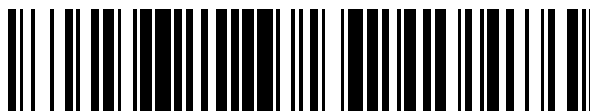


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 398 713**

51 Int. Cl.:

**C07H 1/08** (2006.01)

**B03C 1/01** (2006.01)

**C03C 17/30** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.09.1998 E 07003878 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.11.2012 EP 1783135**

54 Título: **Método de preparación de muestras automatizable de aplicación universal**

30 Prioridad:

**01.10.1997 DE 19743518**

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

**21.03.2013**

73 Titular/es:

**ROCHE DIAGNOSTICS GMBH (100.0%)  
SANDHOFER STRASSE 116  
68305 MANNHEIM, DE**

72 Inventor/es:

**KLEIBER, JOERG;  
MARKERT-HAHN, CHRISTINE y  
HARTTIG, HERBERT**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 398 713 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

Método de preparación de muestras automatizable de aplicación universal

5 La presente invención se refiere a nuevos pigmentos magnéticos que son útiles para un procedimiento de preparación de muestras biológicas para la subsiguiente detección de un analito, en especial un ácido nucleico, en esta muestra.

10 En un procedimiento para la detección de un analito en una prueba biológica, la preparación de la muestra está a menudo sometida a exigencias especiales. Por un lado, el analito a menudo está presente en una concentración muy escasa y, por otro lado, se encuentran a menudo muchas otras sustancias en la muestra, que pueden perjudicar el aislamiento o la determinación del analito.

15 Por el documento WO 96/41811 se da a conocer un procedimiento para el aislamiento de un analito, en especial un ácido nucleico, de una muestra biológica, en el que la muestra que contiene el analito en un líquido es puesta en contacto con partículas magnéticas que presentan una superficie exterior de vidrio substancialmente libre de poros, o con poros de un diámetro de < 10 nm, en condiciones en las que el analito se fija a la superficie de la partícula y el analito fijado es separado del líquido de muestra. El procedimiento descrito por el documento WO 96/46811 es muy apropiado para la purificación de un analito de una muestra biológica. Sin embargo, no puede ser utilizado sin más para una preparación automática de una muestra.

20 Boom y otros (J. Clin. Microbiol. 28 (1990), 495-503) describen asimismo un protocolo para la purificación de ácidos nucleicos de una muestra biológica utilizando partículas de óxido de silicio de tamaño fraccionado. Sin embargo, este procedimiento es complicado, no es apto para una automatización y, además, existe el peligro de transmisiones.

25 Según un método descrito por el documento EP-A-0 757 106 para la extracción de ácidos nucleicos, se analiza una muestra, se fijan los ácidos nucleicos presentes en la muestra a partículas de metal superparamagnéticas, se eliminan las mismas del tubo de muestras mediante una pipeta y se separan, de esta manera, de los demás componentes de la muestra. Este procedimiento tiene el inconveniente de que se pueden producir pérdidas debido a la necesidad de eliminar el analito con una pipeta de la muestra. Además, la utilización de varios tubos de reacción conlleva el peligro de transmisiones y contaminaciones.

30 Por lo tanto, la presente invención se basa en el objetivo de proporcionar un nuevo procedimiento para la preparación de muestras con el que se eliminan los inconvenientes del estado de la técnica, como mínimo parcialmente. En especial, el nuevo procedimiento debe ser automatizable y presentar un perfil de temperatura lo más sencillo posible.

35 En este contexto, resultan oportunos los procedimientos para el aislamiento de un analito de una muestra biológica, que comprenden las etapas:

- 40
- a) la disgregación de la muestra en un tubo de reacción,
  - b) la adición de una matriz de adsorción sólida,
  - c) la incubación en condiciones en las que el analito se fija a la matriz de adsorción,
  - 45 d) la eliminación de componentes de la muestra no fijados del tubo de reacción,
  - e) la incubación en condiciones en las que el analito es eluido de la matriz de adsorción, y
  - f) la separación del eluato de la matriz de adsorción.

50 En el contexto de la presente invención, asimismo resulta oportuno un procedimiento para el aislamiento de un analito de una muestra biológica, que comprende las etapas:

- a) la disgregación de la muestra en un tubo de reacción,
- b) la adición de una matriz de adsorción sólida,
- c) la incubación en condiciones en las que el analito se fija a la matriz de adsorción,
- 55 d) la separación de componentes de la muestra no fijados de la matriz de adsorción,
- e) la incubación en condiciones en las que el analito es eluido de la matriz de adsorción, y
- f) la separación del eluato de la matriz de adsorción,

60 en el que, como mínimo, las etapas (c) y (d) se llevan a cabo substancialmente a la misma temperatura.

El procedimiento descrito anteriormente se basa en la fijación selectiva de analitos a una matriz de adsorción sólida en presencia de un tampón de la disgregación de muestra, en el que el analito, que es preferentemente un ácido nucleico tal como ADN, por ejemplo, ADN cromosomal, ADN cromosomal fragmentado, ADN plasmídico, ADN viral, etc., o ARN, por ejemplo, ARNm, ARNt, ARNr o ARN viral, etc., es separado de impurezas de la muestra tales como, por ejemplo, proteínas o detritos celulares. La muestra puede ser una muestra biológica cualquiera, por ejemplo, un líquido corporal tal como sangre, plasma, orina, etc., una muestra de tejido, una muestra de células cultivadas o

similares.

La matriz de adsorción utilizada en el procedimiento descrito anteriormente es capaz de garantizar una fijación mayoritariamente selectiva del analito en las condiciones de reacción. Preferentemente, se utiliza una matriz de adsorción particular que presenta preferentemente una superficie de vidrio. Son muy preferentes las partículas de vidrio, en especial las partículas magnéticas descritas por el documento WO 96/41811 que presentan una superficie exterior de vidrio que es substancialmente libre de poros o presenta poros con un diámetro de menos de 10 nm. Son muy preferentes las partículas ferromagnéticas que presentan un tamaño entre 10 y 60  $\mu\text{m}$ . Estas partículas pueden contener, por ejemplo, un núcleo de mica y partículas magnéticas inmovilizadas sobre el mismo que está envuelto por una capa de vidrio. Mientras que según el documento WO 96/41811 las partículas magnéticas se presentan en forma sólida, por ejemplo como pastillas o polvo, en los tubos de reacción utilizados en cada caso, de acuerdo con la invención se utiliza las partículas magnéticas preferentemente en forma de suspensión. Resultaron muy apropiadas las suspensiones alcohólicas con una concentración de aproximadamente 5 hasta 20 mg/ml. Sorprendentemente se ha comprobado que, a pesar de la elevada densidad específica de las partículas de vidrio magnéticas, la suspensión puede ser retirada de un depósito con alta reproducibilidad, debido a lo cual se hace posible automatizar la gestión del proceso.

