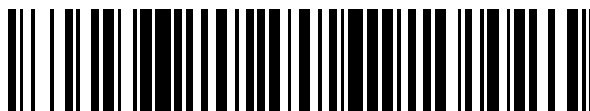


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 621 268**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.12.2011** **E 11193696 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.01.2017** **EP 2465947**

54 Título: **Matriz genérica para ácidos nucleicos de control**

30 Prioridad:

17.12.2010 EP 10195777

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

03.07.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

RUSSMANN, EBERHARD;
EICKHOFF, MEIKE;
ZIMMERMANN, DIRK y
WÖLFELSCHNEIDER, ANDREAS

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 621 268 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

Matriz genérica para ácidos nucleicos de control

5 Campo de la invención

La presente invención pertenece al campo del diagnóstico in vitro. En este ámbito, se refiere en particular al aislamiento, amplificación y detección de al menos un primer ácido nucleico diana que puede estar presente en al menos una muestra de fluido usando un ácido nucleico de control interno con fines cualitativos y/o cuantitativos y al menos un ácido nucleico de control externo en un tampón acuoso.

Antecedentes de la invención

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

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 ligasa polimerasa, Gap-LCR, reacción en cadena de reparación, 3SR, NASBA, amplificación por desplazamiento de cadenas (SDA), amplificación mediada por transcripción (TMA) y amplificación Q β .

Los sistemas automatizados para análisis basados en PCR usan frecuentemente la detección en tiempo real de la amplificación del producto durante el proceso de PCR en el mismo recipiente de reacción. La clave para tales métodos es el uso de oligonucleótidos modificados que llevan grupos marcadores.

Se ha demostrado que es posible la amplificación y detección de más de un ácido nucleico diana en el mismo recipiente. Este método se denomina amplificación "multiplex" y requiere diferentes marcadores para distinguir si se realiza una detección en tiempo real.

Es deseable o incluso obligatorio en el campo del diagnóstico clínico de ácidos nucleicos controlar la correspondiente amplificación utilizando ácidos nucleicos de control con una secuencia conocida, para el control cualitativo (control de rendimiento) y/o cuantitativo (determinación de la cantidad de un ácido nucleico diana usando el control como referencia). Dada la diversidad especialmente de dianas diagnósticas, que comprenden ácidos nucleicos procarióticos, eucarióticos así como virales, y dada la diversidad entre diferentes tipos de ácidos nucleicos tales como RNA y DNA, los ácidos nucleicos de control se suelen diseñar de una manera específica.

En un entorno de diagnóstico in vitro, los ensayos basados en la amplificación y detección de ácido nucleico se controlan típicamente externamente, es decir, el ácido nucleico de control respectivo se procesa en un recipiente separado del ácido nucleico diana. Puede servir como un ácido nucleico de control externo cualitativo o cuantitativo. En una configuración cualitativa, el control sirve como control positivo para evaluar la validez de la reacción de amplificación y detección. En un ajuste cuantitativo, el control sirve, alternativamente o adicionalmente, como una referencia para determinar la cantidad o concentración del ácido nucleico diana.

Las muestras de fluido derivadas de fluidos biológicos tales como, por ejemplo, sangre humana, a menudo presentan una complejidad significativa. Por lo tanto, con el fin de imitar la matriz fluida de las muestras biológicas que contienen posiblemente uno o más ácidos nucleicos diana, los ácidos nucleicos de control externos utilizados en el diagnóstico in vitro normalmente tienen que proporcionarse esencialmente en la misma matriz de fluido que dichas muestras biológicas. Por ejemplo, para el análisis de ácidos nucleicos de plasma humano, se proporciona generalmente un ácido nucleico de control externo en plasma humano normal (NHP, plasma combinado de varios donantes sanos), especialmente para cumplir con los requisitos reglamentarios (Guidance for Industry and FDA Staff - Assayed and Unassayed Quality Control Material, 2007, Sección IV, B, 1. Efectos de la matriz).

El manual para Roche Molecular System "cobas ® TM TaqScreen MPX Test for use on the cobas s 201 system" (Nov 2009), por ejemplo, describe la matriz de fluido como una mezcla de plasma derivado de sangre de múltiples individuos, con las consecuencias de que su contenido presenta variaciones significativas entre lotes. Esto puede incluir la presencia o concentración de ciertos inhibidores de la amplificación tales como la hemoglobina o con actividad variable de la nucleasa.

El manual de Roche para el ensayo "cobas ® TM AmpliPrep/COBAS TM TaqMan TM HIV-1 Test" así como Meng et al. (J. Clin. Microbiol, vol. 38, Nº 8, agosto de 2001) describen de manera similar un ácido nucleico de control externo en plasma humano negativo para la detección por PCR de ácidos nucleicos vírico.

Huang et al. (Intervirolgy, vol. 51, N° 1, enero de 2008) describen RNA armado de doble especificidad que se introduce en muestras de plasma como ácidos nucleicos de control.

5 Otros dos manuales de Roche, para el sistema de cribado de donantes cobas® s201 (enero de 2009) y el sistema cobas® s201 para el cribado de donantes NAT, se refieren a pruebas de detección de sangre que incluyen casetes de reactivos listos para usar con reactivos de amplificación y detección y control para su adición a las correspondientes muestras de donantes.

10 El documento WO 03/057910 A2 describe la provisión de un ácido nucleico de control de HCV en una solución madre específica para la adición a muestras biológicas.

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

15 Descripción de la invención

En un primer aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para aislar y amplificar un ácido nucleico diana que puede estar presente en al menos una muestra de fluido, comprendiendo dicho procedimiento las etapas automatizadas de:

- a. Añadir un ácido nucleico de control interno a dicha muestra de fluido
- b. Combinar juntos un material de soporte sólido y dicha muestra de fluido en un recipiente durante un periodo de tiempo y bajo condiciones suficientes para permitir que los ácidos nucleicos que comprenden el ácido nucleico 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 la muestra de fluido en una estación de separación
- d. Purificar los ácidos nucleicos en dicha estación de separación y lavar el material de soporte sólido una o más veces con un tampón de lavado
- e. Poner en contacto el ácido nucleico diana purificado y el ácido nucleico de control interno purificado en al menos un primer recipiente y al menos un ácido nucleico de control externo en un tampón acuoso en al menos un segundo recipiente con uno o más reactivos de amplificación
- f. Incubar en dichos recipientes de reacción dicho ácido nucleico diana purificado, dicho ácido nucleico de control interno purificado y dicho al menos un ácido nucleico de control externo en un tampón acuoso con dichos uno o más reactivos de amplificación durante un periodo de tiempo y bajo condiciones suficientes para que ocurra una reacción de amplificación indicativa de la presencia o ausencia de dicho ácido nucleico diana y de dichos ácidos nucleicos de control

en donde las condiciones para la amplificación en las etapas e. a f son idénticas para dicho ácido nucleico diana purificado, dicho ácido nucleico de control interno y dicho al menos un ácido nucleico de control externo en un tampón acuoso, y en el que dicho al menos un ácido nucleico de control externo en un tampón acuoso se somete a las etapas posteriores a la etapa a .

El procedimiento descrito anteriormente es particularmente ventajoso ya que no implica ningún medio natural o complejo tal como por ejemplo, plasma humano normal como una matriz de fluido para el control externo, sino un tampón acuoso que es sobre todo significativamente más fácil y más barato de producir, de manipular y almacenar. Además, dado que el plasma humano normal deriva de la sangre de varios individuos, su contenido presenta variaciones considerables. Esto incluye la presencia potencial, por ejemplo, de inhibidores de la amplificación, o nucleasa tal como por ejemplo, actividad DNasa.

En el primer caso, la presencia de dichos inhibidores puede poner en peligro la idoneidad del plasma humano normal para servir como una matriz fluida para un ácido nucleico de control externo. Los resultados de la amplificación y detección de dicho ácido nucleico de control externo varían considerablemente de un lote a otro de dicho plasma humano normal, o incluso de una muestra a otra. En el caso de un lote de plasma humano normal que muestra, por ejemplo, actividad significativa de DNasa, el lote completo tiene que ser desechado ya que los ácidos nucleicos no son estables en el mismo.

Un tampón acuoso que sirve como una matriz fluida para un ácido nucleico de control externo, tal como se usa en la presente invención, supera estas desventajas. Dado que dicho tampón se produce sintéticamente, la ausencia de inhibidores de amplificación o nucleasas puede controlarse con relativa facilidad. Tales moléculas no deseadas pueden entrar solamente en dicho tampón como resultado de eventos de contaminación, pero el experto en la técnica está al tanto de las medidas adecuadas para evitar tal contaminación. Por lo tanto, en realizaciones preferidas, los ácidos nucleicos de control externo pueden incluso almacenarse en dicho tampón acuoso antes de ser procesados, lo que puede ser problemático en medios complejos tales como plasma humano normal. Estas y otras razones hacen que la presente invención sea particularmente ventajosa si la muestra de fluido es sangre o plasma sanguíneo, especialmente sangre humana o plasma sanguíneo.

Los siguientes tipos de ácidos nucleicos de control se incluyen en el procedimiento de acuerdo con la invención:

- Nucleótido de control interno:

Actúa como control completo del proceso (es decir, purificación de ácido nucleico, amplificación, y preferiblemente detección)

Actúa como monitor sobre los efectos comprometedores sobre la reacción diana que están relacionados con la composición de la muestra específica

- Ácido nucleico de control externo en un tampón acuoso:

Monitoriza la integridad de los reactivos específicos del ensayo

Monitoriza la capacidad del sistema para detectar una señal específica de la diana

no necesita actuar como un control de proceso completo y por lo tanto no necesita ser fabricado dentro de una matriz de muestra.

"Tampón acuoso" significa cualquier sustancia tampón química disuelta en agua, y no comprende tampones biológicos derivados de fuentes naturales, tales como por ejemplo, sangre o plasma sanguíneo. Los tampones acuosos particularmente útiles en el contexto de la invención son, por ejemplo, Tris, Tricina, HEPES, MOPS, tampones citrato tales como por ejemplo, citrato de sodio u otros tampones conocidos por el experto en la técnica. En una realización preferida, el tampón acuoso es Tris. En otra realización preferida, el tampón acuoso es Tricina. Preferiblemente, dicho tampón acuoso contiene un agente quelante tal como por ejemplo, EDTA o EGTA, u otros. Mediante la unión a complejos, estos agentes coordinan cationes que sirven como cofactores para diversas enzimas que pueden dañar los ácidos nucleicos, particularmente nucleasas que dependen en su mayor parte de Mg^{2+} . Preferiblemente, el tampón acuoso descrito anteriormente contiene EDTA. Además, el tampón acuoso contiene preferiblemente un agente conservante. Estos agentes son conocidos por el experto en la técnica. En una realización preferida, el tampón acuoso descrito anteriormente contiene azida de sodio. Se prefiere que dicho tampón acuoso contenga además agentes que estabilicen el ácido nucleico de control externo, preferiblemente macromoléculas, como por ejemplo RNA poli(rA) o glicógeno, en el que se prefiere especialmente poli(rA)RNA. Preferiblemente, el tampón acuoso descrito anteriormente tiene un pH neutro o alcalino, preferiblemente de un valor de 6, 6,5, 7 ó 7,5, a un valor de 8,5, 9, 9,5, 10, 10,5, 11, 11,5 o 12. La mayoría preferiblemente, el tampón acuoso tiene un pH de aproximadamente 8.

En una realización preferida de la invención, el tampón acuoso mencionado anteriormente comprende los siguientes constituyentes:

- Tris: Preferiblemente en una concentración desde un valor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o 9 mM, a un valor de 12,5, 15, 17,5, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 mM. Más preferiblemente, la concentración es de aproximadamente 10 mM.

- EDTA: Preferiblemente en una concentración desde un valor de 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08 o 0,09 mM, a un valor de 0,125, 0,15, 0,175, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 o 1 mM. Lo más preferiblemente, la concentración es de aproximadamente 0,1 mM.

- Azida sódica: preferiblemente en una concentración desde un valor de 0,005, 0,01, 0,02, 0,03 o 0,04% (p/v), a un valor de 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1 o 0,5% (p/v). Más preferiblemente, la concentración es de aproximadamente 0,05% (p/v).

- RNA poli(rA): Preferiblemente en una concentración desde un valor de 1, 2,5, 5, 7,5, 10, 12,5, 15 ó 17,5 mg/l a un valor de 22,5, 25, 27,5, 30, 40, 50, 75, 100, 150, 175 o 200 mg/l. Más preferiblemente, la concentración es de aproximadamente 20 mg/l.

Otra ventaja considerable es la independencia de la elección de dicho tampón acuoso del tipo de muestra de fluido, lo cual es posible debido a la presencia de un control interno dentro de dicha muestra o muestras además de dicho ácido nucleico de control externo en una solución acuosa buffer. El hecho de que un control interno esté presente en la muestra o en las muestras suprime la necesidad de elegir una matriz de fluido para el control externo, en donde dicha matriz de fluido imita la matriz de fluido de la muestra o muestras lo más estrechamente posible. El ácido nucleico de control interno como tal es capaz de controlar la presencia o ausencia potencial de, por ejemplo, sustancias inhibitoras en la muestra, tales como, por ejemplo, inhibidores de PCR que posiblemente interfieren con los procedimientos analíticos. Por lo tanto, el ácido nucleico de control externo no necesita estar dentro de una matriz fluida que se asemeja mucho a la muestra de fluido a analizar, pero dicha matriz fluida puede ser cualquier tampón acuoso tal como un tampón acuoso químico.

Esta circunstancia es especialmente ventajosa cuando se prepara y analiza un panel de ácidos nucleicos de diferentes fuentes tales como, por ejemplo, muestras clínicas en diferentes fluidos corporales, por ejemplo plasma

sanguíneo, esputo o hisopos nasales. En tal caso, el ácido nucleico de control externo puede proporcionarse en el mismo tampón acuoso en lugar de proporcionarse en todas las matrices de fluido de plasma sanguíneo, esputo e hisopo nasal. Si estas diferentes muestras se preparan y analizan en una disposición integral de recipientes tales como una placa de pocillos múltiples, incluso un pocillo que contiene un ácido nucleico de control externo en un tampón acuoso puede ser suficiente, por ejemplo, si el ácido nucleico diana es el mismo en todas las muestras, o si dicho ácido nucleico de control externo es genérico, es decir, adecuado para diferentes ácidos nucleicos.

Además de los ácidos nucleicos de control interno y externo mencionados anteriormente, también puede ser ventajoso incluir un control negativo en el proceso. El "control negativo" es también un control externo, sin embargo no hay ácido nucleico incluido. Este control también se denomina "control de contaminación", ya que un resultado positivo en dicho control es indicativo de una contaminación de uno o más componentes de ensayo. En tal caso, no se considera válida la realización de la correspondiente prueba. Por lo tanto, el control negativo sirve como una medida de los eventos de contaminación en el sistema y por lo tanto no necesita ser fabricado dentro de una matriz de muestra.

En una realización preferida, el control negativo se somete a todas las etapas del procedimiento de acuerdo con la invención después de la etapa a. En tal realización, el control negativo sirve como un control de proceso completo para la contaminación, es decir, también es adecuado para monitorizar contaminantes potenciales introducidos durante el procedimiento de preparación de la muestra.

