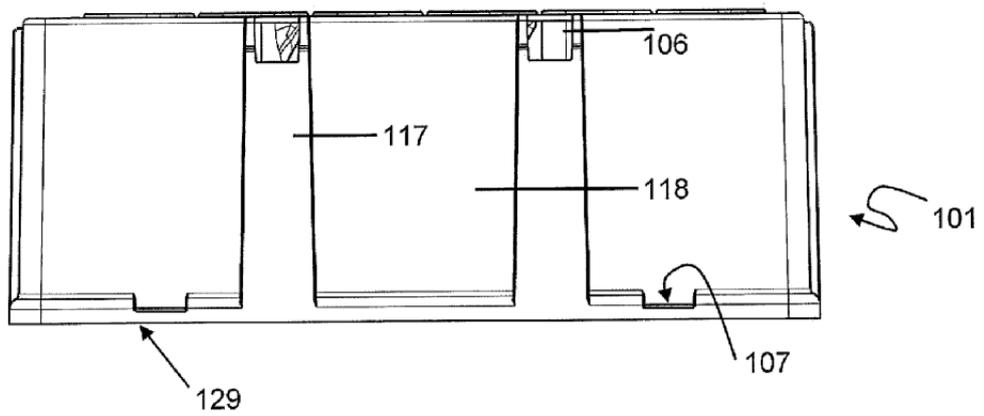
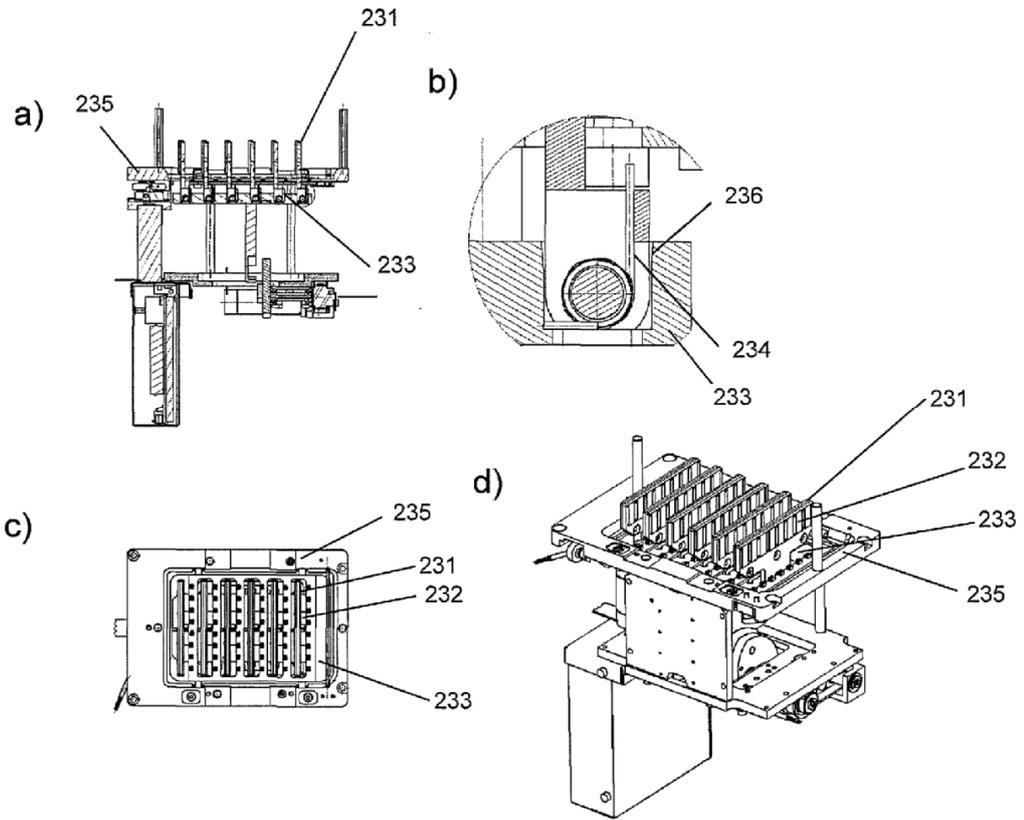