Aunque las partículas de vidrio descritas en el documento WO 96/41811 muestren buenos resultados con el procedimiento descrito anteriormente, se obtienen resultados muy buenos con aquellas partículas de vidrio cuya fase de vidrio comprende los siguientes óxidos de metal:  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{B}_2\text{O}_3$ , óxido de metal alcalino, por ejemplo  $\text{K}_2\text{O}$  o/y  $\text{Na}_2\text{O}$ , así como eventualmente  $\text{Al}_2\text{O}_3$  y un óxido de metal alcalinotérreo, por ejemplo,  $\text{CaO}$ . Las porciones de estos óxidos de metal son preferentemente las siguientes:  $\text{SiO}_2$  desde 50 hasta 95 %mol,  $\text{B}_2\text{O}_3$  desde 0,2 hasta 30 %mol,  $\text{Al}_2\text{O}_3$  desde 0 hasta 10 %mol, óxido de metal alcalinotérreo desde 0 hasta 20 %mol y óxido de metal alcalino desde 0,2 hasta 20 %mol, donde las indicaciones porcentuales se refieren al peso total de la fase de vidrio.

Para el aislamiento de ARN ha resultado ser muy apropiado, por ejemplo, una fase de vidrio que contiene  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{B}_2\text{O}_3$ ,  $\text{K}_2\text{O}$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3$  y  $\text{CaO}$ . Para el aislamiento de ADN ha resultado ser muy apropiado una fase de vidrio que contiene  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{B}_2\text{O}_3$  y  $\text{Na}_2\text{O}$ .

Según el procedimiento descrito anteriormente, la matriz de adsorción se añade preferentemente en una cantidad que corresponde a la cantidad mínima que se necesita para una fijación cuantitativa del analito presente en la muestra, en especial un ácido nucleico, o a una cantidad algo superior, preferentemente como máximo un 50% por encima y, muy preferentemente, como máximo un 20% por encima de dicha cantidad. La cantidad de ácido nucleico que se espera encontrar en diferentes tipos de muestras se puede averiguar previamente – si no se conoce de antemano – mediante las técnicas habituales, por ejemplo, la extracción con fenol-cloroformo y la subsiguiente medición de la densidad óptica.

La etapa (a) del procedimiento descrito anteriormente comprende la disgregación de la muestra en un tubo de reacción. Esta disgregación se realiza generalmente mediante lisis de las células presentes en la muestra en condiciones desnaturalizantes, por ejemplo añadiendo una proteasa y un tampón de desnaturalización. Como proteínasa se utiliza preferentemente proteínasa K, pronasa, elastasa o/y lisozima. Muy preferente es la utilización de proteínasa K.

La digestión de proteasa se realiza en un tampón de desnaturalización, que contiene preferentemente un compuesto caotrópico, por ejemplo urea o derivados de la urea, preferentemente una sal caotrópica, muy preferentemente una sal de guanidina tal como, por ejemplo hidrocloreuro de guanidina (especialmente para el aislamiento de ADN) o tiocianato de guanidina (especialmente para el aislamiento de ARN) o un perclorato o yoduro. Para las sales de guanidina son preferentes concentraciones en un rango de 1 hasta 3 mol/l.

Al contrario del método descrito por el documento WO 96/41811 para la preparación de muestras, la adición de la matriz de adsorción sólida tiene lugar solamente después de la disgregación de la muestra. Mediante esta gestión del proceso se consigue que la fijación no específica de componentes no deseados de la prueba, por ejemplo proteínas, a la matriz de adsorción sea significativamente menor.

Según la etapa (c) la fijación selectiva del analito a la matriz de adsorción se lleva a cabo mediante incubación en el tampón de disgregación, preferentemente en condiciones caotrópicas.

La etapa (d) del procedimiento descrito anteriormente comprende la separación de los componentes de la muestra no fijados de la matriz de adsorción. A tal efecto, se eliminan preferentemente los componentes de la muestra no fijados del tubo de reacción. Esto se puede llevar a cabo eventualmente mediante varias adiciones y eliminaciones de un tampón de lavado que tiene preferentemente un contenido de, como mínimo, el 50% (v/v) y muy preferentemente de, como mínimo, el 60% (v/v) de un solvente orgánico que puede ser mezclado con agua tal como, por ejemplo, etanol, propanol y acetona.

Las etapas (c), (d) o/y (e) del procedimiento descrito anteriormente se llevan a cabo preferentemente mezclando continua o intermitentemente (es decir, se alternan fases durante las que se mezcla con fases en las que el tubo de

reacción está en reposo) sin la adición de medios externos. Preferentemente, este mezclado se realiza mediante giro del tubo de reacción alrededor de su eje longitudinal invirtiendo varias veces el sentido de giro. Muy preferentemente el tubo de mezclado es girado exactamente alrededor de su eje longitudinal y el cambio de sentido de giro se lleva a cabo de tal manera que la desviación del menisco del líquido se quede por debajo de una cifra de separación predeterminada. Estos procedimientos de mezcla se han descrito en los documentos WO91/15768 y EP-A-0 435 481.

La duración de las etapas (c) o/y (e) es preferentemente de, como máximo, 20 minutos y comprende un mezclado continuo o un mezclado intermitente en ciclos breves, preferentemente en ciclos breves de preferentemente 2 minutos, como máximo. Se han obtenido muy buenos resultados mediante el mezclado intermitente con un ciclo de un minuto que comprendía 20 segundos de mezclado y 40 segundos de reposo.

Cuando se utilizan partículas magnéticas como matriz de adsorción, la adición de líquidos al tubo de reacción o la aspiración de líquidos del mismo puede llevarse a cabo con mezcla continua, siendo las partículas retenidas en el tubo de reacción durante el proceso de aspiración mediante la conexión del imán. Debido a esta técnica de mezclado, el procedimiento según la invención puede adaptarse de forma flexible a diferentes tipos de muestras. Además, se proporciona constantemente una distribución homogénea de las partículas magnéticas en la fase líquida.

La etapa (e) del procedimiento descrito anteriormente comprende la elución del analito de la matriz de adsorción. A tal efecto se puede utilizar, por un lado – tal como se conoce por el estado de la técnica – un tampón bajo en sal y substancialmente libre de disolventes orgánicos. Sorprendentemente se ha encontrado, sin embargo, que el tampón de elución puede contener reactivos adicionales tales como por ejemplo enzimas, por ejemplo enzimas utilizadas para la manipulación de ácidos nucleicos tales como las RNasas, DNasas, endonucleasas de restricción, ligasas, transferasas terminales o/y polimerasas. Si el analito es por ejemplo un ADN, se podrá añadir una RNasa libre de DNasa durante la elución para reducir el contenido en ARN no deseado. Por otra parte, si el analito es un ARN se podrá añadir una DNasa libre de RNasa durante la elución. Análogamente, se pueden añadir también otras enzimas tales como por ejemplo endonucleasas de restricción, etc. Si el ácido nucleico aislado mediante el procedimiento descrito anteriormente es sometido seguidamente a una amplificación, se podrá añadir también un MasterMix de amplificación de ácidos nucleicos que contiene el tampón de amplificación, nucleótidos, iniciadores, polimerasa y sales de tampón durante la elución.

La etapa (f) del procedimiento descrito anteriormente comprende la separación del eluato de la matriz de adsorción. Esta separación puede llevarse a cabo del modo habitual, por ejemplo por sedimentación, pero preferentemente por separación magnética.