El control negativo preferiblemente en esencia sólo consiste en una matriz fluida tal como un tampón acuoso. En una realización preferida de la invención, el control negativo es el mismo tampón acuoso que el tampón acuoso usado para el ácido nucleico de control externo. De nuevo, no hay necesidad de utilizar una matriz similar o idéntica a la matriz de muestra, ya que en el procedimiento de acuerdo con la invención se incluye un ácido nucleico de control interno. Por lo tanto, en una realización preferida adicional, el control negativo es agua, preferiblemente agua destilada o desionizada.

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

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

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

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

En una configuración no competitiva, el ácido nucleico de control interno tiene una secuencia diferente de cualquier secuencia diana, con el fin de no competir por sus cebadores y/o sondas. Preferiblemente, la secuencia del ácido nucleico de control interno es diferente de las otras secuencias de ácido nucleico en la muestra de fluido. Como ejemplo, si la muestra de fluido deriva de un ser humano, el ácido nucleico de control interno preferiblemente no tiene una secuencia que también se produce endógenamente dentro de los seres humanos. La diferencia en la secuencia debería por lo tanto ser al menos lo suficientemente significativa como para no permitir la unión de cebadores y/o sondas al correspondiente ácido o ácidos nucleicos endógenos bajo condiciones rigurosas y por lo tanto dejar que el ajuste sea competitivo. Con el fin de evitar dicha interferencia, la secuencia del ácido nucleico de control interno utilizado en la invención deriva preferiblemente de una fuente diferente del origen de la muestra de fluido. Preferiblemente, deriva de un genoma de origen natural, preferiblemente un genoma de planta, más preferiblemente de un genoma de uva. En una realización muy preferida, se codifica un ácido nucleico derivado de un genoma de origen natural. Como se conoce en la técnica, "codificación" significa introducir en una secuencia ciertas mutaciones de base en una secuencia. Preferiblemente, la secuencia del ácido nucleico de control interno utilizado en la invención se altera sustancialmente con respecto al gen de origen natural del que deriva.

Otro aspecto preferido de la invención se refiere al procedimiento descrito anteriormente, en el que al menos un primer y un segundo ácido nucleico diana se amplifican en el mismo recipiente de reacción, permitiendo de este modo la amplificación simultánea de un mayor número de diferentes ácidos nucleicos diana, ya que las señales en diferentes recipientes de reacción pueden ser detectadas independientemente entre sí. Esta reacción multiplex puede tener lugar en múltiples recipientes de reacción, multiplicando así el número de dianas que pueden amplificarse simultáneamente usando el mismo tampón acuoso para el ácido nucleico de control externo y

preferiblemente el mismo control negativo.

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

Por lo tanto, una realización preferida adicional de la invención es el procedimiento descrito anteriormente, en el que el segundo ácido nucleico diana está ausente del primer recipiente de reacción.

Especialmente si se sospecha que una muestra de fluido contiene ácidos nucleicos diana de diferentes organismos, o incluso los diferentes organismos como tales, o si no está claro cuáles de los diferentes ácidos nucleicos o organismos pueden estar presentes en dicha muestra, una realización ventajosa y por lo tanto preferida de la invención es el procedimiento descrito anteriormente, en el que al menos un primer y un segundo ácido nucleico diana pueden estar presentes en dicha muestra, en donde dichos ácidos nucleicos diana son preferiblemente de organismos diferentes.

Como se mencionó anteriormente, el método descrito anteriormente es útil para controlar cualitativa o cuantitativamente la amplificación de uno o más ácidos nucleicos diana.

La detección cualitativa de un ácido nucleico en una muestra biológica es crucial, por ejemplo, para reconocer una infección de un individuo. De este modo, un requisito importante para un ensayo para la detección de, por ejemplo, una infección microbiana es que se eviten los resultados falsos negativos o falsos positivos, ya que tales resultados conducirían casi inevitablemente a consecuencias graves con respecto al tratamiento del correspondiente paciente. De este modo, especialmente en los métodos basados en PCR, se añade principalmente al ensayo un ácido nucleico de control externo o 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 correspondiente ácido nucleico diana, la reacción de control tiene que actuar reactivamente dentro de unos ajustes dados, es decir, el ácido nucleico de control debe ser detectado, de lo contrario la prueba en sí se considera inoperativa. Sin embargo, en una configuración cualitativa, dicho control no tiene necesariamente que ser detectado en caso de un resultado positivo. Para las pruebas cualitativas, es especialmente importante que la sensibilidad de la reacción esté garantizada y por lo tanto estrictamente controlada. Como consecuencia, la concentración del ácido nucleico de control cualitativo debe ser relativamente baja, de modo que incluso en una situación, por ejemplo, de ligera inhibición el ácido nucleico de control cualitativo no se detecte y por lo tanto la prueba sea inválida.

El uso de un ácido nucleico de control interno tiene la ventaja de controlar el rendimiento de la reacción in situ, es decir, por ejemplo, posibles agentes inhibidores que pueden haberse introducido con la muestra.

Por lo tanto, un aspecto preferido de la invención es el procedimiento descrito anteriormente, en el que la presencia de un producto de amplificación de dicho ácido nucleico de control interno es indicativa de una amplificación que tiene lugar en el recipiente que contiene el ácido nucleico diana purificado y el ácido nucleico control interno purificado, incluso en ausencia de productos de amplificación para dicho ácido nucleico diana.

Por otra parte, si se usa un ácido nucleico de control externo en un tampón acuoso como control cualitativo, monitoriza la capacidad principal de la diana a amplificar independientemente de la muestra, proporcionando así un medio para controlar las condiciones físicas bajo las que se lleva a cabo la incubación. Por ejemplo, en una PCR, el ácido nucleico de control externo no se amplificaría en el caso de un perfil inapropiado, es decir, a temperaturas de incubación y/o tiempos de incubación inadecuados. Una falta de amplificación de dicho ácido nucleico de control externo también puede apuntar a defectos en los reactivos de amplificación específicos (tales como cebadores específicos) o reactivos de amplificación no específicos (tales como, por ejemplo, desoxinucleósido trifosfatos o la correspondiente polimerasa de DNA).

Por lo tanto, otro aspecto preferido de la invención es el procedimiento descrito anteriormente, en el que la presencia de un producto de amplificación de dicho ácido nucleico de control externo es indicativa de una amplificación que tiene lugar en el recipiente que contiene el ácido nucleico externo purificado, incluso en ausencia de productos de amplificación para dicho ácido nucleico diana.

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

Por lo tanto, un aspecto preferido de la invención es el procedimiento descrito anteriormente, que comprende además la siguiente etapa:

g. Determinar la cantidad de dicho ácido nucleico diana.

En el caso de una calibración externa, se crean curvas estándar en reacciones separadas usando cantidades conocidas de un ácido nucleico idéntico o comparable, por ejemplo, el al menos un ácido nucleico de control externo en un tampón acuoso mencionado anteriormente. La cantidad absoluta de un ácido nucleico diana se determina posteriormente por comparación del resultado obtenido con la muestra analizada con dicha función estándar. Sin embargo, la calibración externa tiene la desventaja de que no se refleja en el control un posible procedimiento de extracción, su variada eficacia y la no previsible y a menudo posible presencia de agentes que inhiben la reacción de amplificación y/o detección.

Esta circunstancia se aplica a cualquier efecto relacionado con la muestra. Por lo tanto, podría ser el caso de que una muestra se juzgue negativa debido a un procedimiento de extracción fallido u otros factores basados en la muestra, mientras que el ácido nucleico diana a detectar y cuantificar está realmente presente en la muestra.

Por estas y otras razones, un ácido nucleico de control interno añadido a la propia reacción de prueba es ventajoso. Al servir como un estándar cuantitativo, dicho ácido nucleico de control interno tiene al menos las dos funciones siguientes en una prueba cuantitativa:

i) Supervisa la validez de la reacción.

ii) Sirve como referencia en el cálculo del título compensando así los efectos de la inhibición y controlando los procesos de preparación y amplificación para permitir una cuantificación más precisa.

Por lo tanto, en contraste con el ácido nucleico de control interno cualitativo en una prueba cualitativa que debe ser positiva solamente en una reacción diana negativa, el ácido nucleico de control cuantitativo en una prueba cuantitativa tiene dos funciones: control de la reacción y calibración de la reacción. Por lo tanto, debe ser positivo y válido tanto en reacciones positivas de diana como negativos de diana. Además, tiene que ser adecuado para proporcionar un valor de referencia fiable para el cálculo de altas concentraciones de ácido nucleico. Por lo tanto, la concentración de un ácido nucleico de control cuantitativo interno necesita ser relativamente alta.

En resumen, la combinación de un ácido nucleico de control interno y un ácido nucleico de control externo en un tampón acuoso, tal como se realiza en la presente invención, es altamente ventajosa. La combinación no sólo combina las ventajas expuestas anteriormente con respecto a un ácido nucleico de control externo solo o un ácido nucleico de control interno solo, sino que también conduce a varios efectos sinérgicos:

- Facilitación de la solución de problemas en caso de un experimento fallido:

Si por ejemplo, solo se utiliza un ácido nucleico de control interno o externo, el fallo de su amplificación sólo conduce a la conclusión de que la ejecución es inválida, pero no por qué ha ocurrido. Por el contrario, si se utilizan ambos tipos de controles, y por ejemplo, solo se amplifica el ácido nucleico de control externo, entonces es probable que esté presente un inhibidor en la muestra, porque los reactivos de amplificación actúan sobre el ácido nucleico de control externo. Este efecto sinérgico se ve incluso aumentado en la realización preferida, en la que se incluye un control negativo, ya que entonces se pueden detectar posibles ácidos nucleicos contaminantes y por lo tanto no deseados, mediante un resultado positivo en dicho control negativo.

- Permitir el uso de un tampón acuoso para el ácido nucleico de control externo

Como se ha descrito más arriba, la inclusión de un ácido nucleico de control interno dentro de la muestra de fluido a analizar elimina la necesidad de utilizar una matriz de fluido similar o idéntica a la matriz de la muestra de fluido para el ácido nucleico de control externo. La matriz de muestra de fluido no tiene que imitarse porque el ácido nucleico de control interno actúa como un control de proceso completo y es capaz de monitorizar posibles inhibidores en la muestra de fluido.

- Los requisitos reglamentarios en el diagnóstico clínico molecular que exigen la provisión de ácidos nucleicos de control externo en matrices de fluidos complejos, tal como se ha descrito anteriormente, pueden cumplirse incluso cuando se usa un ácido nucleico de control externo en un tampón acuoso como en el método de la presente invención (Guidance for Industry and FDA Staff - Assayed and Unassayed Quality Control Material, 2007, Sección IV, B, 1. Matrix Effects).

Tal como se describe en la presente memoria, el ácido nucleico de control externo en un tampón acuoso se somete al procedimiento de preparación de la muestra, es decir, aislamiento de ácidos nucleicos. Un resultado de amplificación negativo en dicho control externo puede ser indicativo de un defecto en el procedimiento de preparación de la muestra, por ejemplo, indicando una pérdida de ácidos nucleicos.

De este modo, dicho al menos un ácido nucleico de control externo en un tampón acuoso se somete a las etapas posteriores a la etapa a.

También es posible incluir tanto un ácido nucleico de control externo sometido a dichas etapas adicionales como otro ácido nucleico de control externo sometido solamente a las etapas posteriores a la etapa d, es decir, después de la preparación de la muestra. En esta realización, se pueden combinar ambas ventajas mencionadas anteriormente.

Por lo tanto, un aspecto preferido de la invención es el proceso mencionado anteriormente, en el que al menos un ácido nucleico de control externo en un tampón acuoso se somete a las etapas posteriores a la etapa a, y al menos otro ácido nucleico de control externo en un tampón acuoso se somete solamente a las etapas posteriores a la etapa d.

Otras realizaciones ventajosas son realizaciones en las que dicho ácido nucleico de control interno también se añade a dicho al menos un ácido nucleico de control externo en un tampón acuoso en la etapa a o después de la etapa d. Entre otras ventajas, esto facilita el flujo de trabajo especialmente en configuraciones automatizadas, ya que el ácido nucleico de control interno puede añadirse simplemente, por ejemplo, a todos los pocillos de una placa de múltiples pocillos, que contiene una o más muestras de fluido y uno o más ácido nucleico de control externo en un tampón acuoso.

Por lo tanto, un aspecto preferido de la invención es el procedimiento descrito anteriormente, que comprende además:

en la etapa a: añadir dicho ácido nucleico de control interno al menos a un ácido nucleico de control externo en un tampón acuoso.

En el sentido de la invención, la "purificación", "aislamiento" o "extracción" de ácidos nucleicos se refieren a lo siguiente: antes de que los ácidos nucleicos puedan analizarse en un ensayo diagnóstico, por ejemplo, mediante amplificación, típicamente tienen que ser purificados, aislados o extraídos de muestras biológicas que contienen mezclas complejas de diferentes componentes. A menudo, para las primeras etapas, se utilizan procesos que permiten el enriquecimiento de los ácidos nucleicos. Para liberar el contenido de células o partículas virales, pueden tratarse con enzimas o con productos químicos para disolver, degradar o desnaturalizar las paredes celulares o partículas virales. Este proceso se conoce comúnmente como lisis. La disolución resultante que contiene dicho material lisado se denomina lisado. Un problema frecuentemente encontrado durante la lisis es que otras enzimas degradan el componente de interés, por ejemplo, desoxirribonucleasas o ribonucleasas que degradan ácidos nucleicos, entran en contacto con el componente de interés durante el procedimiento de lisis. Estas enzimas degradantes también pueden estar presentes fuera de las células o pueden haberse separado espacialmente en diferentes compartimentos celulares antes de la lisis. A medida que tiene lugar la lisis, el componente de interés queda expuesto a dichas enzimas degradantes. Otros componentes liberados durante este proceso pueden, por ejemplo, ser endotoxinas pertenecientes a la familia de lipopolisacáridos que son tóxicos para las células y pueden causar problemas a los productos destinados a ser utilizados en terapia humana o animal.

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

Las enzimas que se pueden usar ventajosamente en tales procesos de lisis o preparación de muestras mencionados anteriormente son enzimas que escinden los enlaces amida en sustratos proteicos y que se clasifican como proteasas o (indistintamente) peptidasas (véase Walsh, 1979, Enzymatic Reaction Mechanisms. W.H. Freeman and Company, San Francisco, capítulo 3). Las proteasas usadas en la técnica anterior comprenden proteasas alcalinas (WO 98/04730) o proteasas ácidas (US 5.386.024). Una proteasa que ha sido ampliamente utilizada para la preparación de muestras en el aislamiento de ácidos nucleicos en la técnica anterior es la 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, New York, 1989) que es activo alrededor del pH neutro y pertenece a una familia de proteasas conocida por el experto en la técnica como subtilisinas. Especialmente ventajosa para el uso en lisis o procesos de preparación de muestras mencionados anteriormente es la enzima esperasa, una proteasa robusta que conserva su actividad tanto a alta alcalinidad como a altas temperaturas (PE 1 201 753).