Fig. 9



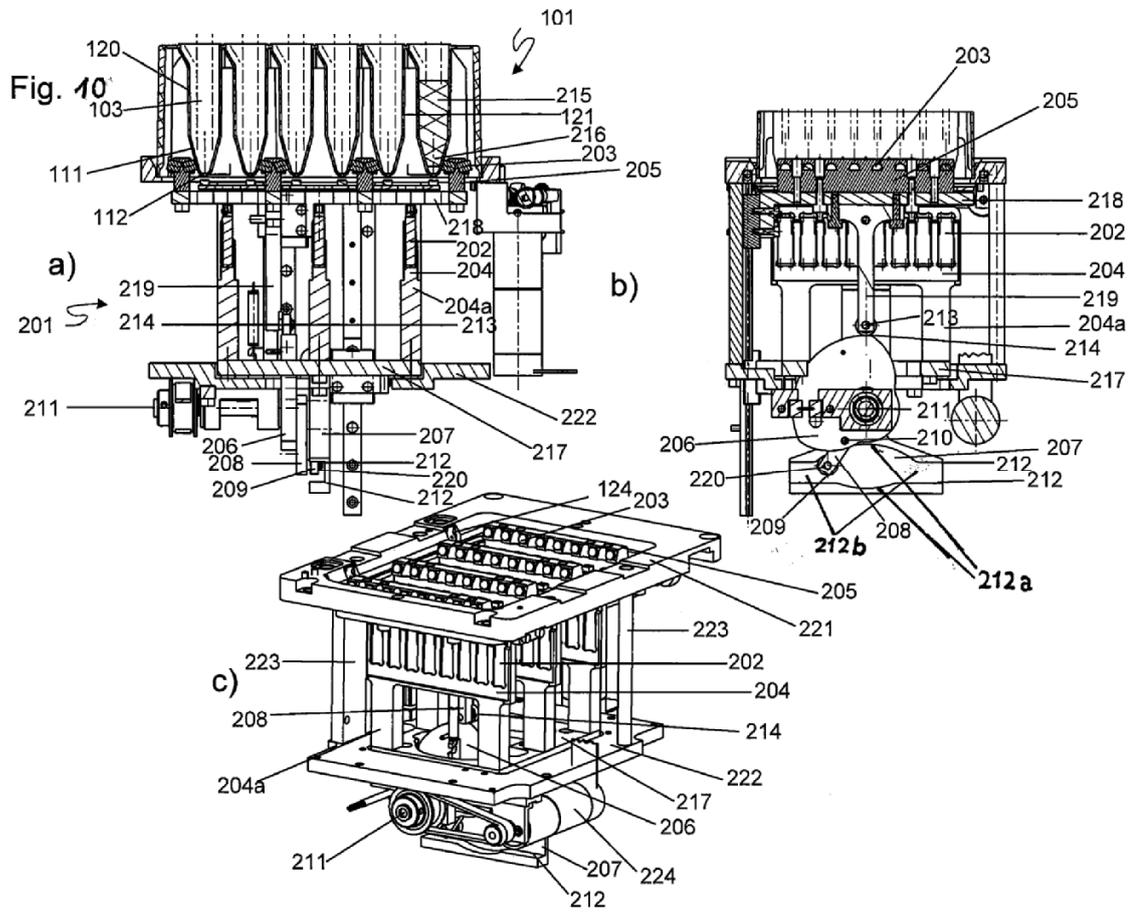


Fig. 11