Finalmente, los analitos aislados mediante el procedimiento descrito anteriormente pueden ser procesados posteriormente del modo conocido, en el caso de ácidos nucleicos por ejemplo mediante amplificación y subsiguiente detección, detección sin amplificación previa o secuenciación. A tal efecto se pueden suministrar alícuotas del eluato incluso a determinaciones de analitos diferentes, por ejemplo virus diferentes tales como VIH, VHC y VHB.

Una característica importante del procedimiento descrito anteriormente es que muchas etapas o, eventualmente, incluso todas las etapas pueden llevarse a cabo a substancialmente la misma temperatura, es decir dentro de un rango de temperatura de  $\pm 2,5^\circ\text{C}$ . Preferentemente esta temperatura se encuentra en el rango desde la temperatura ambiente hasta  $70^\circ\text{C}$ , más preferentemente desde la temperatura ambiente hasta  $40^\circ\text{C}$  y muy preferentemente a temperatura ambiente, es decir aproximadamente a 18 hasta  $32^\circ\text{C}$ . Según una realización preferente del procedimiento descrito anteriormente, a esta temperatura se llevan a cabo, como mínimo, las etapas (c) de adsorción y (d) de lavado. Muy preferentemente, se llevan a cabo a esta temperatura también otras etapas, en especial las etapas (a) de la disgregación o/y (e) de la elución. Para la determinación del VIH en muestras de sangre se puede realizar por ejemplo toda la preparación de la muestra a una temperatura uniforme. Después de la etapa (f) del procedimiento descrito anteriormente se puede llevar a cabo eventualmente una etapa de tratamiento posterior a una temperatura más elevada, debido a lo cual se mejora en determinados analitos el rendimiento durante la amplificación. Con otros analitos puede ser necesario que el tratamiento previo o/y la elución tengan lugar a una temperatura más elevada. La temperatura elevada está entonces preferentemente en un rango de más de  $40^\circ\text{C}$  hasta  $95^\circ\text{C}$ , por ejemplo en aproximadamente  $70^\circ\text{C}$ .

La realización del procedimiento descrito anteriormente se desarrolla preferentemente en un dispositivo automático. A continuación, se describirán ejemplos para estos dispositivos. Asimismo resulta preferente que el procedimiento descrito anteriormente para la preparación de muestras se lleve a cabo en un solo tubo de reacción, al menos las etapas (a) hasta (e), es decir que no se realice ninguna transferencia a otro tubo de reacción. Esto tiene como consecuencia una simplificación notable del procedimiento y, además, se reduce el riesgo de contaminación.

Otro objeto de la invención consiste en un kit de reactivos que resulta adecuado en especial para llevar a cabo el procedimiento descrito anteriormente y que comprende

- a) una proteasa,
- b) un tampón de disgregación de muestra,
- c) un tampón de lavado,
- d) un tampón de elución y
- 5 e) una suspensión de partículas de vidrio magnéticas.

En el contexto de la invención, además, resulta oportuno un kit de reactivos para el aislamiento de ADN que comprende partículas de vidrio magnéticas cuya fase de vidrio contiene SiO<sub>2</sub>, B<sub>2</sub>O<sub>3</sub> y Na<sub>2</sub>O.

- 10 Otro objeto de la invención consiste en un kit de reactivos para el aislamiento de ARN que comprende partículas de vidrio magnéticas cuya fase de vidrio contiene SiO<sub>2</sub>, B<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, CaO y K<sub>2</sub>O.

En el contexto de la presente invención, asimismo, resulta oportuno un dispositivo para aislar un analito de una muestra biológica que comprende:

- 15
- un preparador de muestras (1),
  - un dispositivo de alojamiento para los reactivos (2),
  - un primer dispositivo de alojamiento para tubos de reacción para la preparación de muestras (3) que están adaptados para una temperatura de servicio de ≤ 70°C, en especial ≤ 40°C,
  - 20 - un segundo dispositivo de alojamiento para tubos de reacción (4a, 4b, 4c) que contiene eventualmente refrigerantes o/y medios de calefacción,
  - y una herramienta de robótica (5).

25 El dispositivo descrito anteriormente está realizado preferentemente de tal manera que se prevé un solo tubo de reacción para llevar a cabo las 4 etapas principales de la preparación de la muestra, concretamente la disgregación de una muestra o lisis, la adsorción del analito liberado, por ejemplo un ácido nucleico, a una matriz de adsorción, por ejemplo a partículas de vidrio magnéticas, el lavado de la matriz de adsorción y la elución del analito de la matriz de adsorción.

30 El dispositivo está realizado de tal manera que el primer dispositivo de alojamiento está dispuesto para alojar el tubo de reacción para la preparación de la muestra, al menos para la adsorción del analito a la matriz de adsorción sólida y para el lavado de la matriz de adsorción. Según una realización preferente, el primer dispositivo de alojamiento está dispuesto, además, para la disgregación de la muestra o/y para la elución del analito de la matriz de adsorción. Los tubos de reacción para la preparación de la muestra tienen un volumen de preferentemente como mínimo 1 ml, por ejemplo 1-5 mL.

35 El segundo dispositivo de alojamiento está dispuesto para tubos de reacción destinados para la conservación o/y el procesado posterior del analito, por ejemplo tubos de PCR que presentan habitualmente una forma distinta de los tubos de reacción utilizados para la preparación de la muestra. Los tubos de reacción para la conservación o/y el procesado posterior tienen un volumen de preferentemente hasta 500 µl, por ejemplo 50-200 µl. Además, el segundo dispositivo de alojamiento puede contener tubos para reactivos que se necesitan para el procesado posterior de la muestra que contiene el analito, por ejemplo un MasterMix de PCR.

45 El dispositivo según la invención puede estar diseñado de tal manera que una o varias etapas de la preparación de la muestra o/y una etapa de tratamiento posterior pueden llevarse a cabo a una temperatura más elevada en el segundo dispositivo de alojamiento. A tal efecto, el segundo dispositivo de alojamiento puede estar dispuesto para alojar tubos de reacción para como mínimo una etapa de tratamiento seleccionada entre la disgregación de la muestra, la elución de la muestra de la matriz de adsorción y una etapa de tratamiento posterior tras la elución.

50 El primer dispositivo de alojamiento comprende preferentemente medios para la separación magnética. Asimismo, resulta preferente que el primer dispositivo de alojamiento comprenda medios para agitar los tubos de reacción, en especial mediante giro alrededor de su eje longitudinal. Estos medios pueden preverse eventualmente también para el segundo dispositivo de alojamiento.

55 La herramienta de robótica comprende generalmente dispositivos de pipeteado automáticos, así como, eventualmente, medios para transportar tubos de reacción, por ejemplo entre un primer y un segundo dispositivo de alojamiento. Además, puede estar integrada una unidad de apertura y cierre de tapa.