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

Existen varios métodos para la purificación de ácidos nucleicos:

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

- cromatografía de afinidad

- hibridación con sondas inmovilizadas

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

- 5 • extracción líquido-líquido con por ejemplo, fenol-cloroformo
- precipitación con por ejemplo, etanol puro
- extracción con papel de filtro
- extracción con agentes formadores de micelas tales como bromuro de cetil-trimetil-amonio
- unión a colorantes inmovilizados e intercalantes, por ejemplo, derivados de acridina
- 10 • adsorción a gel de sílice o tierras diatómicas
- adsorción en partículas de vidrio magnético (MGP) o partículas de organo-silano en condiciones caotrópicas

Particularmente interesante para fines de purificación es la adsorción de ácidos nucleicos a una superficie de vidrio aunque son posibles otras superficies. Muchos procedimientos para aislar ácidos nucleicos de su entorno natural han sido propuestos en los últimos años por el uso de su comportamiento de unión a las 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 de sílice porque, entre otras razones, los ácidos nucleicos no tienen que ser modificados, e incluso pueden unirse ácidos nucleicos nativos. Estos procesos se describen en detalle en varios documentos. En Vogelstein B. et al., Proc. Natl. Acad. USA 76 (1979) 615-9, por ejemplo, se propone un procedimiento para la unión de ácidos nucleicos a partir de geles de agarosa en presencia de yoduro de sodio en vidrio de sílex molido. La purificación de DNA plasmídico a partir de bacterias sobre polvo de vidrio en presencia de perclorato de sodio 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 DNA de fago M13 monocatenario en filtros de fibra de vidrio precipitando partículas de fago utilizando 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 Tris/EDTA que contiene metanol. Un procedimiento similar para purificar DNA a partir de fagos lambda se describe en Jakobi R. et al., Anal. Biochem. 175 (1988) 196 - 201. El procedimiento implica la unión selectiva de ácidos nucleicos a las superficies de vidrio en soluciones salinas caotrópicas y la separación de los ácidos nucleicos de contaminantes tales como agarosa, proteínas o residuo celular. Para separar las partículas de vidrio de los contaminantes, las partículas pueden ser centrifugadas o los fluidos son extraídos a través de filtros de fibra de vidrio. Este es un paso limitante, sin embargo, que impide que el procedimiento se utilice para procesar grandes cantidades de muestras. El uso de partículas magnéticas para inmovilizar ácidos nucleicos después de la precipitación por adición de sal y etanol es más ventajoso y se describe por ejemplo, en Alderton R.P. et al., S., Anal. Biochem. 201 (1992) 166-169 y 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 un paso de lavado. Después de un paso de lavado, los ácidos nucleicos se disuelven en un tampón Tris. Sin embargo, este procedimiento tiene la desventaja de que la precipitación no es selectiva para los ácidos nucleicos. Más bien, también se aglutina una variedad de sustancias sólidas y disueltas. Como resultado, este procedimiento no puede usarse para eliminar cantidades significativas de cualquier inhibidor de reacciones enzimáticas específicas que puedan estar presentes. También está disponible en el mercado vidrio magnético poroso que contiene partículas magnéticas en una matriz de vidrio particular porosa y se cubre con una capa que contiene estreptavidina. Este producto puede utilizarse para aislar materiales biológicos, por ejemplo, proteínas o ácidos nucleicos, si se modifican en una etapa de preparación compleja para que se unan covalentemente a la biotina. Los adsorbentes particulares magnetizables resultaron ser muy eficientes y adecuados para la preparación automática de muestras. Para ello se utilizan pigmentos ferrimagnéticos y ferromagnéticos así como superparamagnéticos. Las partículas de vidrio magnéticas más preferidas y los métodos que las utilizan son los descritos en el documento WO 01/37291. Particularmente útil para el aislamiento de ácido nucleico en el contexto de la invención es el método según R. Boom et al. (J. Clin Microbiol, 28 (1990), 495 - 503).

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

Por lo tanto, un aspecto preferido de la invención es el procedimiento 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 magnético.

"Inmovilizar", en el contexto de la invención, significa capturar objetos tales como, por ejemplo, ácidos nucleicos de una manera reversible o irreversible. Particularmente, "inmovilizado sobre el material de soporte sólido", significa que el objeto u objetos están asociados con el material de soporte sólido con el fin de separarlos de cualquier medio circundante, y pueden ser recuperados por ejemplo, mediante separación del material de soporte sólido en una etapa posterior. En este contexto, la "inmovilización" puede, por ejemplo, comprender la adsorción de ácidos nucleicos en vidrio u otras superficies adecuadas de materiales sólidos como se describe anteriormente. Además, los ácidos nucleicos pueden ser "inmovilizados" específicamente uniéndose a las sondas de captura, en las que los ácidos nucleicos están unidos a ácidos nucleicos esencialmente complementarios unidos a un soporte sólido por emparejamiento de bases. En este último caso, dicha inmovilización específica conduce a la unión predominante de

los ácidos nucleicos diana.

Después de la purificación o aislamiento de los ácidos nucleicos que incluyen los ácidos nucleicos diana de su entorno natural, el análisis puede realizarse por ejemplo, mediante la amplificación descrita anteriormente.

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

Una "muestra de fluido" es cualquier material de fluido que puede ser sometido a un ensayo de diagnóstico dirigido a ácidos nucleicos y que deriva preferiblemente de una fuente biológica. En una realización preferida del procedimiento descrito anteriormente, la muestra de fluido es una muestra clínica. También preferiblemente, dicha muestra de fluido deriva de un ser humano y es un líquido corporal. En una realización preferida de la invención, la muestra de fluido es sangre humana, orina, esputo, sudor, hisopo, heces pipeteables o fluido espinal. Más preferiblemente, la muestra de fluido es sangre humana o plasma sanguíneo humano.

El término "recipiente de reacción" o "recipiente" comprende, pero no se limita a, tubos o pocillos de placas tales como micropocillos, pozos profundos u otros tipos de placas de pocillos múltiples, en la que tiene lugar una reacción para el análisis de la muestra de fluido tal como por ejemplo transcripción inversa o una reacción en cadena de la polimerasa. Los límites exteriores o paredes de tales recipientes son químicamente inertes de tal manera que no interfieren con la reacción analítica que tiene lugar en su interior. Preferiblemente, el aislamiento de los ácidos nucleicos como se ha descrito anteriormente también se lleva a cabo en una placa de pocillos múltiples, más preferiblemente en una placa de pozos profundo.

En algunas realizaciones, el recipiente en la etapa b. Del procedimiento descrito anteriormente, en el que la muestra de fluido se combina junto con un material de soporte sólido, es diferente del primer recipiente de reacción y del segundo recipiente de reacción en la etapa e., En la que los ácidos nucleicos se ponen en contacto con reactivos de amplificación. Puesto que en estas realizaciones la purificación y la amplificación del ácido nucleico diana se realizan en diferentes recipientes, por ejemplo, Se pueden usar placas multipocillos adaptadas para su respectivo propósito, tales como por ejemplo una placa de pozo profundo para purificación y una placa de pocillos múltiples con recipientes más pequeños para amplificación.

En otras realizaciones, el recipiente de la etapa b. es el mismo que el primer recipiente de reacción en la etapa e, lo que significa que las etapas para la purificación y posterior amplificación del ácido nucleico diana se llevan a cabo dentro del mismo recipiente. Dichas realizaciones llevan la ventaja de que no se requiere más pipeteo o paso de transferencia similar entre la purificación y la amplificación.

Las placas de múltiples pocillos en sistemas analíticos permiten la separación en paralelo y el análisis o almacenamiento de muestras múltiples. Las placas multipocillos pueden optimizarse para una absorción máxima de líquidos o para una máxima transferencia de calor. Una placa de múltiples pocillos preferida para su uso en el contexto de la presente invención se optimiza para incubar o separar un analito en un analizador automatizado. Preferiblemente, la placa de múltiples pocillos está construida y dispuesta para entrar en contacto con un dispositivo magnético y/o un dispositivo de calentamiento.

Dicha placa de múltiples pocillos preferida, que se denomina indistintamente "placa de procesamiento" en el contexto de la invención, comprende:

- una superficie superior que comprende recipientes múltiples con aberturas en la parte superior dispuestos en filas. Los recipientes comprenden una parte superior, una parte central y una parte inferior. La parte superior está unida a la superficie superior de la placa de múltiples pocillos y comprende dos lados más largos y dos más cortos. La parte central tiene una sección transversal sustancialmente rectangular con dos lados más largos y dos lados más cortos;

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

- una base, en la que dicha base comprende una abertura construida y dispuesta para colocar la placa de múltiples pocillos en contacto con dicho dispositivo magnético y/o un dispositivo de calentamiento.

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

Preferiblemente, la placa de múltiples pocillos comprende un espacio continuo que está situado entre hileras adyacentes de recipientes. Dicho espacio continuo está construido y dispuesto para alojar un dispositivo magnético en forma de placa. En una realización preferida, la parte inferior de los recipientes comprende un fondo esférico. En una realización más preferida, la parte inferior de dichos recipientes comprende una parte cónica situada entre dicha parte central y dicho fondo esférico.

En una realización preferida, la superficie superior comprende nervaduras, en los que dichas nervaduras rodean las aberturas de los recipientes. Preferiblemente, un lado más corto de dicha parte superior de los recipientes

comprende un rebaje, comprendiendo dicho rebaje una superficie doblada que se extiende desde el nervio al interior del recipiente.

Además, en una realización preferida, los recipientes comprenden una forma interior redondeada.

Para la fijación a las estaciones de procesamiento o de incubación, la base comprende preferiblemente un reborde que comprende rebajes. Las grapas de cierre en una estación de un analizador pueden acoplarse con dichos rebajes para fijar la placa en una estación.

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

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

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

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

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

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

En el área del fondo cónico (111) de los recipientes, el espacio (121) es aún más pronunciado y puede acomodar otros imanes (203). La combinación de los imanes grandes (202) en el área superior y los imanes más pequeños

(203) en el área cónica de los recipientes permite la separación de partículas magnéticas (216) en volúmenes más grandes o pequeños de líquido (215). Los imanes pequeños (203), por lo tanto, hacen más fácil secuestrar las partículas magnéticas (216) durante el pipeteado de elución. Esto hace posible pipetear el eluato con pérdida mínima reduciendo el volumen muerto del botón de partícula magnética (216). Además, se minimiza la presencia de partículas magnéticas (216) en el eluido transferido.

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

En el interior, en el fondo de los recipientes (111, 112), la forma se vuelve cónica (111) y termina con un fondo esférico (112) (figura 6, figura 7). La forma interior del recipiente (114), que incluye la parte central rectangular (120), es redondeada. La combinación del fondo esférico (112), la forma interior redondeada (114), la parte cónica (111) y la superficie refinada de los recipientes (103) conduce a fluidos favorables que facilitan una separación y purificación efectivas de analitos en la placa de procesamiento (101). El fondo esférico (112) permite un uso esencialmente completo del eluato separado y una reducción del volumen muerto que reduce el arrastre de los reactivos o la contaminación cruzada de la muestra.

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

Una "estación de separación" es un dispositivo o componente de un sistema analítico que permite el aislamiento del material de soporte sólido de otro material presente en la muestra de fluido. Una estación de separación de este tipo por ejemplo, comprende, pero no se limitan a, una centrífuga, un estante 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. Preferiblemente, se utilizan uno o más imanes para la separación de partículas magnéticas, preferiblemente partículas de vidrio magnético, como un soporte sólido. Si, por ejemplo, la muestra de fluido y el material de soporte sólido se combinan juntos en los pocillos de una placa de pocillos múltiples, entonces uno o más imanes comprendidos por la estación de separación pueden, por ejemplo, ponerse en contacto con la propia muestra de fluido introduciendo los imanes en los pocillos o dichos imanes pueden acercarse a las paredes exteriores de los pocillos para atraer las partículas magnéticas y separarlas posteriormente del líquido circundante.

En una realización preferida, la estación de separación es un dispositivo que comprende una placa de múltiples pocillos que comprende recipientes con una abertura en la superficie superior de la placa de múltiples pocillos y un fondo cerrado. Los recipientes comprenden una parte superior, una parte central y una parte inferior, en la que la parte superior está unida a la superficie superior de la placa multipocillos y preferiblemente comprende dos lados largos y dos lados cortos. La parte central tiene una sección transversal sustancialmente rectangular con dos lados más largos, en donde dichos recipientes están alineados en filas. Un espacio continuo está situado entre dos filas adyacentes para poner en contacto selectivamente al menos un imán montado en un dispositivo con las paredes laterales en al menos dos posiciones Z. El dispositivo comprende además una estación de separación magnética que comprende al menos un dispositivo de fijación. El accesorio comprende al menos un imán que genera un campo magnético. Está presente un mecanismo de movimiento que mueve verticalmente dicho accesorio que comprende al menos un imán entre una primera y una segunda posición respecto a los recipientes de la placa de múltiples pocillos. Preferiblemente, dichas al menos dos posiciones Z de los recipientes comprenden las paredes laterales y la parte inferior de dichos recipientes. El campo magnético de dicho al menos un imán atrae preferiblemente las partículas magnéticas a una superficie interna del recipiente adyacente a dicho imán cuando dicho imán está en dicha primera posición. El efecto de dicho campo magnético es menor cuando al menos un imán está en dicha segunda posición que cuando dicho imán está en dicha primera posición. Preferiblemente, el accesorio que comprende dicho al menos un imán comprende un bastidor. Los recipientes tienen características preferidas como

se ha descrito anteriormente en el contexto de la placa multipocillos/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.

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

10 La estación de separación comprende un bastidor para recibir la placa de múltiples pocillos, y unas grapas de cierre para fijar la placa de múltiples pocillos. Preferiblemente, la estación de separación comprende dos tipos de imanes. Esta realización preferida se describe adicionalmente a continuación.

15 A continuación se describe una segunda realización preferida, que comprende un resorte que ejerce una presión sobre el bastidor que comprende los imanes de tal manera que los imanes son presionados contra los recipientes de la placa de múltiples pocillos.

20 Preferentemente, los primeros imanes están contruidos y dispuestos para interactuar con recipientes de una placa de múltiples pocillos para ejercer un campo magnético sobre un gran volumen de líquido que comprende partículas magnéticas retenidas en dichos recipientes. Dichos segundos imanes están contruidos y dispuestos preferiblemente para interactuar con recipientes de una placa de múltiples pocillos para ejercer un campo magnético sobre un pequeño volumen de líquido que comprende partículas magnéticas retenidas en dichos recipientes. Dichos primer y segundo imanes se pueden mover a diferentes posiciones Z.

25 Es útil en el contexto de la presente invención y dicha estación de separación es además un método de aislamiento y purificación de un ácido nucleico. El método comprende las etapas de unión de un ácido nucleico a partículas magnéticas en un recipiente de una placa de pocillos múltiples. El recipiente comprende una abertura superior, una parte central y una parte inferior. El material unido se separa entonces del material no unido contenido en un líquido cuando la mayor parte del líquido está situado por encima de la sección donde la parte cónica del recipiente es reemplazada por la parte central con la forma rectangular, moviendo un imán de una segunda a una primera posición y, en dicha primera posición, aplicar un campo magnético a la parte central y, opcionalmente, aplicar adicionalmente un campo magnético a la parte inferior de dicho recipiente. Las partículas magnéticas se pueden lavar opcionalmente con una solución de lavado. Un pequeño volumen de líquido, en el que la mayor parte del líquido está situado por debajo de la sección en la que la parte cónica del recipiente es reemplazada por la parte central con la forma rectangular, se separa de dichas partículas magnéticas aplicando selectivamente un campo magnético al fondo de dicho recipiente.