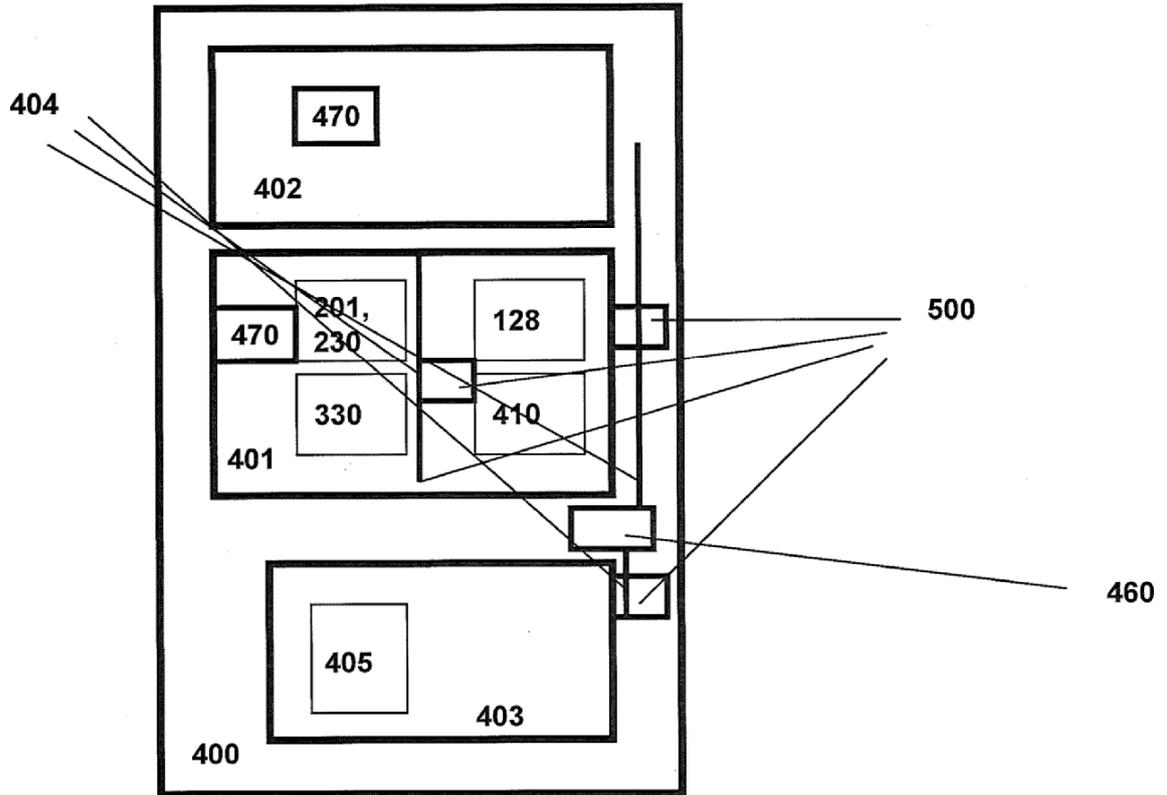
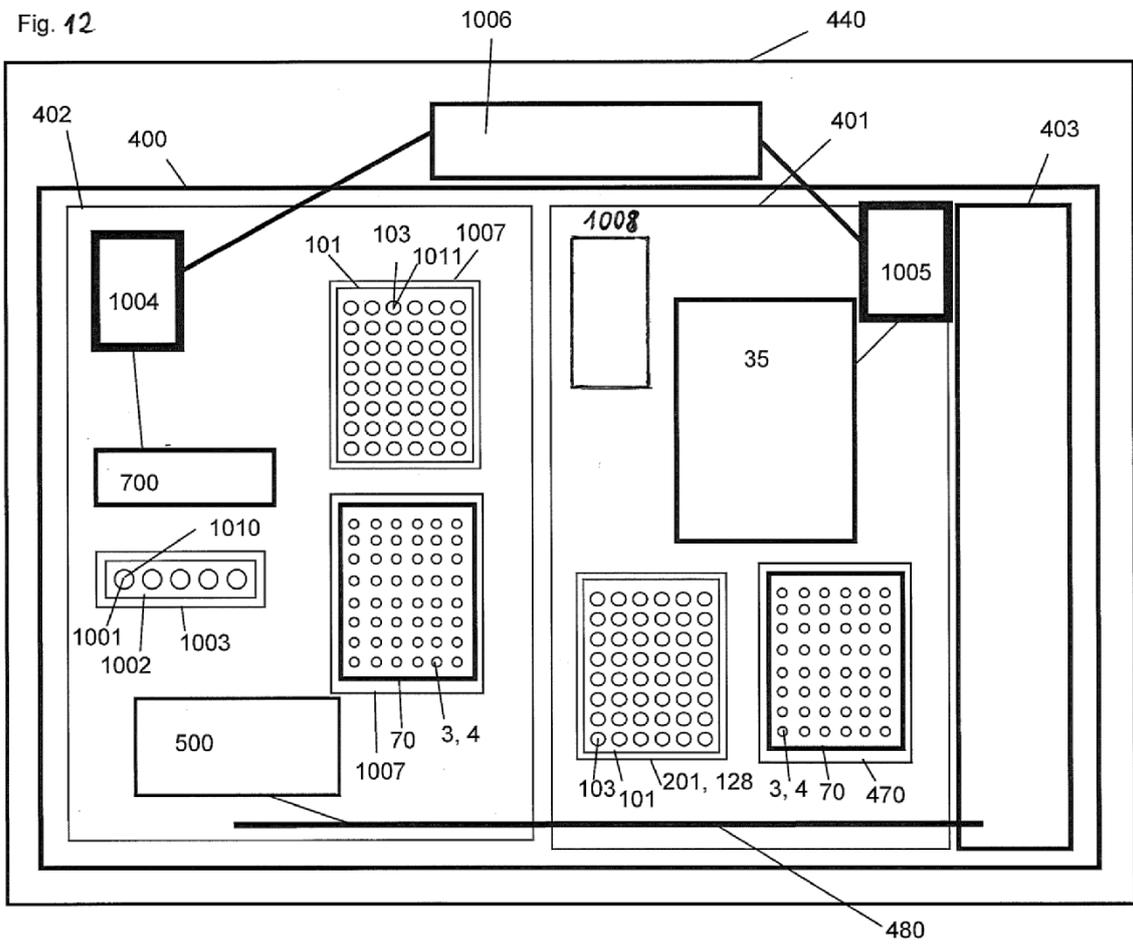