60 A continuación, se muestran en detalle formas de realización especiales para los dispositivos descritos anteriormente. Según la realización mostrada en la figura 1, el preparador de muestras (1) contiene un dispositivo de alojamiento para reactivos (2), un dispositivo de alojamiento para tubos de reacción para la preparación de la muestra (3) con las funciones de mezclado y separación magnética que se prevé realizar a una temperatura de preferentemente ≤ 40°C y muy preferentemente a temperatura ambiente. Asimismo, el dispositivo contiene una estación de alojamiento para otros tubos de reacción (4a), por ejemplo para tubos de PCR, que presenta una temperatura de 4°C hasta temperatura ambiente. Asimismo, el dispositivo contiene dispositivos automáticos para el pipeteado y la manipulación de tubos de reacción (5), que hacen posible desplazamientos en las direcciones X, Y y

Z. Según esta realización del dispositivo descrito anteriormente, las cuatro etapas principales de la preparación de la muestra, concretamente la lisis, la adsorción, el lavado y la elución tienen lugar en el primer dispositivo de alojamiento en un solo tubo de reacción. El almacenamiento de eluatos y la adición de otros reactivos, por ejemplo MasterMix de PCR tiene lugar en el segundo dispositivo de alojamiento. Para el procesado posterior, por ejemplo una PCR posterior, los tubos son transferidos a un dispositivo adecuado, por ejemplo un termociclador (no mostrado).

Según la realización mostrada en la figura 2, el dispositivo contiene un segundo dispositivo de alojamiento (4b) para alojar otros tubos de reacción para el procesado posterior, por ejemplo tubos de PCR, y se prevé el establecimiento de una temperatura de 4°C (enfriamiento del MasterMix de PCR) hasta 95°C para calentar el eluato tras la elución de la matriz de adsorción. Para evitar la formación de condensado en la tapa de los tubos de PCR resulta preferente un circuito de calefacción en contracorriente para la tapa.

Según la realización del dispositivo descrito anteriormente que se muestra en la figura 3, se prevé un segundo dispositivo de alojamiento para tubos de reacción (4c) que está destinado para alojar tubos de PCR y tubos de preparación de muestra. En este segundo dispositivo de alojamiento se puede realizar un enfriamiento, por ejemplo a 4°C y un calentamiento, por ejemplo a 95°C para calentar el lisado o/y el eluato. También en este caso resulta preferente un circuito de calefacción en contracorriente para la tapa a efectos de evitar la formación de condensado en la tapa de los tubos de reacción.

Según otra realización de la presente invención (no mostrada), el primer dispositivo de alojamiento está diseñado para establecer una temperatura en el rango de  $\leq 70^\circ\text{C}$ . El segundo dispositivo de alojamiento – tal como se muestra en la figura 3 – es apto para el enfriamiento y el calentamiento de tubos de procesado posterior de muestras y tubos de preparación de muestras.

Los dispositivos descritos anteriormente pueden ser utilizados especialmente para su aplicación en un procedimiento tal como se ha descrito anteriormente.

Asimismo, se explicará más detalladamente la presente solicitud por medio de los siguientes ejemplos y las figuras. En éstas se muestra:

En la figura la representación esquemática de una primera realización del dispositivo descrito anteriormente,

En la figura 2 la representación esquemática de una segunda realización del dispositivo descrito anteriormente,

En la figura 3 la representación esquemática de una tercera realización del dispositivo descrito anteriormente,

En la figura 4 el resultado de una detección de clamidia mediante PCR con una preparación de muestras manual y semiautomática,

En la figura 5 el resultado de una detección de clamidia mediante PCR con una preparación de muestras semiautomática y diferentes perfiles de temperatura durante la preparación de muestras,

En la figura 6 el resultado de una detección de VIH mediante PCR con una preparación de muestras manual (protocolo estándar) y una preparación de muestras semiautomática a temperatura ambiente.

#### **Ejemplos:**

1. Elaboración de partículas de vidrio magnéticas

Se utilizaron dos soles diferentes. La elaboración de los soles se realizó de la siguiente manera:

Sol 1: ( $\text{SiO}_2:\text{B}_2\text{O}_3:\text{Na}_2\text{O}=40:8:2$ ) (Referencia)

Los alcoholatos de los óxidos fueron mezclados entre sí según las relaciones de moles anteriores de forma análoga al procedimiento según los ejemplos 1 y 2 descritos por el documento WO96/41811 hasta formar una fase homogénea. Pero no se utilizó HCl.

A continuación, se mezclaron revolviendo 30 g de Iridin 600 Black Mica (Merk) en 100 ml de sol.

Sol 2: ( $\text{SiO}_2:\text{B}_2\text{O}_3:\text{K}_2\text{O}:\text{Al}_2\text{O}_3:\text{CaO}=76:15:5:2:2$ )

Los alcoholatos de los óxidos fueron mezclados entre sí según las relaciones de moles anteriores de forma análoga al procedimiento según los ejemplos 1 y 2 descritos por el documento WO96/41811 hasta formar una fase homogénea. Pero no se utilizó HCl.

A continuación, se mezclaron revolviendo 30 g de Iridin 600 Black Mica (Merk) en 100 ml de sol.

Seguidamente, los soles fueron sometidos a un proceso de secado por aspersión.

- 5 El polvo obtenido mediante el secado por aspersión fue sometido a una separación de partículas finas por sedimentación, a un tratamiento térmico en atmósfera de nitrógeno (60 l/h de caudal volumétrico) a una velocidad de calentamiento de 1 K/min y fue mantenido durante 1 hora a una temperatura de condensación en un rango de 600 hasta 700°C. A continuación, se enfrió el horno a 300°C y a esta temperatura se limpio durante 1 h con oxígeno. Una vez enfriado a temperatura ambiente, se extrajeron las partículas de vidrio magnéticas, se colocaron sobre un tamiz de 50 µm para separar la fracción gruesa y se tamizó.

10 Las partículas de vidrio magnéticas obtenidas a partir del 1er sol son adecuadas especialmente para el aislamiento de ADN. Las partículas de vidrio obtenidas a partir del 2º sol son adecuadas especialmente para el aislamiento de ARN.

- 15 2. Protocolo estándar para la preparación de muestras para el aislamiento de ácidos nucleicos, por ejemplo ADN

Para aislar ácidos nucleicos de muestras biológicas tales como, por ejemplo, sangre total o células cultivadas resulta adecuado el siguiente protocolo estándar. Los ácidos nucleicos obtenidos de este modo pueden ser utilizados para una amplificación por PCR, una disociación por restricción o transferencia de Southern directamente después de la elución.

El kit de reacción contiene:

- 25 1. Un tampón de unión (hidrocloruro de guanidina 4,7 mol/l, urea 10 mmol/l, Tris-HCl 10 mmol/l, 20% Triton® X-100, pH 5,7
2. Proteinasa K liofilizada (para su disolución en H<sub>2</sub>O a una concentración de 20 mg/ml)
- 30 3. Un tampón de lavado (56% (v/v) de etanol, 20 mmol/NaCl, Tris-HCl 10 mmol/l, pH 7,5)
4. Un tampón de elución (Tris 10 mmol/l pH 8,5)
- 35 5. Partículas de vidrio magnéticas (PVM)
- a) Pastillas con 7,5 mg de partículas de vidrio, respectivamente, o bien
- b) Una suspensión al 15% de las partículas de vidrio en etanol

40 Los componentes del kit son estables y pueden ser almacenados a temperatura ambiente. Tras la disolución de la proteinasa K en agua, se debería alicuotar la solución y conservarla a -20°C. La solución congelada es estable durante 12 meses.