40 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 unos primeros imanes que están contruidos y dispuestos para interactuar con recipientes de una placa de múltiples pocillos para ejercer una fuerza magnética sobre un gran volumen de líquido que comprende partículas magnéticas retenidas en dichos recipientes y unos segundos imanes contruidos y dispuestos para interactuar con recipientes de una placa de múltiples pocillos para ejercer un campo magnético sobre un pequeño volumen de líquido que comprende partículas magnéticas retenidas en dichos recipientes y dichos primeros y segundos imanes se pueden mover a diferentes posiciones Z. En este documento se describen realizaciones preferidas de la estación de separación magnética.

45 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, un imán largo (202) está contruido y dispuesto para encajar en el espacio (121) de la placa de procesamiento (101). De este modo, el imán (202) ejerce un campo magnético sobre el líquido (215) en el recipiente (103) para secuestrar partículas magnéticas (216) en el interior de la pared del recipiente. Esto permite separar las partículas magnéticas (216) y cualquier material unido a ellas y el líquido (215) dentro del recipiente (103) cuando está presente un gran volumen de líquido (215). El imán (202) tiene una estructura alargada y está contruido y dispuesto para interactuar con la parte central esencialmente rectangular (120) del recipiente. Por lo tanto, se usa un imán (202) cuando la mayor parte del líquido (215) está situada por encima de la sección donde la parte cónica (111) del recipiente (103) está reemplazada por la parte central (120) con la forma rectangular. Como se muestra en la figura 10, la construcción preferida de los imanes (202) comprende unos dispositivos (204, 204a) que comprenden imanes (202) que encajan en el espacio (121) entre las filas de recipientes (103) en la placa de procesamiento (101). Otra realización preferida de imanes (202) comprende imanes (202) dispuestos en dispositivos de fijación (204, 204a). Los imanes (203) de la estación de separación preferida (201) son más pequeños y pueden interactuar con la parte cónica (111) del recipiente (103). Esto se muestra en la figura. 10. Los imanes (203) están dispuestos preferiblemente sobre una base (205) que puede ser movida dentro del espacio (121) de la placa de procesamiento (101). Cada imán (202, 203) está contruido preferiblemente para interactuar con dos recipientes (103) en dos filas adyacentes. En una realización preferida, la placa de procesamiento (101) tiene 6 filas de 8 recipientes (103). Una estación de separación (201) que puede interactuar con la placa de procesamiento preferida (101) tiene tres dispositivos (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 dispositivos

magnéticos (204, 204a) que comprenden imanes (202) y tres bases magnéticas (205) que comprenden imanes (203).

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

En la Fig. 10a-c, los imanes (203) están situados en la proximidad de la parte cónica de los recipientes (103) de la placa de procesamiento (101). Esta es la posición más alta de los imanes (203), y es la posición de separación. En esta figura, los imanes (202) están situados en la posición más baja. No están involucrados en la separación cuando están en esta posición.

En la realización preferida mostrada en la Fig. 10, la base (217) de imanes (202) está conectada a una rueda de posicionamiento (206). La base (217) comprende un extremo inferior (207) que está flexiblemente en contacto con un elemento de conexión (208) mediante un elemento móvil (209). Dicho elemento móvil está construido y dispuesto para mover el elemento de conexión (208) a lo largo de un carril (212) de un lado al otro. Dicho elemento móvil (209) está fijado al elemento de conexión (208) con un pasador (220). Dicho elemento de conexión (208) está fijado a la rueda de posicionamiento (206) mediante un tornillo (210). El elemento de conexión (208) está también conectado al eje (211). Dicho elemento de conexión (208) es preferiblemente una placa rectangular. A medida que la rueda de posicionamiento (206) se desplaza excéntricamente, alrededor de un eje (211), de manera que el tornillo (210) se desplaza desde un punto por encima del eje excéntrico hasta un punto por debajo del eje excéntrico, el elemento móvil (209) y el extremo inferior (207) de la base (204) con los imanes (202) fijados a la misma se mueven desde la posición más superior a la posición más baja. La base (218) está montada sobre una parte inferior (219) y está conectada, en su extremo inferior, con el perno (213) a un elemento móvil (214), que es preferiblemente 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) está situada en una sección de la rueda de posicionamiento (206) donde la distancia desde el eje (211) es corta, los imanes (203) están en su posición más baja. Cuando la rueda (214) está situada en una sección de la rueda de posicionamiento (206) donde la distancia desde el eje (211) es máxima, los imanes (203) están en su posición más alta. De este modo, en la realización preferida de la primera realización de la estación de separación, la posición de los imanes (203) está controlada por la forma de la rueda de posicionamiento (206). Cuando el elemento móvil (209) se mueve a lo largo de la parte central o redondeada (212a) del carril (212), el tipo de imanes pequeño (203) se mueve hacia arriba y hacia abajo. Cuando el elemento móvil (209) está situado en el lado (212b) del extremo inferior (207) y se mueve hacia arriba o hacia abajo, los imanes (202) se mueven hacia arriba o hacia abajo. La rueda de posicionamiento puede ser girada por cualquier tipo de motor (224).

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

El término "perno", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a cualquier elemento de fijación, incluyendo tornillos o clavijas.

En una segunda realización preferida, la estación de separación (230) comprende al menos un fijación (231) que comprende al menos un imán (232), preferiblemente 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 dispositivos (231) igual al número de filas (123) de la placa de múltiples pocillos (101) descrita anteriormente. Más preferiblemente, seis dispositivos (231) están montados en la estación de separación (230). Al menos un imán (232) está montado sobre un fijación (231). Preferiblemente, el número de imanes (232) es igual al número de recipientes (103) en una fila (123). Más preferiblemente, ocho imanes (232) están montados sobre un fijación (231). Preferiblemente, un tipo de imán (232) está comprendido en dicho accesorio (231). Más preferiblemente, el imán (232) está montado en un lado orientado hacia los recipientes con los que interactúa el imán.

La fijación (231) está montada sobre una base (233). Preferiblemente, dicho soporte es flexible. La base (233) comprende muelles (234) montados sobre el mismo. El número de resortes (234) es al menos un resorte por fijación (231) montado sobre dicha base (233). La base comprende además un bisel (236) que limita el movimiento del resorte y, en consecuencia, la fijación (231) que comprende los imanes (232). Preferiblemente, cualquiera de dichos muelles (234) está construido y dispuesto para interactuar con una fijación (231). Más preferiblemente, dicho muelle (234) es un muelle de yugo. Dicha interacción controla el movimiento horizontal de las fijaciones (231). Además, la estación de separación (230) comprende un bastidor (235). La base (233) con fijaciones (231) está conectada al bastidor (235) mediante un mecanismo de movimiento como se ha descrito anteriormente para los imanes (232) de la primera realización.

Preferentemente, dicha base (233) y fijación (231) están construidas y dispuestas para moverse verticalmente (en la dirección Z).

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

Un muelle está unido a la base (233) de cualquier bastidor (231) (figura 9a, b)). El muelle presiona los imanes (232) contra los recipientes (103). Esto asegura un contacto entre imanes (232) y recipientes (103) durante la separación magnética. Preferentemente, el imán (232) entra en contacto con el recipiente (103) en la pared lateral (109) situada por debajo de la entrada (105). Esto tiene la ventaja de que el líquido que se añade pipeteando fluye sobre las partículas magnéticas secuestradas y asegura que las partículas se resuspenden y que todas las muestras en todos los recipientes se tratan de forma idéntica.

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

Un "tampón de lavado" es un fluido que está diseñado para eliminar componentes no deseados, especialmente en un procedimiento de purificación. Tales tampones son bien conocidos en la técnica. En el contexto de la purificación de ácidos nucleicos, el tampón de lavado es adecuado para lavar el material de soporte sólido con el fin de separar el ácido nucleico inmovilizado de cualquier componente no deseado. El tampón de lavado puede contener, por ejemplo, etanol y/o agentes caotrópicos en una 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 madre que tienen que ser diluidas antes de su uso.

El lavado en el procedimiento de acuerdo con la invención requiere un contacto más o menos intensivo del material de soporte sólido y de los ácidos nucleicos inmovilizados sobre el mismo con el tampón de lavado. Diferentes métodos son posibles para conseguir esto, por ejemplo, agitando el tampón de lavado con el material de soporte sólido en o junto con el recipiente o vasos correspondientes. Otro método ventajoso es aspirar y dispensar la suspensión que contiene el tampón de lavado y el material de soporte sólido una o más veces. Este método se lleva a cabo preferiblemente utilizando una pipeta, en la que dicha pipeta comprende preferiblemente una punta desechable de pipeta en la que dicha suspensión es aspirada y dispensada de nuevo. Tal punta de pipeta se puede usar varias veces antes de ser desechada y reemplazada. Las puntas de pipeta desechables útiles para la invención tienen preferiblemente un volumen de al menos 10 μ l, más preferiblemente al menos 15 μ l, más preferiblemente al menos 100 μ l, más preferiblemente al menos 500 μ l, más preferiblemente de al menos 1 ml, incluso más preferiblemente alrededor de 1 ml. Las pipetas utilizadas en el contexto de la invención también pueden ser agujas de pipeteo.

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

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

Por lo tanto, un aspecto preferido de la invención es el procedimiento descrito anteriormente, en el que dicho procedimiento comprende además en la etapa d. el paso de elución de los ácidos nucleicos purificados del material de soporte sólido con un tampón de elución después de lavar 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, por ejemplo, ser agua destilada o soluciones salinas acuosas, tales como por ejemplo, tampones Tris como Tris HCl, o HEPES, u otros tampones adecuados conocidos por el experto en la técnica. El valor de pH de tal tampón de elución es preferiblemente 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 de degradación.

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

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

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

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

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

"Oligonucleótidos" y "oligonucleótidos modificados" (o "análogos de oligonucleótidos") son subgrupos de compuestos oligoméricos. En el contexto de esta invención, el término "oligonucleótido" se refiere a componentes formados a partir de una pluralidad de nucleótidos como sus unidades monoméricas. Los grupos fosfato se denominan comúnmente como parte del esqueleto internucleósido del oligonucleótido. El enlace normal o esqueleto del RNA y del DNA es un enlace fosfodiéster de 3' a 5'. Los oligonucleótidos y los oligonucleótidos modificados (véase más adelante) útiles para la invención pueden sintetizarse como se describen principalmente en la técnica y son conocidos por el experto en la materia. Los métodos para preparar compuestos oligoméricos de secuencias específicas son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, clonación y restricción de secuencias apropiadas y síntesis química directa. Métodos de síntesis química puede 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 descrito por Brown E.L., et al., *Methods in Enzymology* 68 (1979) 109-151, el método de fosforamidita descrito en Beaucage et al., *Tetrahedron Letters* 22 (1981) 1859, el método de H-fosfonato descrito en Garegg et al., *Chem. Scr.* 25 (1985) 280-282 y el método de soporte sólido descrito en el documento US 4.458.066.

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

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

Un "oligonucleótido modificado" (o "análogo de oligonucleótido"), perteneciente a otro subgrupo específico de compuestos oligoméricos, posee uno o más nucleótidos y uno o más nucleótidos modificados como unidades monoméricas. Por lo tanto, el término "oligonucleótido modificado" (o "análogo de oligonucleótido") se refiere a estructuras que funcionan de manera sustancialmente similar a los oligonucleótidos y pueden usarse indistintamente en el contexto de la presente invención. Desde un punto de vista sintético, un oligonucleótido modificado (o un análogo de oligonucleótido) puede hacerse, por ejemplo, mediante modificación química de oligonucleótidos por modificación apropiada del esqueleto de fosfato, de la unidad ribosa o de las bases nucleotídicas (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 o fosforamidato internucleósidos en lugar de enlaces fosfodiéster internucleósidos; desaza o azapurinas y pirimidinas en lugar de bases de purina y pirimidina naturales, bases de pirimidina que tienen grupos sustituyentes en la posición 5 ó 6; bases de purina que tienen grupos sustituyentes alterados en las posiciones 2, 6 u 8 o en la posición 7 tales como 7-deazapurinas; bases que llevan porciones alquilo, alquenilo, alquinilo o arilo, por ejemplo, grupos alquilo inferior tales como grupos metilo, etilo, propilo, butilo, tercbutilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo o arilo tales como fenilo, bencilo, naftilo; azúcares que tienen grupos sustituyentes en, por ejemplo, su posición 2'; o análogos de azúcar carbocíclicos o acíclicos. Otras modificaciones son conocidas por los expertos en la técnica. Tales oligonucleótidos modificados (o análogos de oligonucleótidos) se describen mejor al ser funcionalmente intercambiables con, pero estructuralmente diferentes de, los oligonucleótidos naturales. Con mayor detalle, se dan a conocer modificaciones ejemplares en Verma S., y Eckstein F., *Annu. Rev. Biochem.* 67 (1998) 99-134 o WO 02/12263.

Además, se puede realizar una modificación en la que las unidades nucleósidas se unen mediante grupos que sustituyen a los enlaces internucleósidos fosfato o fosfato de azúcar. Tales enlaces incluyen los descritos en Verma S., y Eckstein F., Annu. Rev. Biochem. 67 (1998) 99-134. Cuando se utilizan enlaces distintos de fosfato para unir las unidades nucleósidas, dichas estructuras también se han descrito como "oligonucleósidos".

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

El término "cebador" se usa aquí como es conocido por el experto en la técnica y se refiere a compuestos oligoméricos, principalmente a oligonucleótidos, pero también a oligonucleótidos modificados que son capaces de iniciar la síntesis de DNA mediante una polimerasa de DNA dependiente de molde, es decir, el extremo 3' del cebador proporciona un grupo 3'-OH libre en el que otros nucleótidos pueden estar unidos por una polimerasa de DNA dependiente de molde que establezca un enlace 3'- a 5'-fosfodiéster por medio del cual se utilizan desoxinucleósido trifosfatos y por lo que se libera pirofosfato.

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

Los "marcadores", a menudo denominados "grupos informadores", son generalmente grupos que forman un ácido nucleico, en particular oligonucleótidos o oligonucleótidos modificados, así como cualquier ácido nucleico unido a los mismos, distinguible del resto de la muestra (ácidos nucleicos que han unido un marcador también pueden denominarse compuestos de unión a ácidos nucleicos marcados, sondas marcadas o simplemente 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 cumarina. 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 invención, cualquier cebador y/o sonda puede ser modificado químicamente, es decir, el cebador y/o la sonda comprenden un nucleótido modificado o un compuesto no nucleotídico. La sonda o el cebador es entonces un oligonucleótido modificado.

Un método preferido de amplificación de ácido nucleico es la reacción en cadena de polimerasa (PCR) que se describe, entre otras referencias, en las patentes de los Estados Unidos números 4.683.202, 4.683.195, 4.800.159 y 4.965.188. La PCR emplea típicamente dos o más cebadores de oligonucleótidos que se unen a una plantilla de ácido nucleico seleccionada (por ejemplo, DNA o RNA). Los cebadores útiles para el análisis de ácidos nucleicos incluyen oligonucleótidos capaces de actuar como un punto de iniciación de la síntesis de ácido nucleico dentro de las secuencias de ácido nucleico de los ácidos nucleicos diana. Un cebador se puede purificar a partir de una digestión de restricción por métodos convencionales, o puede producirse sintéticamente. El cebador es preferiblemente de cadena sencilla para obtener la máxima eficacia en la amplificación, pero el cebador puede ser de doble hebra. Los cebadores bicatenarios se desnaturalizan primero, es decir, se tratan para separar los hilos. Un método para desnaturalizar ácidos nucleicos bicatenarios es calentando. Una "polimerasa termoestable" es una enzima polimerasa que es termoestable, es decir, es una enzima que cataliza la formación de productos de extensión de cebadores complementarios a una plantilla y no se desnaturaliza irreversiblemente cuando se somete a las temperaturas elevadas durante el tiempo necesario para efectuar la desnaturalización de ácidos nucleicos molde de doble cadena. 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 hebra molde. Se han aislado polimerasas termoestables, por ejemplo, de *Thermus flavus*, *T. ruber*, *T. thermophilus*, *T. aquaticus*, *T. lacteus*, *T. rubens*, *Bacillus stearothermophilus* y *Methanothermus fervidus*. Sin embargo, las polimerasas que no son termoestables también pueden emplearse en ensayos de PCR siempre que se reponga la enzima.