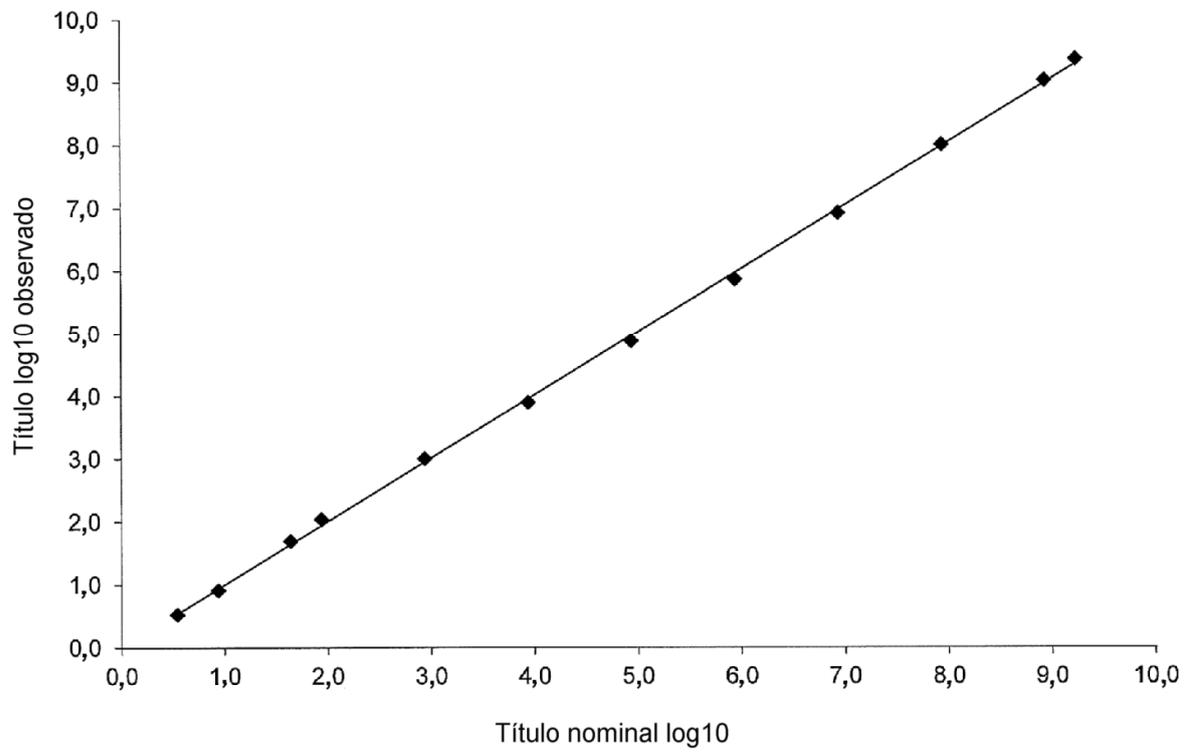