Protocolo estándar

- 45 1. 200 µl de muestra se introducen en un tubo de reacción de 2 ml y se mezclan con 200 µl de tampón de unión y 40 µl de solución de proteinasa K. A continuación, se incuba durante 10 minutos. La incubación se realiza preferentemente a temperatura ambiente. Sin embargo, en determinadas circunstancias la temperatura de incubación también puede ser aumentada hasta 70°C.
- 50 2. Tras la incubación se añaden 200 µl de isopropanol y una pastilla de PVM (o alternativamente, 200 µl de PVM en suspensión) y se incuba durante 5 minutos a temperatura ambiente.
3. El tubo de reacción es introducido en un separador de partículas magnéticas (Boehringer Mannheim, Kat. No. 1 641 794) y se procede a la separación durante aproximadamente 1 minuto.
- 55 4. Se desecha el sobrenadante y se extrae los tubos de reacción del separador de partículas magnéticas.
5. Tras adición de 500 µl de tampón de lavado se mezcla el contenido del tubo de reacción y se introduce otra vez en el separador de partículas magnéticas durante aproximadamente 1 minuto.
- 60 6. Se desecha el sobrenadante. Se repite tres veces la etapa 5. Después del último proceso de lavado se elimina completamente el resto del tampón de lavado.
- 65 7. Para la elución se añaden 100 µl de tampón de elución eventualmente precalentado a 70°C. Luego se mezcla y se incuba durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se introduce la muestra en el separador de partículas magnéticas y se traslada el sobrenadante a un tubo de reacción limpio.

8. Los ácidos nucleicos obtenidos de esta manera, por ejemplo ADN, son estables y pueden ser sometidos a continuación directamente a un procesamiento posterior o ser conservados a 4°C.

5 El protocolo anterior puede utilizarse también de forma correspondiente en placas de microtitulación, por ejemplo placas de microtitulación de pocillos profundos (por ejemplo, Ritter, H.J. Bioanalytic).

### 3. Detección de ADN de Chlamydia trachomatis mediante PCR

#### 10 3.1 Protocolo estándar manual para la preparación de muestras

200 µl de una muestra de orina y 240 µl de un tampón de unión / una solución de proteinasa K (5:1) son pipeteados en un tubo de reacción de 2 ml, sometidos a un mezclado en vórtex e incubados a 70°C durante 10 minutos. Luego se enfría la muestra durante 5 minutos a temperatura ambiente.

15 Se añaden 200 µl de solución de PVM isopropanólica a la muestra mediante pipeteo. Inmediatamente después tiene lugar el mezclado en vórtex. Luego se incuba la muestra durante 15 minutos en un mezclador, por ejemplo en un termomezclador 5436 (tipo Eppendorf).

20 Las PVM son concentradas mediante la transferencia de la muestra a un separador magnético. Tras un minuto se elimina completamente el sobrenadante mediante pipeteado.

25 Se añaden 0,5 ml de tampón de lavado a las PVM mediante pipeteado. Se somete la muestra a un mezclado en vórtex y luego se transfiere al separador magnético. Tras 1 minuto se elimina el sobrenadante mediante pipeteado. El proceso de lavado se repite dos veces más.

30 Se añaden 200 µl de tampón de elución a las PVM. Se incuba la muestra durante 10 minutos a 70°C en un termomezclador a 1.400 RPM. Se recolecta el agua condensada mediante un breve centrifugado. Se transfiere la muestra al separador magnético y tras 1 minuto se quitan 180 µl de eluato. El eluato es pipeteado en un nuevo tubo de reacción y se conserva a 4°C (para un tiempo de conservación < 24 h) o a -20°C (para un tiempo de conservación más prolongado).

Para la PCR se utilizan 50 µl de eluato. La evaluación se realiza mediante electroquimioluminiscencia.

#### 35 3.2 Protocolo para un procedimiento semiautomático

En lugar del mezclado en vórtex descrito en el apartado 3.1 y el templado en un bloque térmico, se lleva a cabo un procedimiento semiautomático en el que el mezclado y el templado se realizan en un módulo de mezcla y templado. En la figura 4 se muestra una comparación de la determinación de clamidia (muestra: 100 anticuerpos elementales por 100 ml de orina; determinación séxtuple) entre el protocolo estándar manual (vórtex) y el procedimiento semiautomático (MTM). Se puede ver que la automatización no afecta a la sensibilidad.

#### 3.3 Protocolo semiautomático a temperatura ambiente

45 La preparación de muestras se lleva a cabo tal como se ha descrito en el apartado 3.2. La lisis y la elución se realizan sin embargo a temperatura ambiente.

#### 50 3.4 Protocolo de preparación de muestras semiautomático a temperatura ambiente con subsiguiente tratamiento posterior del eluato

La preparación de muestras se lleva a cabo tal como se describe en el apartado 3.3. Tras la elución se procede a una incubación durante 10 minutos a 70°C.

55 En la figura 5 se muestra una comparación de la determinación de clamidia (muestras: SWE1, anticuerpos elementales de clamidia O (EAK) por ml de orina, SWE 2:10 EAK, SWE 3:100 EAK y SWE 4:1000 EAK por ml de orina, respectivamente) entre los protocolos de preparación de muestras descritos en los apartados 3.2, 3.3 y 3.4. Se puede ver que para la determinación de clamidia el protocolo estándar es más sensible con respecto a una preparación de muestras a temperatura ambiente (protocolo RT MTM). Los resultados de la preparación de muestras a temperatura ambiente con subsiguiente tratamiento posterior del eluato (protocolo RT MTM con tratamiento posterior) muestran sin embargo que este efecto puede ser compensado mayoritariamente. Por lo tanto, sorprendentemente no se requiere ninguna etapa de temperatura durante la preparación de muestras propiamente dicho.

65 Debido a este conocimiento el procedimiento de preparación de muestras se deja simplificar de forma decisiva, ya que las etapas de lisis, adsorción, lavado y elución pueden llevarse a cabo a temperaturas de ≤ 40°C lo cual simplifica la automatización, dado que no se requieren ni circuito de calefacción en contracorriente ni regulación de



temperatura.

#### 4. Detección de ARN de VIH mediante PCR

##### 5 4.1 Protocolo estándar manual para la preparación de muestras

Se descongela plasma congelado durante 5 minutos a 37°C y se enfría sobre hielo para su procesado posterior.

10 Se pipetea 50 µl de una solución de proteinasa K (25 mg/ml) en un tubo Sarstedt de 1,5 ml. Se añaden 250 µl de muestra y se mezcla en vórtex. A continuación, se añaden 300 µl de tampón de lisis y se vuelve a mezclar en el vórtex.

15 Se incuba durante 10 minutos a temperatura ambiente en un mezclador tipo Eppendorf a 13.000 RPM. Luego se añaden 300 µl de una suspensión de PVM (6 mg/ml de PVM en isopropanol), se mezcla en vórtex y se incuba durante 20 minutos a temperatura ambiente mezclando continuamente. Las PVM son separadas en un separador magnético y se elimina completamente el sobrenadante.

20 Se añaden 750 µl de tampón de lavado a las PVM. Las mismas son resuspendidas y separadas tal como se ha descrito anteriormente. El proceso de lavado se repite cuatro veces, siendo eliminado al final el tampón de lavado cuidadosamente.