Si el ácido nucleico molde es de cadena doble, es necesario separar las dos hebras antes de que pueda usarse como molde en la PCR. La separación de hebras puede realizarse mediante cualquier método de desnaturalización adecuado que incluya medios físicos, químicos o enzimáticos. Un método para separar las cadenas de ácido nucleico implica calentar el ácido nucleico hasta que está predominantemente desnaturalizado (por ejemplo, más del 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 95% desnaturalizado). Las condiciones de calentamiento necesarias para desnaturalizar el ácido nucleico molde dependerán, por ejemplo, de la concentración de sal de tampón y la longitud y composición de nucleótidos de los ácidos nucleicos que se desnaturalizan, pero típicamente oscilan entre aproximadamente 90 °C y 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. Con el fin de no exponer la correspondiente polimerasa como por ejemplo, la Polimerasa de DNA Z05 a tales temperaturas altas durante demasiado tiempo y arriesgando así una

pérdida de enzima funcional, se prefiere usar etapas de desnaturalización cortas.

En una realización preferida de la invención, la etapa de desnaturalización es de hasta 30 segundos, más preferiblemente hasta 20 segundos, más preferiblemente hasta 10 segundos, más preferiblemente hasta 5 segundos, lo más preferiblemente aproximadamente 5 segundos.

Si el ácido nucleico molde de doble cadena se desnaturaliza por calor, la mezcla de reacción se deja enfriar a una temperatura que promueva la hibridación de cada cebador a su secuencia diana sobre los ácidos nucleicos diana.

La temperatura para la hibridación es preferiblemente entre aproximadamente 35 °C a aproximadamente 70 °C, más preferiblemente entre aproximadamente 45 °C a aproximadamente 65 °C; Más preferiblemente entre aproximadamente 50 °C a aproximadamente 60 °C, más preferiblemente entre aproximadamente 55 °C a aproximadamente 58 °C. Los tiempos de hibridación pueden ser entre aproximadamente 10 segundos a aproximadamente 1 minuto (por ejemplo, entre aproximadamente 20 segundos a aproximadamente 50 segundos, entre aproximadamente 30 segundos a aproximadamente 40 segundos). En este contexto, puede ser ventajoso utilizar diferentes temperaturas de hibridación para aumentar la inclusividad del correspondiente ensayo. En resumen, esto significa que a temperaturas de hibridación relativamente bajas, los cebadores también pueden unirse a dianas que tienen desemparejamientos simples, de modo que también se pueden amplificar variantes de ciertas secuencias. Esto puede ser deseable si, por ejemplo, un determinado organismo tiene variantes genéticas conocidas o desconocidas que también deben ser detectadas. Por otra parte, Las temperaturas de hibridación relativamente altas tienen la ventaja de proporcionar una mayor especificidad, ya que a temperaturas más altas disminuye continuamente la probabilidad de que el cebador se una a secuencias dianas que no coincidan exactamente. Para beneficiarse de ambos fenómenos, en algunas realizaciones de la invención se prefiere que el procedimiento descrito anteriormente incluya hibridación a diferentes temperaturas, preferiblemente primero a una temperatura más baja, a continuación a una temperatura más alta. Si, por ejemplo, una primera incubación tiene lugar a 55 °C durante aproximadamente 5 ciclos, las secuencias diana que no coinciden exactamente pueden ser (pre) amplificadas. Esto puede seguirse, por ejemplo, por unos 45 ciclos a 58 °C, proporcionando una mayor especificidad a lo largo de la mayor parte del experimento. De esta manera, las variantes genéticas potencialmente importantes no se pierden, mientras que la especificidad se mantiene relativamente alta.

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

Dentro del alcance de la invención, se puede llevar a cabo 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 separadas (PCR de dos etapas). Realizar la hibridación y la extensión conjuntamente y por lo tanto bajo las mismas condiciones físicas y químicas, con una enzima adecuada tal como, por ejemplo, la polimerasa de DNA Z05, tiene la ventaja de ahorrar tiempo para una etapa adicional en cada ciclo y también suprimir la necesidad para un ajuste de temperatura adicional entre hibridación y extensión. Por lo tanto, la PCR de una etapa reduce la complejidad global del correspondiente ensayo.

En general, se prefieren tiempos más cortos para la amplificación global, a medida que se reduce el tiempo hasta el resultado y conduce a un posible diagnóstico precoz.

Otros métodos de amplificación de ácidos nucleicos preferidos a utilizar en el contexto de la invención comprenden la reacción en cadena de la ligasa (LCR, Wu D.Y. y Wallace R.B., Genomics 4 (1989) 560-69 y Barany F., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 (1991) 189 - 193); reacción en cadena de la polimerasa ligasa (Barany F., PCR Methods and Applic. 1 (1991) 5-16); Gap-LCR (WO 90/01069); reacción en cadena de reparación (EP 0439182 A2), 3SR (Kwoh DY et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 86 (1989) 1173-1177 Guatelli J.C., et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 87 (1990)

1874-1878, WO 92/08808), y NASBA (US 5.130.238). Además, hay amplificación por desplazamiento de cadena (SDA), amplificación mediada por transcripción (TMA) y amplificación por Qbeta (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 utilizado en la presente invención presenta preferiblemente las siguientes propiedades relativas a su secuencia:

- una temperatura de fusión de 55 °C a 90 °C, más preferiblemente de 65 °C a 85 °C, más preferiblemente de 70 °C a 80 °C, lo más preferiblemente alrededor de 75 °C

- una longitud de hasta 500 bases o pares de bases, más preferiblemente de 50 a 300 bases o pares de bases, más preferiblemente de 100 a 200 bases o pares de bases, más preferiblemente de aproximadamente 180 bases o pares de bases

- un contenido de GC entre un 30% y un 70%, más preferiblemente entre un 40% y un 60%, lo más preferiblemente de aproximadamente un 50%.

En el contexto de la invención, una "secuencia" es la estructura primaria de un ácido nucleico, es decir, la disposición específica de las nucleobases simples de las que están constituidos los correspondientes ácidos nucleicos. Debe entenderse que el término "secuencia" no denota un tipo específico de ácido nucleico tal como RNA o DNA, sino que se aplica tanto a ambos tipos como a otros tipos de ácidos nucleicos tales como por ejemplo, PNA u otros. Cuando las nucleobases se corresponden entre sí, particularmente en el caso del uracilo (presente en el RNA) y la timina (presente en el DNA), estas bases pueden considerarse equivalentes entre secuencias de RNA y DNA, como es bien conocido en la técnica pertinente.

Los ácidos nucleicos clínicamente relevantes son a menudo DNA que puede derivarse por ejemplo, de virus de DNA como por ejemplo, virus de la hepatitis B (VHB), citomegalovirus (CMV) y otros, o bacterias como por ejemplo, Chlamydia trachomatis (CT), Neisseria gonorrhoeae (NG) y otros. En tales casos, puede ser ventajoso utilizar un ácido nucleico de control interno y/o un ácido nucleico de control externo que consiste en DNA, con el fin de 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 y/o dicho ácido nucleico de control externo en un tampón acuoso son DNA.

Por otra parte, numerosos ácidos nucleicos relevantes para el diagnóstico clínico son ácidos ribonucleicos, como por ejemplo, el virus de la hepatitis C (VHC), el virus del Nilo Occidental (VNO), el virus del papiloma humano (VPH), el virus de la encefalitis Japonesa (JEV), el virus de la encefalitis de St. Louis (SLEV) y otros. La presente invención se puede aplicar fácilmente a tales ácidos nucleicos. En este caso, puede ser ventajoso utilizar un ácido nucleico de control interno y/o un ácido nucleico de control externo que consiste en RNA, con el fin de reflejar las propiedades de los ácidos nucleicos diana. Si tanto el RNA como el DNA han de ser analizados en el procedimiento descrito anteriormente, se prefiere que el ácido nucleico de control interno y/o externo sea RNA, ya que un ácido nucleico de control imita preferentemente el blanco más sensible de un ensayo que implica múltiples dianas, y las dianas de RNA por lo general tienen que ser controlados más estrechamente.

Por lo tanto, un aspecto preferido de la invención es el método descrito anteriormente, en el que dicho ácido nucleico de control interno y/o dicho ácido nucleico de control externo en un tampón acuoso es RNA.

Dado que el RNA es más propenso a la degradación que el DNA debido a influencias tales como pH alcalino, ribonucleasas, etc., los ácidos nucleicos de control interno hechos de RNA se proporcionan preferentemente como partículas blindadas. Las partículas blindadas tales como RNA especialmente blindado se describen por ejemplo, en PE910643. En resumen, el RNA, que puede producirse químicamente o, preferiblemente, heterológamente, por ejemplo, por bacterias tales como por ejemplo, E. coli, está al menos parcialmente encapsulada en una proteína de cubierta viral. Este último confiere resistencia del RNA hacia influencias externas, en particular ribonucleasas. Debe entenderse que el DNA de control interno también puede proporcionarse como una partícula blindada. Típicamente, se obtienen RNA y/o DNA blindados usando bacteriófagos. En el caso del DNA, el fago Lambda es útil en este contexto, como es conocido por el experto en la materia. Tanto el RNA blindado como el DNA son útiles como ácidos nucleicos de control interno y/o externo en el contexto de la invención.

Por lo tanto, un aspecto preferido de la invención es el método descrito anteriormente, en el que dicho ácido nucleico de control interno y/o dicho ácido nucleico de control externo es un ácido nucleico blindado.

En otras realizaciones de la invención, se prefiere que los plásmidos se usen como ácidos nucleicos de control internos y/o externos. Los plásmidos son ácidos nucleicos circulares derivados principalmente de DNA bacteriano extragenómico. Su uso en forma no recubierta como ácidos nucleicos de control es conocido por el experto en la técnica. Tales realizaciones son particularmente útiles en relación con el ácido nucleico externo en un tampón

acuoso como se usa en la invención, ya que en un tampón acuoso el ácido nucleico de control externo no necesita estar protegido cuidadosamente contra influencias adversas tales como nucleasas, como sería el caso en por ejemplo NHP, ya que este último puede presentar una actividad nucleasa significativa.

5 Por lo tanto, un aspecto preferido de la invención es el método descrito anteriormente, en el que dicho ácido nucleico de control externo es un plásmido. Preferiblemente, dicho plásmido no está recubierto. Más preferiblemente, dicho plásmido es DNA.

10 Típicamente, en diagnósticos basados en amplificación de ácido nucleico, las plantillas de RNA se transcriben en DNA antes de la amplificación y la detección.

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

20 Una "polimerasa con actividad de transcriptasa inversa" es una polimerasa de ácido nucleico capaz de sintetizar DNA basado en una plantilla de RNA. También es capaz de formar un DNA bicatenario una vez que el RNA ha sido transcrito inversamente en un DNAc de cadena sencilla. En una realización preferida de la invención, la polimerasa con actividad de transcriptasa inversa es termoestable.

25 En una realización preferida, el procedimiento de acuerdo con la invención comprende incubar una muestra que contiene una plantilla de RNA con un cebador oligonucleotídico suficientemente complementario a dicha plantilla de RNA para hibridar con ésta y una DNA polimerasa preferiblemente termoestable en presencia de al menos Los cuatro desoxirribonucleósido trifosfatos naturales o modificados, en un tampón apropiado que comprende un tampón de iones metálicos que, en una realización preferida, amortigua tanto el pH como la concentración de iones metálicos. Esta incubación se realiza a una temperatura suficiente para que dicho cebador se hibride con dicho molde de RNA y dicha DNA polimerasa para catalizar la polimerización de dichos desoxirribonucleósido trifosfatos para formar una secuencia de DNAc complementaria a la secuencia de dicho molde de RNA.

30 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "DNAc" se refiere a una molécula de DNA complementaria sintetizada usando una cadena de ácido ribonucleico (RNA) como molde. El RNA puede, por ejemplo, ser RNAm, RNAt, RNAr, u otra forma de RNA, tal como RNA viral. El DNAc puede ser de cadena sencilla, de doble hebra o puede estar unido a hidrógeno a través de una molécula de RNA complementaria como en un híbrido de RNA/DNAc.

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

40 En la amplificación de una molécula de RNA por una polimerasa de DNA, la primera reacción de extensión es la transcripción inversa utilizando una plantilla de RNA, y se produce una cadena de DNA. La segunda reacción de extensión, usando la plantilla de DNA, produce una molécula de DNA de doble cadena. De este modo, la síntesis de una cadena de DNA complementaria a partir de una plantilla de RNA mediante una polimerasa de DNA proporciona el material de partida para la amplificación.

45 Las polimerasas de DNA termoestables se pueden usar en una reacción de transcripción/amplificación inversa acoplada, de una sola enzima. El término "homogéneo", en este contexto, se refiere a una reacción de adición simple de dos pasos para la transcripción inversa y la amplificación de una diana de RNA. Por homogéneo se entiende que después de la etapa de transcripción inversa (RT), no hay necesidad de abrir el recipiente de reacción o ajustar de otro modo los componentes de 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 reacción tales como los reactivos de amplificación son por ejemplo, ajustados, añadidos o diluidos, para lo cual el recipiente de reacción tiene que ser abierto, o al menos su contenido tiene que ser manipulado. Aunque tanto las realizaciones homogéneas como las no homogéneas están comprendidas en el alcance de la invención, se prefiere el formato homogéneo para RT/PCR.

50 La transcripción inversa es un paso importante en una RT/PCR. Por ejemplo, se sabe en la técnica que los moldes de RNA muestran una tendencia hacia la formación de estructuras secundarias que pueden obstaculizar la unión del cebador y/o el alargamiento de la cadena de DNAc por la correspondiente transcriptasa inversa. Por lo tanto, las temperaturas relativamente altas para una reacción de RT son ventajosas con respecto a la eficiencia de la transcripción. Por otra parte, elevar la temperatura de incubación también implica mayor especificidad, es decir, los cebadores de RT no se hibridan con secuencias que presentan desajustes con respecto a la secuencia o secuencias esperadas. Particularmente en el caso de múltiples RNAs diana diferentes, puede ser deseable también transcribir y posteriormente amplificar y detectar secuencias con desacoplamiento simples, por ejemplo, en el caso de la posible

presencia de subcadenas o subespecies desconocidas o raras de organismos en la muestra de fluido.

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

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

Como aspecto adicional importante de la transcripción inversa, etapas de RT largas pueden dañar los moldes de DNA que pueden estar presentes en la muestra de fluido. Si la muestra de fluido contiene tanto especies de RNA como de DNA, es por lo tanto favorable mantener la duración de las etapas de RT lo más cortas posible, pero al mismo tiempo asegurar la síntesis de cantidades suficientes de DNAC para la posterior amplificación y la detección opcional de amplificados.