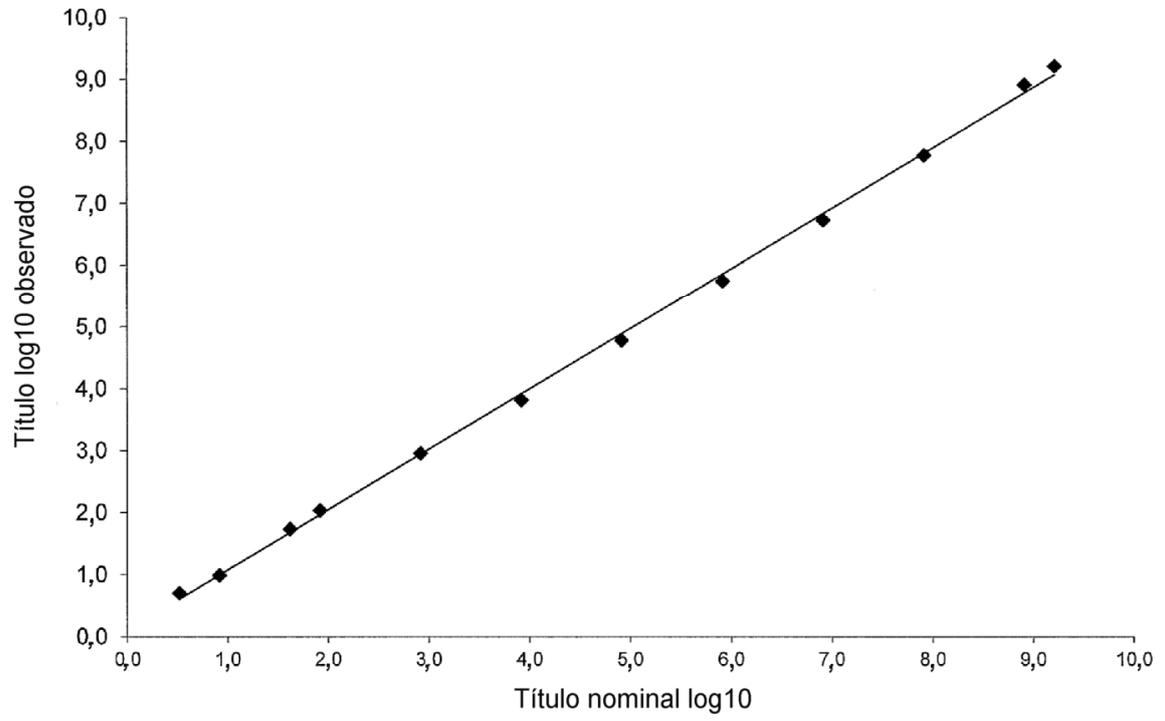
Fig. 12



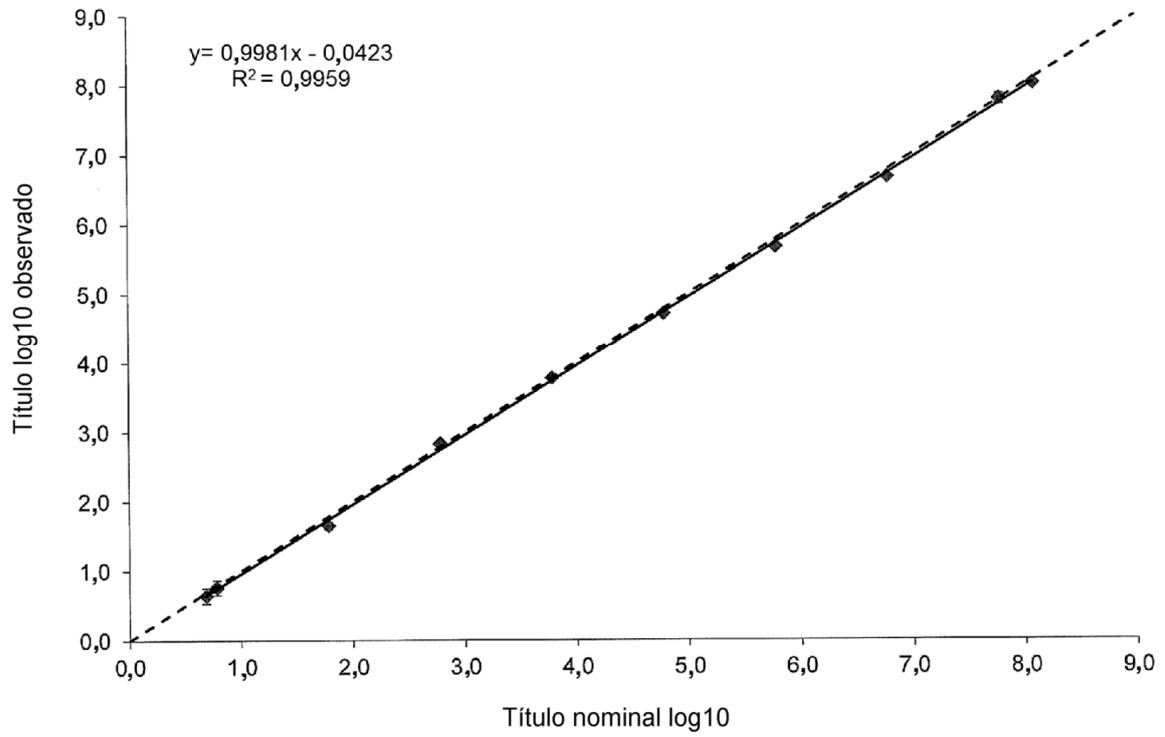
**Fig. 13**



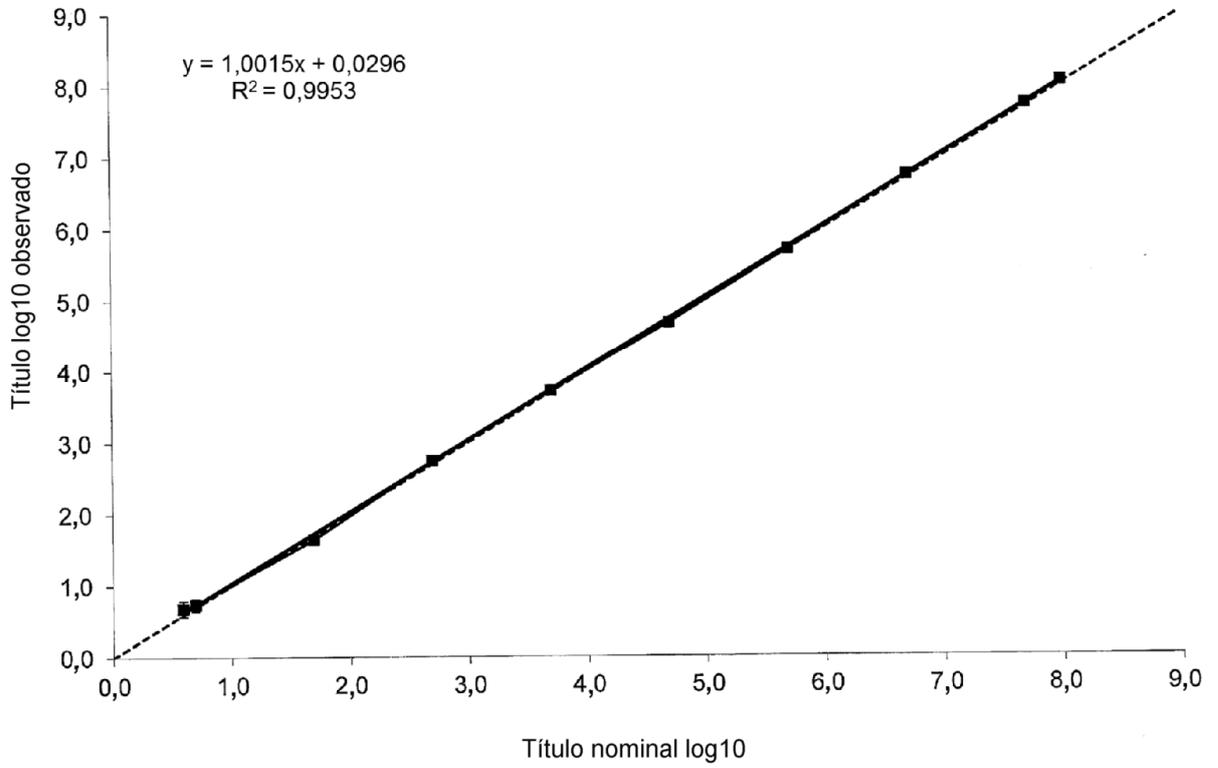
**Fig. 14**



**Fig. 15**



**Fig. 16**



**Fig. 17**

**Gráfico de regresión lineal de HIV-1 en las MREAC.**