25 Luego se añaden 100 µl de tampón de elución y las PVM son resuspendidas. Tras una incubación de 15 minutos a 80°C en un termomezclador tipo Eppendorf (13.000 RPM) se transfieren 90 µl de eluato a un nuevo tubo de reacción. Para la siguiente determinación de VIH mediante RT-PCR se utilizan 40 µl de eluato.

##### 4.2 Protocolo estándar semiautomático para la preparación de muestras

30 La preparación de las muestras se lleva a cabo tal como se describe en el apartado 4.1, salvo que el mezclado y el templado se realizan en un módulo de mezcla y de templado.

##### 4.3 Protocolo semiautomático a temperatura ambiente

35 La preparación de las muestras se lleva a cabo substancialmente tal como se describe en el apartado 4.2, salvo que todas las etapas se llevan a cabo a temperatura ambiente. El tiempo de incubación para lisis, adsorción y elución es de 15 minutos, respectivamente.

40 De la figura 6 se desprende que la automatización y la preparación de las muestras a temperatura ambiente (protocolo RT MTM) no afectan a la sensibilidad con respecto al protocolo estándar para la preparación manual de las muestras (manual). Se obtienen resultados reproducibles tanto con plasma negativo, como con plasma positivo bajo, positivo medio o positivo alto.

**REIVINDICACIONES**

1. Kit de reactivos para el aislamiento de ARN que comprende partículas de vidrio magnéticas cuya fase de vidrio contiene  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{B}_2\text{O}_3$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{CaO}$  y  $\text{K}_2\text{O}$ , así como

5

- a) una proteasa,
- b) un tampón de disgregación de muestra,
- c) un tampón de lavado,
- d) un tampón de elución.

10

2. Partículas de vidrio magnéticas que comprenden un núcleo magnético y una envoltura de vidrio que contiene  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{B}_2\text{O}_3$ ,  $\text{K}_2\text{O}$  y  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , así como  $\text{CaO}$ .