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

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

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

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

Por lo tanto, un aspecto preferido de la invención es el procedimiento descrito anteriormente, en el que la polimerasa con actividad de transcriptasa inversa es una polimerasa que comprende una mutación que confiere una velocidad de extensión de ácido nucleico mejorada y/o una actividad de transcriptasa inversa mejorada en relación a la correspondiente polimerasa de tipo salvaje.

En una realización más preferida, en el procedimiento descrito anteriormente, la polimerasa con actividad de transcriptasa inversa es una polimerasa que comprende una mutación que confiere una actividad de transcriptasa inversa mejorada en relación a la correspondiente polimerasa de tipo salvaje.

Las polimerasas que llevan mutaciones puntuales que las hacen particularmente útiles en el contexto de la invención se describen en el documento WO 2008/046612. En particular, las polimerasas preferidas para utilizar en el contexto de la presente invención son polimerasas de DNA mutadas que comprenden al menos el siguiente motivo en el dominio polimerasa:

T-G-R-L-S-S-X_{b7}-X_{b8}-P-N-L-Q-N;

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

Un ejemplo particularmente preferido son los mutantes de la polimerasa de DNA termoestable de la especie *Thermus Z05* (descrita, por ejemplo, en el documento US 5.455.170), comprendiendo dichos mutantes mutaciones en el dominio polimerasa en comparación con la correspondiente enzima Z05 de tipo salvaje. Se prefiere especialmente para el método de acuerdo con la invención una polimerasa de DNA 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, se prefiere Mn^{2+} como catión divalente y se incluye típicamente 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 contiene tampón de Tricina 50 mM, por ejemplo, el $MnCl_2$ está generalmente presente a una concentración de 0,5-7,0 mM; Se prefiere 0,8-1,4 mM cuando se utilizan 200 mM de cada dGTP, dATP, dUTP y dCTP; y 2,5-3,5 mM de $MnCl_2$ es lo más preferido. Además, el uso de Mg^{2+} como un catión divalente para la transcripción inversa es también preferido en el contexto de la presente invención.

Puesto que está dentro del alcance de la invención la transcripción inversa de ácidos nucleicos diana de RNA en DNAC mientras se conservan los ácidos nucleicos diana de DNA, de manera que tanto el DNAC como el DNA pueden usarse para la posterior amplificación, el proceso controlado internamente y externamente descrito anteriormente es particularmente útil para la amplificación simultánea de ácidos nucleicos diana derivados de ambos organismos que tienen un genoma de RNA u organismos que tienen un genoma de DNA. Esta ventaja aumenta considerablemente el espectro de diferentes organismos, especialmente patógenos, que pueden analizarse en condiciones físicas idénticas.

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

"Simultáneamente" o "simultáneo", en el sentido de la invención, significa que dos acciones, tales como la amplificación de un primer y un segundo o más ácidos nucleicos, se realizan al mismo tiempo y bajo las mismas condiciones físicas. En una realización, la amplificación simultánea de al menos un primer y un segundo ácido nucleico diana se lleva a cabo en un recipiente. En otra realización, la amplificación simultánea se lleva a cabo con al menos un ácido nucleico en un recipiente y al menos un segundo ácido nucleico en un segundo recipiente, al mismo tiempo y bajo las mismas condiciones físicas, particularmente con respecto a la temperatura y el tiempo de incubación. El ácido nucleico de control interno mencionado anteriormente está presente en cada uno de dichos recipientes, mientras que el ácido o ácidos nucleicos de control externo están presentes solamente en uno o varios recipientes diferentes.

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

Especialmente debido a un óptimo de temperatura apropiado, las enzimas como la polimerasa Tth o, preferiblemente, la polimerasa de DNA Z05 mutante mencionada anteriormente son adecuadas para llevar a cabo la posterior etapa de amplificación de los ácidos nucleicos diana. La explotación de la misma enzima tanto para la transcripción inversa como para la amplificación contribuye a la facilidad de realización del proceso y facilita su automatización, puesto que la muestra de fluido no tiene que ser manipulada entre la RT y la etapa de amplificación.

Por lo tanto, en una realización preferida, en el procedimiento descrito anteriormente, se utiliza la misma polimerasa con actividad de transcriptasa inversa para la transcripción inversa y para la amplificación en la etapa f. Preferiblemente, la enzima es la polimerasa de DNA Z05 mutante descrita anteriormente.

Con el fin de no exponer la polimerasa u otros componentes de la mezcla de reacción en el contexto de la invención, en una realización preferida, las etapas por encima de 90 °C son de hasta 20 segundos, preferiblemente hasta 15 segundos, más preferiblemente hasta 10 segundos, más preferiblemente hasta 5 segundos y lo más preferiblemente 5 segundos de duración. Esto también reduce el tiempo hasta el resultado y reduce el tiempo total requerido del ensayo.

En una disposición homogénea de este tipo, puede ser de una ventaja considerable sellar los recipientes de reacción antes de iniciar la RT y la amplificación, reduciendo así el riesgo de contaminación. El sellado puede lograrse por ejemplo, mediante la aplicación de una hoja que es preferentemente transparente, una tapa o por aceite añadido a los recipientes de reacción y que forma una fase lipófila como una capa de sellado en la parte superior del fluido.

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

Para la facilidad de manejo y para facilitar la automatización, es preferible combinar los al menos dos recipientes de reacción en una disposición integral, de modo que puedan ser manipulados conjuntamente.

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

Las disposiciones integrales pueden ser, por ejemplo, viales o tubos unidos de manera reversible o irreversible entre sí o dispuestos en un estante. Preferiblemente, la disposición integral es una placa de múltiples pocillos.

La diana de la etapa de amplificación puede ser una molécula híbrida de RNA/DNA. La diana puede ser un ácido nucleico de cadena sencilla o de doble cadena. Aunque el procedimiento de PCR más ampliamente utilizado utiliza una diana de doble hebra, esto no es una necesidad. Después del primer ciclo de amplificación de una diana de DNA monocatenaria, la mezcla de reacción contiene una molécula de DNA de doble cadena que consiste en la diana monocatenaria y una hebra complementaria recién sintetizada. De forma similar, siguiendo el primer ciclo de amplificación de una diana de RNA/cDNA, la mezcla de reacción contiene una molécula de DNAc de doble cadena. En este punto, sucesivos ciclos de amplificación proceden como se ha descrito anteriormente.

Dado que la amplificación de ácidos nucleicos, especialmente pero no sólo en el caso de la PCR, es muy eficaz si se lleva a cabo como ciclos de reacción, un aspecto preferido de la invención es el procedimiento descrito anteriormente, en el que la reacción de amplificación en la etapa f. consiste en varios pasos de ciclado.

Los métodos de detección de ácidos nucleicos adecuados son conocidos por el experto en la materia y se describen en libros de texto estándar como Sambrook J. et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989 y Ausubel F. et al.: Current Protocols in Molecular Biology 1987, J. Wiley and Sons, NY. Puede haber también etapas de purificación adicionales antes de que se lleve a cabo la etapa de detección de ácido nucleico tal como por ejemplo, una etapa de precipitación. Los métodos de detección pueden incluir, pero no se limitan a, la unión o intercalación de colorantes específicos tales como bromuro de etidio que se intercala en el DNA de doble hebra y cambia su fluorescencia posteriormente. El ácido nucleico purificado también se pueden separar por métodos electroforéticos opcionalmente después de una digestión de restricción y visualizarse a continuación. También hay ensayos basados en sondas que explotan la hibridación de oligonucleótidos a secuencias específicas y la posterior detección del híbrido.

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

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

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

Por lo tanto, un aspecto preferido de la invención es el procedimiento descrito anteriormente, en el que las sondas están marcadas con una porción fluorescente donadora y la correspondiente porción fluorescente aceptora.

Los métodos expuestos anteriormente se basan preferentemente en la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) entre una porción fluorescente donadora y una porción fluorescente aceptora. Una porción fluorescente donadora representativa es la fluoresceína, y las porciones fluorescentes aceptoras correspondientes representativas 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 la porción fluorescente donadora y visualizar y/o medir la longitud de onda emitida por la correspondiente porción fluorescente aceptora. En el procedimiento de acuerdo con la invención, la detección se sigue preferiblemente cuantificando el FRET. Preferiblemente, la detección se realiza después de cada paso de ciclación. Más preferiblemente, la detección se realiza en tiempo real. Mediante el uso de instrumentos de PCR en tiempo real comercialmente disponibles (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 ciclo considerablemente reducido. Dado que la detección ocurre simultáneamente con la amplificación, los métodos de PCR en tiempo real obvian la necesidad de manipulación del producto de amplificación y disminuyen el riesgo de contaminación cruzada entre los productos de amplificación. La PCR en tiempo real reduce en gran medida el tiempo de respuesta y es una alternativa atractiva a las técnicas convencionales de PCR en el laboratorio clínico.

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

La tecnología TaqMan® utiliza una sonda de hibridación monocatenaria marcada con dos porciones fluorescentes. Cuando se excita una primera porción fluorescente con luz de una longitud de onda adecuada, la energía absorbida se transfiere a una segunda porción fluorescente de acuerdo con los principios de FRET. La segunda porción fluorescente es generalmente una molécula de bloqueo. Los colorantes fluorescentes típicos utilizados en este formato son, por ejemplo, entre otros, FAM, HEX, CY5, JA270, Cyan y CY5.5. Durante la etapa de hibridación de la reacción de PCR, la sonda de hibridación marcada se une al ácido nucleico diana (es decir, el producto de

amplificación) y se degrada por la actividad exonucleasa 5' a 3' de la polimerasa Taq u otra polimerasa adecuada como es conocido por el experto en la técnica, tal como la polimerasa Z05 mutante preferida, durante la posterior fase de elongación. Como resultado, la porción fluorescente excitada y la porción bloqueadora se separan espacialmente entre sí. Como consecuencia, tras la excitación de la primera porción fluorescente en ausencia del inhibidor, se puede detectar la emisión de fluorescencia de la primera porción fluorescente.

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

Como una alternativa a FRET, se puede detectar un producto de amplificación usando un colorante de unión a DNA de doble hebra, tal como un colorante fluorescente de unión al DNA (por ejemplo, SYBRGREEN I® o SYBRGOLD® (Molecular Probes)). Tras la interacción con el ácido nucleico bicatenario, tales colorantes fluorescentes de unión al DNA emiten una señal de fluorescencia después de la excitación con luz a una longitud de onda adecuada. También se puede usar un colorante de unión a DNA de doble hebra, tal como un colorante de intercalación de ácido nucleico. Cuando se utilizan colorantes de unión a DNA de doble cadena, se realiza usualmente un análisis de la curva de fusión para confirmar la presencia del producto de amplificación.

Las balizas moleculares conjuntamente con FRET también se pueden usar para detectar la presencia de un producto de amplificación usando los métodos de PCR en tiempo real de la invención. La tecnología de baliza molecular utiliza una sonda de hibridación marcada con una primera porción fluorescente y una segunda porción fluorescente. La segunda porción fluorescente es generalmente un bloqueador, y los marcadores fluorescentes están situados típicamente 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 resultado de la formación de la estructura secundaria dentro de la sonda, ambas porciones fluorescentes están en proximidad espacial cuando la sonda está en solución. Después de la hibridación con los productos de amplificación, la estructura secundaria de la sonda se rompe y las porciones fluorescentes se separan entre sí de tal manera que después de la excitación con luz de una longitud de onda adecuada, se puede detectarse la emisión de la primera porción fluorescente.

Por lo tanto, un método preferido de acuerdo con la invención es el método descrito anteriormente utilizando FRET, en el que dichas sondas comprenden una secuencia de ácido nucleico que permite la formación de estructura secundaria, en donde dicha formación de estructura secundaria da lugar a una proximidad espacial entre dichas primera y segunda porciones fluorescentes.

El FRET eficiente sólo puede tener lugar cuando las porciones fluorescentes están en proximidad local directa y cuando el espectro de emisión de la porción fluorescente donadora se superpone con el espectro de absorción de la porción fluorescente aceptora.

Así, en una realización preferida, dichos fragmentos fluorescentes donadores y aceptores están dentro de no más de 5 nucleótidos entre sí en dicha sonda.

En una realización preferida adicional, dicha porción fluorescente aceptora es un bloqueador.

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

Por tanto, en una realización preferida, en el procedimiento descrito anteriormente, la amplificación emplea una enzima polimerasa que tiene actividad exonucleasa 5'-3'.

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

El ácido nucleico de control interno y/o el ácido nucleico de control externo utilizado en la presente invención puede servir como un "ácido nucleico estándar cuantitativo" que es apto para ser utilizado como referencia para cuantificar, es decir, para determinar la cantidad de los ácidos nucleicos diana. Para este propósito, uno o más ácidos nucleicos cuantitativos estándar experimentan todas las posibles etapas de preparación de la muestra junto con los ácidos nucleicos diana. Además, se procesa un ácido nucleico cuantitativo estándar en todo el método dentro de la misma mezcla de reacción. Debe generar, directa o indirectamente, una señal detectable tanto en presencia como en ausencia del ácido nucleico diana.

"Generar" significa producir, directa o indirectamente. En el contexto de una "señal detectable", "generar" puede por

tanto significar "producir directamente", por ejemplo, en el caso de un colorante fluorescente que emite una señal fluorescente, o "para producir indirectamente" en el sentido de "evocar" o "inducir", tal como un "ácido nucleico microbiano" que genera "una señal detectable" a través de un "marcador" tal como un "colorante fluorescente", o a través de una sonda de ácido nucleico que lleva una "marcador" tal como un "colorante fluorescente".

La concentración del ácido nucleico estándar cuantitativo tiene que ser cuidadosamente optimizada en cada ensayo con el fin de no interferir con la sensibilidad, pero con el fin de generar una señal detectable, también por ejemplo, a concentraciones muy altas. En términos del límite de detección (LD, véase más adelante) del correspondiente ensayo, el intervalo de concentración para el "ácido nucleico cuantitativo estándar" es preferiblemente 20-5000x LD, más preferiblemente 20-1000x LD, lo más preferiblemente 20-5000x LD. La concentración final del ácido nucleico estándar cuantitativo en la mezcla de reacción depende del intervalo de medición cuantitativo logrado.

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

Un método ampliamente utilizado para calcular una LD es el "Análisis de probit", que es un método de análisis de la relación entre un estímulo (dosis) y la respuesta cuántica (todo o nada). En un experimento típico de respuesta cuántica, a grupos de animales se les administran diferentes dosis de un fármaco. Se registra el porcentaje de muerte en cada nivel de dosis. Estos datos pueden entonces ser analizados usando el análisis Probit. El modelo Probit asume que el porcentaje de respuesta está relacionado con la dosis logarítmica como la distribución normal acumulativa. Es decir, las dosis logarítmicas pueden usarse como variables para leer el porcentaje de muerte a partir de la distribución normal acumulativa. El uso de la distribución normal, en lugar de otras distribuciones de probabilidad, influye en la tasa de respuesta pronosticada en los extremos alto y bajo de las dosis posibles, pero tiene poca influencia cerca del centro.