Figura 1

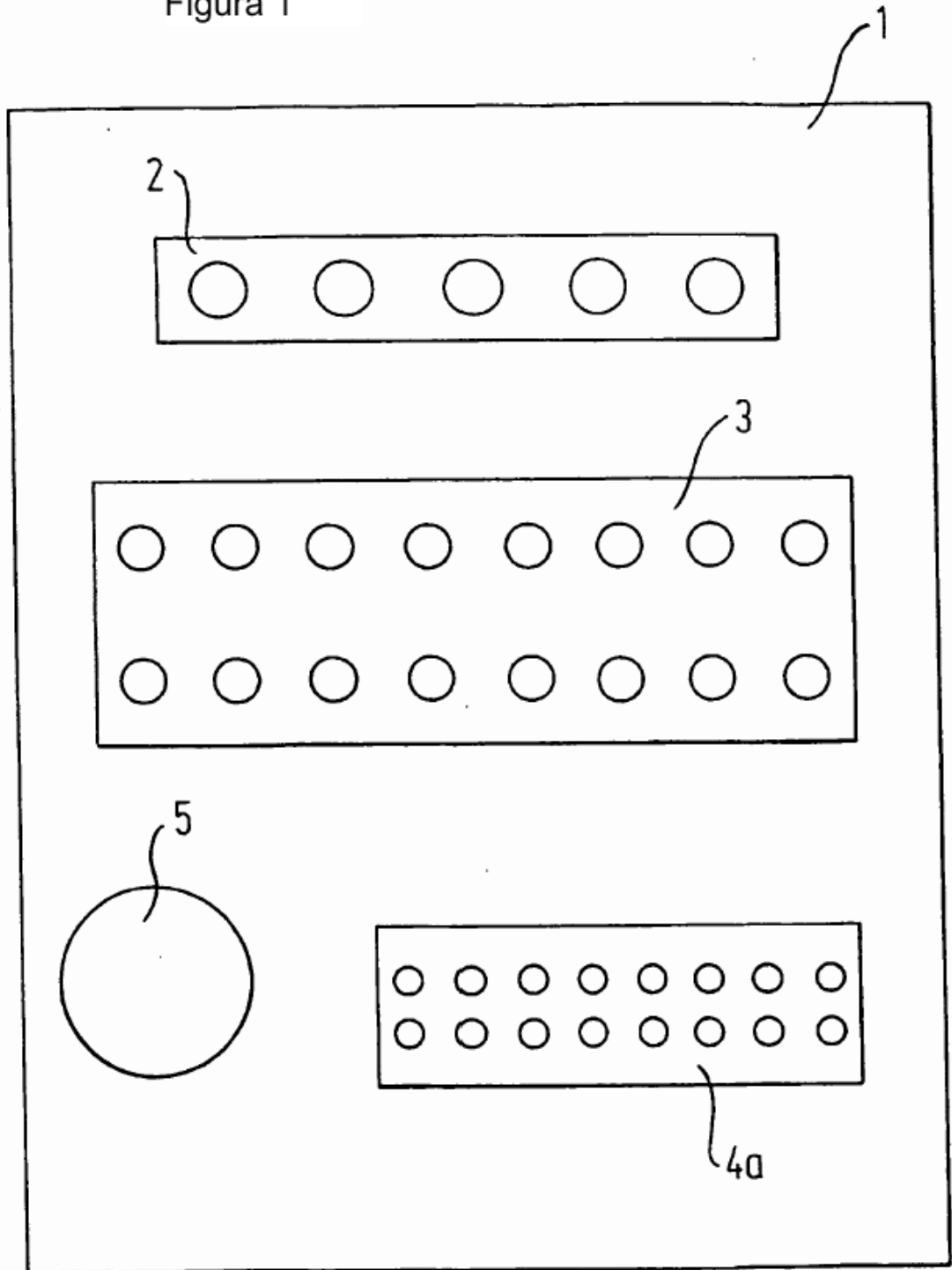


Figura 2

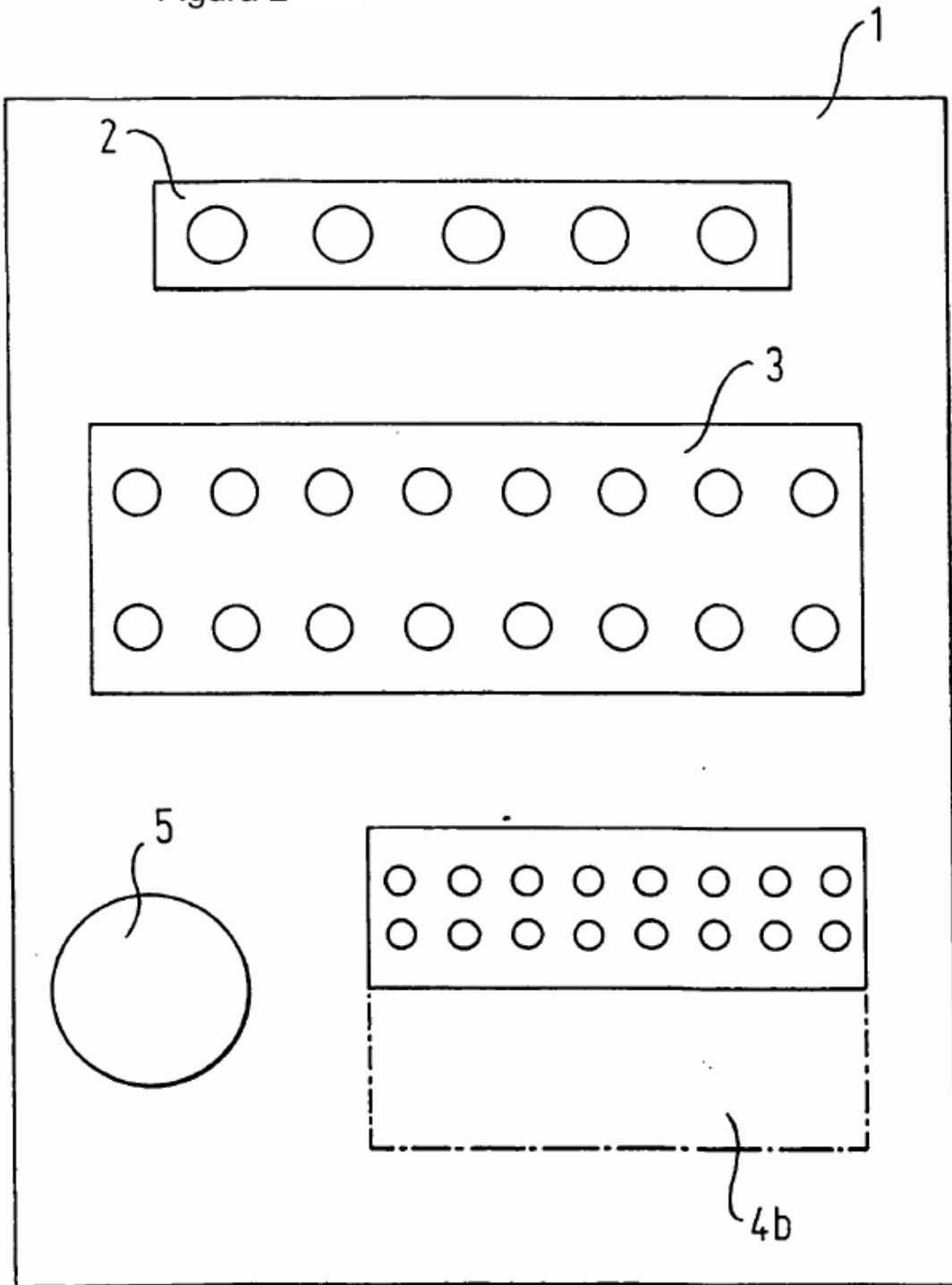


Figura 3

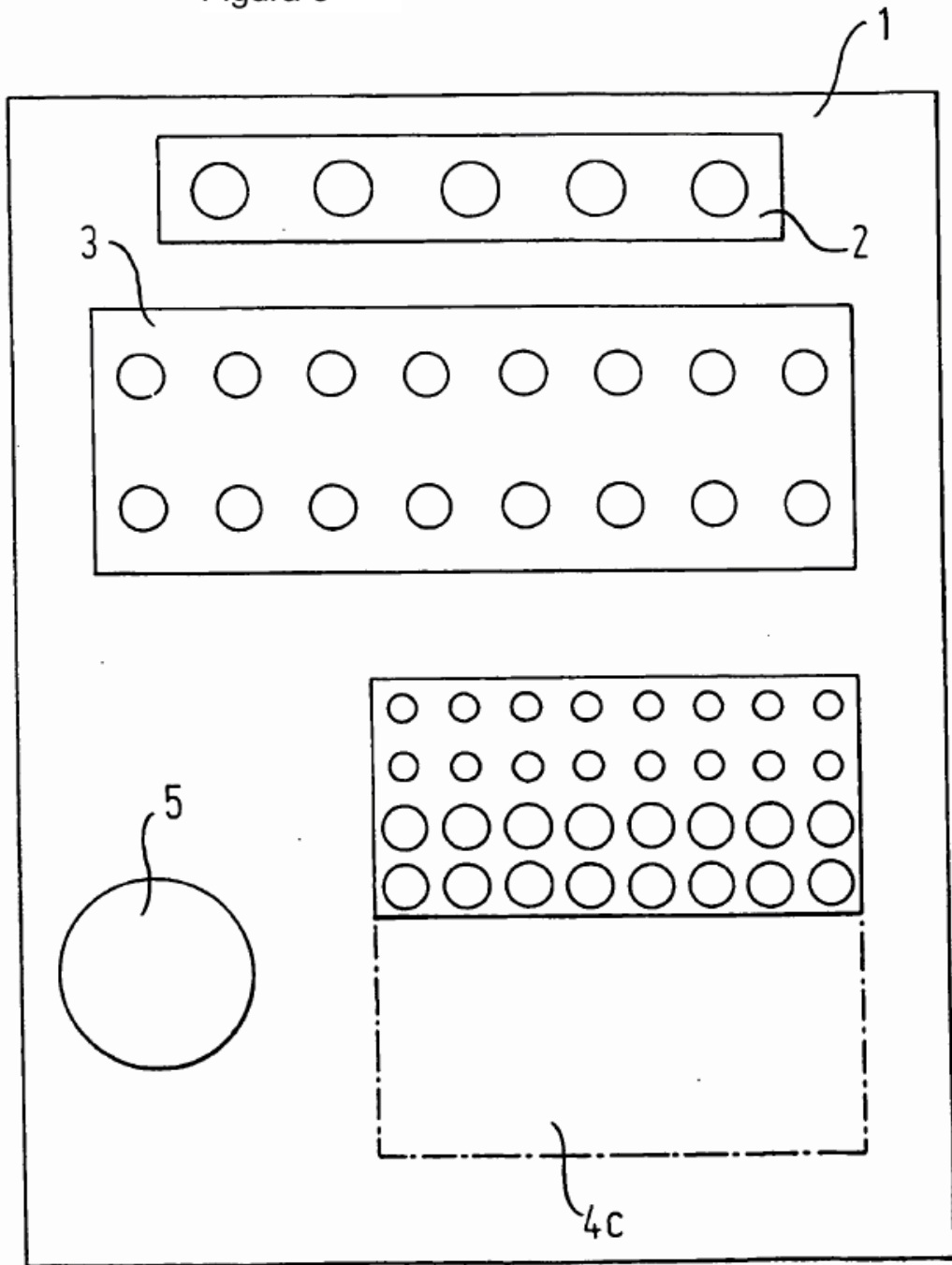