El análisis de Probit puede aplicarse a distintos "índices de acierto". Como se conoce en la técnica, un "índice de acierto" se expresa comúnmente en porcentaje [%] e indica el porcentaje de resultados positivos a una concentración específica de un analito. Así, por ejemplo, se puede determinar un LD a un 95% de índice de acierto, lo que significa que el LD se calcula para un ajuste en el que el 95% de los resultados válidos son positivos.

En una realización preferida, el procedimiento descrito anteriormente proporciona una LD de 1 a 100 cp/ml o de 0,5 a 50 UI/ml, más preferiblemente de 1 a 75 cp/ml o de 0,5 a 30 UI/ml, más preferiblemente de 1 a 25 cp/ml o 1 a 20 UI/ml.

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

- VIH: hasta 60 cp/ml, más preferiblemente hasta 50 cp/ml, más preferiblemente hasta 40 cp/ml, más preferiblemente hasta 30 cp/ml, más preferiblemente hasta 20 cp/ml, más preferiblemente hasta 15 cp/ml.
- VHB: hasta 10 UI/ml, más preferiblemente hasta 7,5 UI/ml, más preferiblemente hasta 5 UI/ml
- VHC: hasta 10 UI/ml, más preferiblemente hasta 7,5 UI/ml, más preferiblemente hasta 5 UI/ml
- VNO I: hasta 20 cp/ml, más preferiblemente hasta 15 cp/ml, más preferiblemente hasta 10 cp/ml
- VNO II: hasta 20 cp/ml, más preferiblemente hasta 15 cp/ml, más preferiblemente hasta 10 cp/ml, más preferiblemente hasta 5 cp/ml
- JEV: hasta 100 cp/ml, más preferiblemente hasta 75 cp/ml, más preferiblemente hasta 50 cp/ml, más preferiblemente hasta 30 cp/ml
- SLEV: hasta 100 cp/ml, más preferiblemente hasta 75 cp/ml, más preferiblemente hasta 50 cp/ml, más preferiblemente hasta 25 cp/ml, más preferiblemente hasta 10 cp/ml.

Un ejemplo de cómo realizar el cálculo de resultados cuantitativos en el formato TaqMan basado en un ácido nucleico de control interno que sirve como ácido nucleico estándar cuantitativo se describe a continuación: Se calcula un título a partir de los datos de entrada de los valores de fluorescencia corregidos mediante instrumentos de una prueba de PCR completa. Un conjunto de muestras que contienen un ácido nucleico diana y un ácido nucleico de control interno que actúa como un ácido nucleico cuantitativo estándar se someten a PCR en un termociclador usando un perfil de temperatura especificado. En las temperaturas y tiempos seleccionados durante el perfil de PCR las muestras se iluminan mediante luz filtrada y los datos de fluorescencia filtrados se recogen para cada muestra para el ácido nucleico diana y el ácido nucleico de control interno. Una vez completada la PCR, las lecturas de fluorescencia se procesan para producir un conjunto de datos de concentración de 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 varias comprobaciones de plausibilidad, se calculan los valores de codo (CT) para el ácido nucleico de control interno y el ácido nucleico diana. El valor del codo se define como el punto en el que la fluorescencia del ácido nucleico diana o del ácido nucleico de control interno cruza un umbral predefinido (concentración de fluorescencia). La determinación de los títulos se basa

en los supuestos de que el ácido nucleico diana y el ácido nucleico de control interno y/o externo son amplificados con la misma eficacia y que al valor calculado del codo se igualan cantidades iguales de copias de amplicón de ácido nucleico diana y ácido nucleico de control interno amplificado y detectado. Por lo tanto, el (CTQS - CTdiana) es lineal al log (conc. diana /conc. QS). En este contexto, QS indica el estándar cuantitativo del ácido nucleico. El título T puede entonces calcularse por ejemplo usando una fórmula de calibración polinómica como en la siguiente ecuación:

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

Se conocen las constantes polinómicas y la concentración del ácido nucleico estándar cuantitativo, por lo tanto la única variable en la ecuación es la diferencia (CTQS - CTdiana).

Además, en el sentido de la invención, el ácido nucleico de control interno o el ácido nucleico de control externo puede servir como un "ácido nucleico de control cualitativo". Un "ácido nucleico de control cualitativo" es particularmente útil para confirmar la validez del resultado de ensayo de un ensayo de detección cualitativo: incluso en el caso de un resultado negativo, se debe detectar el control cualitativo, de lo contrario se considera que el ensayo en sí es inoperante. Sin embargo, en una configuración cualitativa, no necesariamente tiene que ser detectado en caso de un resultado positivo. Como consecuencia, su concentración debe ser relativamente baja. Tiene que ser cuidadosamente adaptado al correspondiente ensayo y a su sensibilidad. Preferiblemente, el intervalo de concentración para el ácido nucleico de control cualitativo comprende un intervalo de 1 copia por reacción a 1000 copias por reacción. En relación con el límite de detección del ensayo correspondiente (LD), su concentración es preferiblemente entre el LD de un ensayo y el valor de 25 veces el LD, más preferiblemente entre el LD y 10x LD. Más preferiblemente, está entre 2x y 10x LD. Incluso más preferiblemente, está entre 5x y 10x LD. Lo más preferiblemente, es 5x o 10x LD.

Los resultados descritos anteriormente pueden ser adulterados y, por ejemplo, comprender falsos positivos, en el caso de contaminación cruzada con ácidos nucleicos de fuentes distintas de la muestra de fluido. En particular, los amplificados de experimentos anteriores pueden contribuir a tales efectos no deseados. Un método particular para minimizar los efectos de la contaminación cruzada de la amplificación de ácido nucleico se describe en la Patente de Estados Unidos N° 5.035.996. El método implica la introducción de bases de nucleótidos no convencionales, tales como dUTP, en el producto amplificado y exponiendo los productos de transición a un tratamiento enzimático y/o físico-químico para hacer que el DNA del producto sea incapaz de servir como molde para las amplificaciones posteriores. Las enzimas para tales tratamientos son conocidas en la técnica. Por ejemplo, uracil-DNA glicosilasa, también conocida como uracil-N-glicosilasa o UNG, elimina residuos de uracilo de productos de PCR que contienen esa base. El tratamiento enzimático da como resultado la degradación del producto de PCR contaminante y, por lo tanto, sirve para descontaminar la reacción de amplificación.

Así, un aspecto preferido de la invención es el procedimiento descrito anteriormente, comprendiendo además entre la etapa d. y la etapa e. las etapas de:

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

Preferiblemente, la enzima es uracilo-N-glicosilasa.

En el procedimiento de acuerdo con la invención, es preferible que todas las etapas sean automatizadas. "Automatizado" significa que las etapas de un proceso son adecuadas para ser llevadas a cabo con un aparato o máquina capaz de funcionar con poco o ningún control o influencia externa por parte de un ser humano. Sólo los pasos de preparación para el método pueden tener que hacerse a mano, por ejemplo, los contenedores de almacenamiento tienen que ser llenados y puestos en su lugar, la elección de las muestras ha de ser realizada por un ser humano y las etapas adicionales conocidas por el experto en la materia, por ejemplo, el funcionamiento de un ordenador de control. El aparato o máquina puede, por ejemplo, agregar líquidos automáticamente, mezclar las muestras o realizar las etapas de incubación a temperaturas específicas. Típicamente, tal máquina o aparato es un robot controlado por un ordenador que lleva a cabo un programa en el que se especifican los pasos y comandos individuales.

Otro objeto útil en el contexto de la invención es un sistema analítico (440) para amplificar un ácido nucleico diana que puede estar presente en al menos una muestra de fluido, comprendiendo dicho sistema:

- una estación de amplificación (405) que comprende recipientes de reacción, Comprendiendo dichos recipientes de reacción reactivos de amplificación, ácido nucleico diana purificado y un ácido nucleico de control interno purificado, y al menos un ácido nucleico de control externo en un tampón acuoso,

en el que dicho al menos un ácido nucleico de control externo en un tampón acuoso está comprendido en un recipiente diferente del dicho ácido nucleico diana purificado.

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

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

10 El sistema analítico (440, figura 11) mencionado anteriormente es un sistema (440) que comprende un módulo (401) para aislar y/o purificar un analito. Además, el sistema (440) comprende adicionalmente un módulo (403) para analizar dicho analito para obtener una señal detectable. La señal detectable puede detectarse en el mismo módulo (401, 402, 403) o, alternativamente, en un módulo separado. El término "módulo", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a cualquier posición 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 ser controlado de forma autónoma o el control del módulo (401, 402, 403) se puede compartir con otros módulos. 15 Preferiblemente, todos los módulos son controlados centralmente. La transferencia entre módulos (401, 402, 403) puede ser manual, pero preferiblemente automatizada. Así, una serie de diferentes analizadores automatizados (400) son útiles en el contexto de la presente invención.

20 Se describe adicionalmente aquí el sistema analítico descrito anteriormente, que comprende además:

- una estación de separación que comprende un material de soporte sólido, estando dicha estación de separación construida y dispuesta para separar y purificar ácidos nucleicos comprendidos en dicha al menos una muestra de fluido.

25 La "estación de separación" se ha descrito anteriormente.

Una "estación de amplificación" comprende una incubadora con temperatura controlada para incubar el contenido de al menos dos recipientes de reacción. Comprende además una variedad de recipientes de reacción como tubos o placas, en los que tiene lugar una reacción para el análisis de la muestra tal como PCR. Los límites exteriores o paredes de tales recipientes son químicamente inertes, de tal manera que no interfieren con la reacción de 30 amplificación que tiene lugar dentro. Para la facilidad de manejo y para facilitar la automatización, es preferible combinar los al menos dos recipientes de reacción en una disposición integral, para que puedan ser manipulados conjuntamente.

35 Por consiguiente, también se describe aquí el sistema analítico descrito anteriormente, en el que los al menos dos recipientes de reacción se combinan en una disposición integral.

Las disposiciones integrales pueden, por ejemplo, ser viales o tubos unidos de manera reversible o irreversible entre sí o dispuestos en un estante. Preferiblemente, la disposición integral es una placa de múltiples pocillos.

40 Por lo tanto, especialmente útil en el contexto de la presente invención es el sistema analítico descrito anteriormente, en el que dicha disposición integral es una placa de pocillos múltiples y dicho al menos un ácido nucleico de control externo en un tampón acuoso está comprendido en un pocillo diferente del ácido nucleico diana purificado mencionado.

45 Como se describe en el contexto del procedimiento de acuerdo con la invención, en algunos casos se prefiere incluir un control negativo como se ha definido anteriormente.

50 Por lo tanto, particularmente útil en el contexto de la invención es el sistema analítico descrito anteriormente, en el que dicha estación de amplificación comprende además un control negativo en un recipiente diferente al de dicho ácido nucleico diana purificado y dicho ácido nucleico de control externo en un tampón acuoso.

55 En un caso adicional, dicho control negativo es el mismo tampón que sirve como matriz de fluido para dicho ácido nucleico de control externo.

En otro caso, dicho control negativo es agua.

60 Preferiblemente, dicha placa de múltiples pocillos se mantiene en una estación de retención. En un caso más preferido, un asa transporta un recipiente de múltiples pocillos desde una estación de retención a una esclusa (460), y una segundo asa transporta dicha placa de múltiples pocillos de dicha esclusa a dicha estación de amplificación, donde ambas asas interactúan con dicha placa de múltiples pocillos mediante una interacción de bloqueo.

En un caso preferido, el sistema analítico está totalmente automatizado.

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

En un segundo caso, el ácido nucleico diana purificado se transfiere desde dicha estación de separación a dicha estación de amplificación. Preferiblemente, un pipeteador que comprende pipetas con puntas de pipeta unidas transfiere el líquido que comprende el ácido nucleico purificado.

En un tercer caso, el ácido nucleico purificado se transfiere desde dicha estación de separación a un recipiente de reacción en una disposición integral mantenida en una estación de retención. Preferiblemente, dicho recipiente de reacción en una disposición integral se transfiere entonces de dicha estación de mantenimiento a dicha estación de amplificación.

El sistema analítico descrito aquí preferiblemente comprende además una unidad de pipeteo. Dicha unidad de pipeteo comprende al menos una pipeta, preferiblemente múltiples pipetas. En cierto caso, dichas múltiples pipetas se combinan en una o más disposiciones integrales, dentro de las cuales las pipetas pueden manipularse preferiblemente individualmente. Las pipetas usadas en el contexto de la invención son preferiblemente pipetas que comprenden puntas de pipeta como se ha descrito anteriormente. En otro caso, las pipetas son agujas de pipeteado.

Alternativamente, se puede transferir un recipiente de reacción o disposición de recipientes de reacción usados para la preparación de muestras en la estación de separación y que contienen el fluido que comprende los ácidos nucleicos diana purificados desde la estación de separación a la estación de amplificación.

Para este propósito, el sistema analítico descrito aquí preferiblemente comprende además una unidad de transferencia, comprendiendo preferiblemente dicha unidad de transferencia un dispositivo robótico, comprendiendo preferiblemente dicho dispositivo un asa.

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

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

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

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

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

Se construye un sellador (410) y se dispone para sellar cualquier recipiente utilizado en conexión con el sistema analítico de acuerdo con la invención. Un sellador de este tipo puede sellar, por ejemplo, tubos con tapas apropiadas, o placas multipocillos con papel de aluminio, u otros materiales de sellado adecuados.

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

Preferiblemente, el sistema analítico descrito aquí comprende además una unidad de control para controlar componentes del sistema.

Tal "unidad de control" (1006) puede comprender un programa para asegurar que los diferentes componentes de dicho sistema analítico funcionan e interactúan correctamente y con la sincronización correcta, por ejemplo, mover y manipular componentes tales como pipetas de una manera coordinada. La unidad de control también puede comprender un procesador que ejecuta un sistema operativo en tiempo real (RTOS), que es un sistema operativo multitarea destinado a aplicaciones en tiempo real. En otras palabras, el procesador del sistema es capaz de gestionar las restricciones en tiempo real, es decir, los plazos operativos desde el evento hasta la respuesta del sistema independientemente de la carga del sistema. Controla en tiempo real que diferentes unidades dentro del sistema funcionan y responden correctamente según las instrucciones dadas.

En un cierto caso, el sistema analítico (440) para procesar un analito comprende

- a. Una primera posición que comprende primeros receptáculos (1001) en disposición lineal que comprende muestras de líquido (1010), una placa de procesamiento (101) que comprende receptáculos (103) en una disposición $n \times m$ para contener una muestra de líquido (1011), un primer dispositivo de pipeteo (700) que comprende al menos dos unidades de pipeteo (702) en disposición lineal, en donde dichas unidades de pipeteo (702) están acopladas a puntas de pipeta (3, 4) y un estante de puntas (70) que comprende puntas de pipeta (3, 4) en una disposición $ac(n \times m)$;
- b. una segunda posición que comprende un soporte (201, 128) para dicha placa de procesamiento (101), un soporte (330) para una placa de múltiples pocillos, un soporte (470) para dicho estante de puntas (70) y un segundo dispositivo de pipeteo (35), comprendiendo dicho segundo dispositivo de pipeteo (35) unidades de pipeteo (702) en una disposición $n \times m$ para el acoplamiento a las puntas de pipeta (3, 4) (figura 12). El término "soporte" tal como se utiliza en la presente documento se refiere a cualquier disposición capaz de recibir un estante o una placa de procesamiento.

Las ventajas del sistema analítico (440) descrito en el presente documento son las descritas anteriormente para el método de la presente invención.