Figura 4

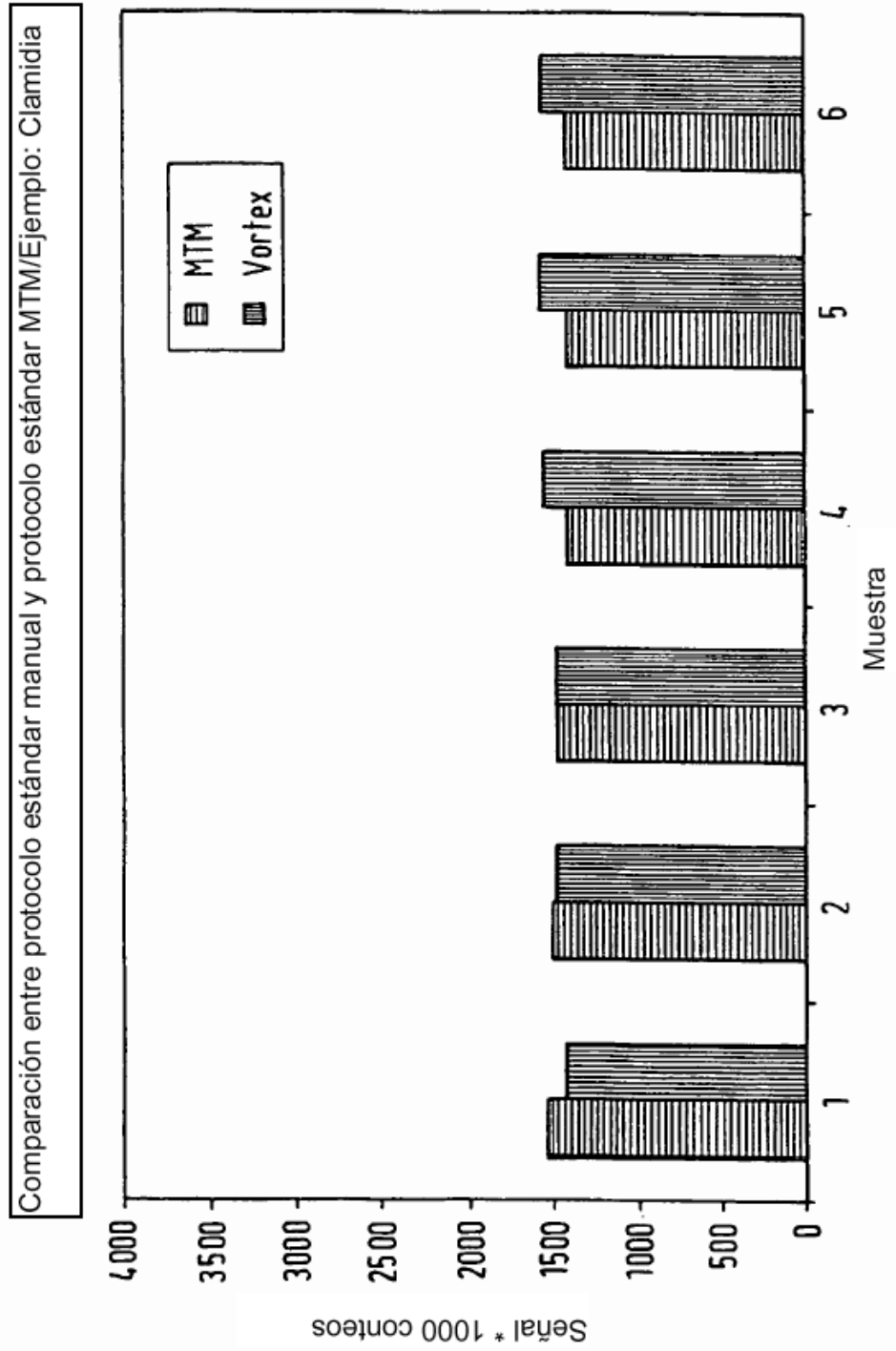


Figura 5

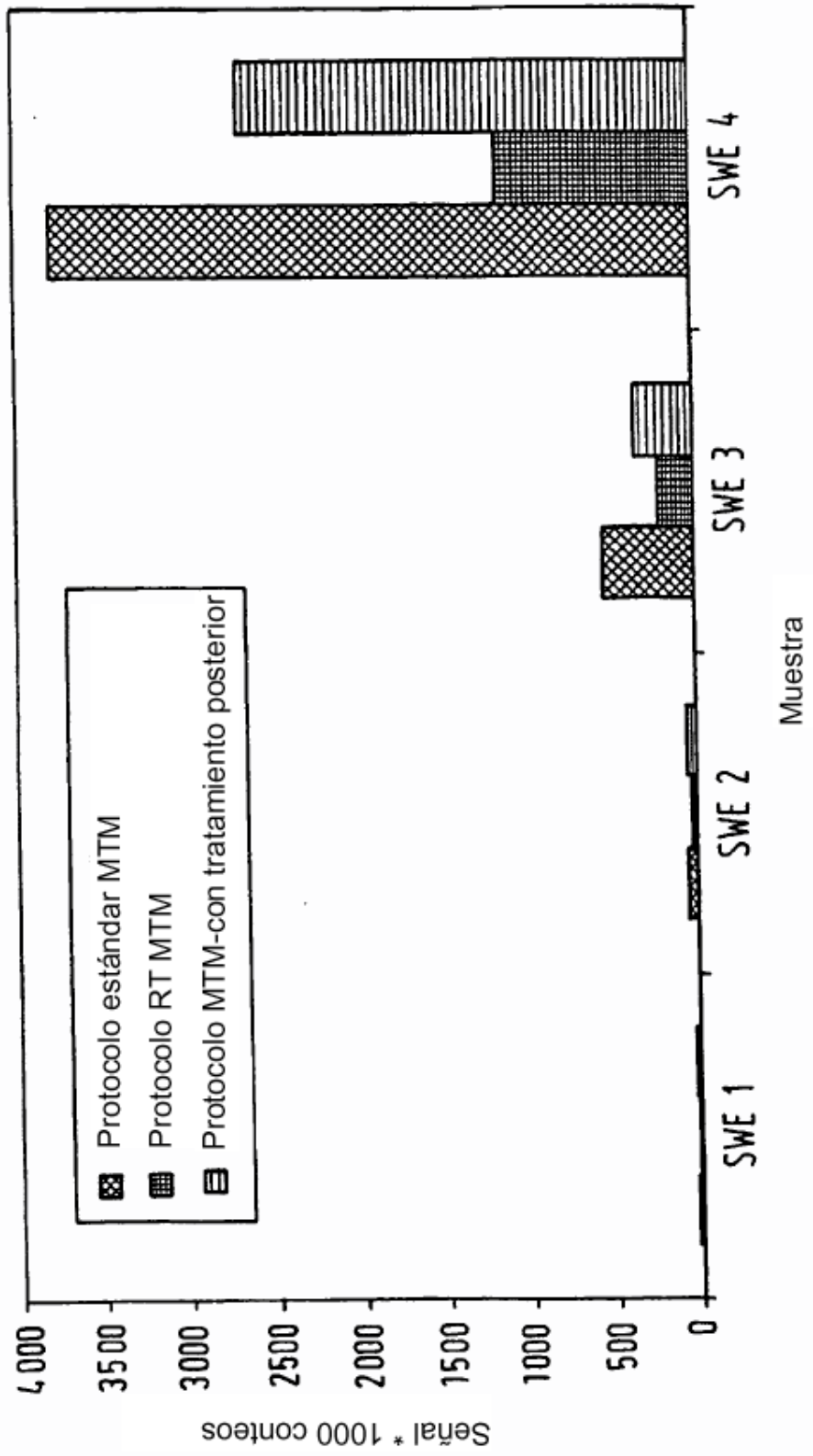


Figura 6