Preferiblemente, la posición de dichas unidades de pipeteo (702) del primer dispositivo de pipeteo (700) es variable. A continuación se describen ciertas variantes de dicho primer dispositivo de pipeteo (700).

En un caso, el estante de puntas (70) comprende puntas de pipeta (3, 4) en una disposición $ax(n \times m)$. Preferentemente, un primer tipo (4) y un segundo tipo (3) de puntas de pipeta están comprendidos en el estante de puntas (70). En este caso, el primer tipo de puntas de pipeta (4) está dispuesto en una disposición $n \times m$, y el segundo tipo de puntas de pipeta (3) está dispuesto en la disposición $n \times m$. En este contexto, "n" denota el número de filas y m el número de columnas, donde n es preferiblemente 6 y m es preferiblemente 8. Más preferiblemente, el primer tipo de puntas de pipeta (4) tiene un volumen diferente del segundo tipo de puntas de pipeta (3), lo más preferiblemente, el volumen del primer tipo de puntas de pipeta (4) es superior a 500 μ l, y el volumen del segundo tipo de puntas de pipeta (3) es inferior a 500 μ l. En esta realización, $a = 2$. Sin embargo, también se describen casos con más de dos tipos de puntas de pipeta, y por tanto $a > 2$.

En un aspecto, el sistema analítico (440) descrito aquí comprende una unidad de control (1006) para asignar tipos de muestras y pruebas individuales a posiciones individuales de dicha placa de procesamiento (101). Preferiblemente, dichas posiciones son celdas separadas (401, 402).

En un caso, el sistema comprende adicionalmente un sistema de transferencia (480) para transferir dicha placa de proceso (101) y dicha estante (70) entre las posiciones primera (402) y segunda (401). Las formas preferidas de dicho sistema de transferencia (480) son cintas transportadoras o, más preferiblemente, una o más asas.

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

Una versión particularmente útil del sistema (440) descrita aquí comprende adicionalmente una tercera estación (403) que comprende una incubadora con temperatura controlada para incubar dicho analito con los reactivos necesarios para obtener una señal detectable. A continuación se describen más detalles de este sistema.

Se logra un control más óptimo de la asignación de muestras y ensayos a la disposición $n \times m$ con un primer procesador (1004) que está comprendido en dicha primera posición (402) a la que dicha unidad de control (1006) transfiere instrucciones para asignar tipos de muestra y pruebas individuales a posiciones específicas en la disposición $n \times m$ de los recipientes (103) de la placa de proceso (101), y un segundo procesador (1005) que está comprendido en dicha segunda posición (401) a la que dicha unidad de control (1006) transfiere instrucciones para asignar tipos de muestras y pruebas individuales a posiciones específicas en la disposición $n \times m$ de los recipientes (103) de la placa de proceso.

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

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

Otro aspecto preferido de la invención es el procedimiento descrito anteriormente que comprende más de un ácido nucleico de control externo.

En tales realizaciones, puede analizarse ventajosamente una pluralidad de diferentes ácidos nucleicos diana

posiblemente contenidos en una única muestra de fluido o una pluralidad de diferentes muestras de fluido. Por ejemplo, dichos ácidos nucleicos de control externo pueden diseñarse como ácidos nucleicos de control específicos de diana que tienen una secuencia similar o idéntica al ácido nucleico diana correspondiente. Los métodos para diseñar un ácido nucleico de control externo específico de diana son conocidos por el experto en la técnica.

5 Todos los demás detalles preferidos y descripciones específicas del sistema analítico descrito en el presente documento son los mencionados para el procedimiento de acuerdo con la invención.

Breve descripción de las figuras

10 Figura 1: Representación esquemática del flujo de trabajo de preparación de muestras tal como se utiliza en una realización de la invención. Las flechas apuntando hacia abajo indican la adición de un componente o reactivo a cada pocillo correspondiente de la placa de pozos profundo mencionada anteriormente, las flechas que apuntan hacia arriba corresponde a la correspondiente eliminación. Estas acciones se realizaron manualmente en los pasos 15 2, 3, 4, 21 y 22, por el cabezal de proceso del aparato en las etapas 10, 14, 16, 18 y 24, y por el cabezal de reactivo del aparato en las etapas 5, 6, 7, 11, 15 y 19.

20 Debe entenderse que los volúmenes utilizados se pueden ajustar con flexibilidad preferiblemente al menos aproximadamente hasta el 30% de los valores descritos. En particular, en el caso de la etapa 2, el volumen de la muestra es preferiblemente variable para tener en cuenta los diferentes tipos de muestras de fluido que pueden requerir más o menos material de partida para obtener resultados adecuados, como es conocido por el experto. Preferiblemente, el intervalo es de aproximadamente 100 µl a aproximadamente 850 µl. Más preferiblemente, es de aproximadamente 100 µl, aproximadamente 500 µl o aproximadamente 850 µl. Preferiblemente, el volumen en los correspondientes recipientes se ajusta a un volumen total idéntico con el diluyente en la etapa 3. Preferiblemente, como en el esquema mostrado en la Fig. 1, el volumen total se añade hasta aproximadamente 850 µl.

25 Figura 2a: Curva de crecimiento de la PCR para el VIH en NHP

Figura 2b: Curva de crecimiento de la PCR para el VIH en tampón acuoso

30 Figura 2c: Curva de crecimiento de la PCR para el VHC en el NHP

Figura 2d: Curva de crecimiento de la PCR para el VHC en tampón acuoso

35 Figura 2e: Curva de crecimiento de la PCR para el VHB en el NHP

Figura 2f: Curva de crecimiento de la PCR para el VHB en tampón acuoso

Figura 3: Vista en perspectiva de la placa de procesamiento.

40 Figura 4: Vista en perspectiva de la placa de procesamiento desde el ángulo opuesto.

Figura 5: Vista superior de la placa de procesamiento.

45 Figura 6: Vista en sección transversal a lo largo del lado más largo de la placa de procesamiento.

Figura 7: Una vista parcial de la vista en sección transversal.

Figura 8: Vista en perspectiva del lado más largo de la placa de procesamiento.

50 Figura 9: a) a d) muestra vistas diferentes de la segunda realización de la estación de separación magnética.

Figura 10: (a) a (c) muestra una vista de la primera realización de la estación de separación magnética que sostiene la placa de procesamiento, con el primer tipo de imanes en la posición Z más alta y el segundo tipo de imanes en la posición Z más baja.

55 Figura 11: Dibujos esquemáticos de un analizador que comprende diferentes estaciones, módulos o celdas.

Figura 12: Muestra un sistema analítico de la presente invención.

60 Ejemplos

Los siguientes ejemplos describen una realización en la que se puede trabajar la invención.

Ejemplo 1

65 Este ejemplo describe un procedimiento para aislar, amplificar y detectar un ácido nucleico diana, dicho

procedimiento implica un ácido nucleico de control externo en un tampón acuoso.

En resumen, en la realización representada, la PCR en tiempo real se llevó a cabo en condiciones idénticas sobre los tres ácidos nucleicos diana viral diferentes VIH, VHB y VHC. Para todas las dianas, se utilizó material estándar. Estándares adecuados u otros tipos de dianas están disponibles para el experto en la técnica.

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

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

Se preparó un panel combinado de VIH, VHB y VHC, con las concentraciones enumeradas en la Tabla 1, en una matriz de NHP y en la matriz de tampón acuosa de acuerdo con la Tabla 2. El panel basado en NHP y el panel basado en tampón se realizaron en repeticiones de 28 sobre el Proc. 1.6.1 de la Hamilton Star. El NHP fue adquirido de SeraCare Life Science (Milford, MA, EE.UU.).

Tabla 1: Concentración de panel combinado

Analito	VIH (cp/ml)	VHC (cp/ml)	VHB (cp/ml)
Concentración	350	150	80

Tabla 2: Tampón acuoso

IC/IQS – Tampón de almacenamiento	Conc. o pH
Tris (mM)	10
EDTA (mM)	0,1
Azida sódica (p/v,%)	0,05
RNA Poli (rA) (mg/l)	20
pH`	8

Para todos los ensayos, se añadió una molécula de RNA que servía como un ácido nucleico genérico de control interno (100 partículas blindadas/muestra). La secuencia de dicho ácido nucleico de control genérico fue idéntica en todos los casos y seleccionada del grupo de las Id. de Sec. N°: 86-89.

La preparación de la muestra se realizó en una Hamilton Star (Hamilton, Bonaduz, CH), siguiendo el flujo de trabajo de acuerdo con el esquema representado en la Fig. 1.

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

Se utilizó el siguiente PCR Mmx (que consta de los dos reactivos R1 y R2) para todos los ácidos nucleicos probados:

Tabla 3: PCR mastermix

R1	Concentración final en 50 ul-PCR (uM)
Reactivo	
Mn(Ac) ₂ * 4H ₂ O (pH 6,1 ajustado con ácido acético)	3.300
R1	Concentración final en 50 µl de reactivo de PCR (µM)
Reactivo	
NaN ₃ , tamponado con 10 mM de Tris a pH 7	0,018
R2	Concentración final en 50 µl de PCR (µM)
Reactivo	
DMSO (%)	5,4
NaN ₃ , tamponado con Tris 10 mM a pH 7	0,027
Acetato K pH 7,0	120.000
Glicerol (%)	3
Tween 20 (%)	0,015
Tricina pH 8,0	60.000
NTQ21-46A - Aptámero	0,2222
Uracil-N-Glicosidasa (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 de VIH seleccionados de Id. de Sec. N° 1-35	0,1-0,3
Cebadores/sondas de VHB seleccionados de Id. de Sec. N°s 36-38	0,1- 0,3
Cebadores/sondas de VHC seleccionados de Id. de Sec. N°: 39-82	0,1 - 0,3
Cebadores/sondas de control seleccionados de Id. de Sec. N° 83-85	0,1-0,3
Ajustar a pH a 8,1	

Los reactivos Mmx se combinaron como sigue para la PCR, sumando hasta un volumen total de 50 µl por PCR:

Tabla 4: Composición de la mezcla de reacción de PCR

R1	10 ul
R2	15 ul
Eluato (Contiene ácidos nucleicos aislados)	25 µl

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

Se utilizó el siguiente perfil de PCR:

Tabla 5: Perfil de PCR

Perfil de ciclado térmico					
Nombre del programa	Diana (°C)	Modo de adquisición	Retención (hh:mm:ss)	Velocidad de rampa (°C/s)	Ciclos
Pre-PCR	50	Ninguno	00:02:00	4,4	1
	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	
Primera medición	95	Ninguno	00:00:05	4,4	5
	55	Sencillo	00:00:30	2,2	
Segunda medición	91	Ninguno	00:00:05	4,4	45
	58	Sencillo	00:00:25	2,2	
Enfriamiento	40	Ninguno	00:02:00	2,2	1

15 Como resultado de los ensayos para todas las muestras comprendidas en la placa de micropocillos mencionada anteriormente, se logró la amplificación y la detección en todas las muestras, como se representa en la Fig. 2. Esto muestra que la preparación de la muestra antes de la amplificación también se llevó a cabo con éxito.

20 Además, la PCR que implicaba ácidos nucleicos en un tampón acuoso (tampón IC) mostró una eficacia comparable a la PCR que implicaba ácidos nucleicos en plasma humano normal (NHP). En detalle se obtuvieron los siguientes resultados (las curvas de PCR correspondientes se representan en las figuras 2a-f):

Tabla 6: Resultados de la PCR para el VIH

Canal - 2 del VIH				
Comentario de muestras	Tasa de éxito		CT	RFI
Tampón IC	28 de 28	Promedio	38,38	8,09
		Desviación estándar	0,40	0,73
		CV	1,05%	8,98%
NHP	28 de 28	promedio	38,17	6,73
		Desviación estándar	0,48	1,03
		CV	1,25%	15,23%

Tabla 7: Resultados de la PCR para VHC

Canal - 4 del VHC				
Comentario de muestras	Tasa de éxito		CT	RFI
Tampón IC	28 de 28	Promedio	35,51	19,41
		Desviación estándar	0,22	1,32
		CV	0,63%	6,81%
NHP	28 de 28	promedio	35,15	6,73
		Desviación estándar	0,22	1,18
		CV	0,62%	6,83%

Tabla 8: Resultados de la PCR para VHB

Canal - 3 del VHB				
Comentario de muestras	Tasa de éxito		CT	RFI
Tampón IC	28 de 28	Promedio	28,10	8,81
		Desviación estándar	0,13	0,34
		CV	0,45%	3,86%
NHP	28 de 28	promedio	27,43	9,04
		Desviación estándar	0,18	0,42
		CV	0,66%	4,60%

5

Ejemplo 2

Se ensayó el mismo panel de material diana que en el Ejemplo 1 bajo condiciones equivalentes a las descritas anteriormente.

10

Los ácidos nucleicos diana tenían las siguientes concentraciones en la muestra de fluido:

Tabla 9 Concentración de panel combinado

Analito	VIH (cp/ml)	VHB (cp/ml)	VHC (cp/ml)
Concentración	150	60	19

15

Además de este panel, se ensayaron controles negativos (matriz de muestra que no contenía ningún ácido nucleico).

Se obtuvieron los siguientes resultados:

20

Tabla 10: Equivalencia de Matriz

Muestra	Equivalencia Positiva								
	VIH-1M Canal 2 (FAM)			VHB Canal 3 (HE X)			VHC Canal 4 (JA2 70)		
	Tasa de éxito	CT	RFI	Tasa de éxito	CT	RFI	Tasa de éxito	CT	RFI
NHP	84/84 (100%)	39,55	7,98	84/84 (100%)	36,14	5,44	84/84 (100%)	36,94	15,49
Tampón IC	84/84 (100%)	38,87	8,50	84/84 (100%)	35,92	5,39	84/84 (100%)	37,90	14,84
Control negativo NHP	0/12 (0%)	-	-	0/12 (0%)	-	-	0/12 (0%)	-	-
Control negativo tampón IC	0/12 (0%)	-	-	0/12 (0%)	-	-	0/12 (0%)	-	-

Ejemplo 3

En condiciones equivalentes, el panel del Ejemplo 2 se analizó adicionalmente en diferentes diluciones como se establece en las tablas siguientes, para determinar los valores de LD (Límite de detección):

25

Tabla 11: Sensibilidad en NHP-LD para VIH – 1M

VIH – 1M (coformulado) en NHP			
Concentración	Número de réplicas	Número de positivos	Tasa de éxito
40 UI/mL	21	21	100%
20 UI/mL	21	15	71,4%
10 UI/mL	21	15	71,4%
5 UI/mL	21	12	57,1%
2,5 UI/mL	21	4	19,1%
0 UI/mL	21	0	0%
LD mediante análisis PROBIT (95% de tasa de éxito)			41,7 UI/mL
Intervalo de confianza del 95% para LD mediante análisis PROBIT			24,2 a 128,0 UI/mL

Tabla 12: Sensibilidad en NHP-LD para VHB

VHB (coformulado) en NHP			
Concentración	Número de réplicas	Número de positivos	Tasa de éxito
9,2 UI/mL	21	21	100%
4,6 UI/mL	21	21	100%
2,3 UI/mL	21	21	100%
1,15 UI/mL	21	16	76,2%
0,575 UI/mL	21	13	61,9%
0 UI/mL	21	0	0%
LD mediante análisis PROBIT (95% de tasa de éxito)			1,9 UI/mL
Intervalo de confianza del 95% para LD mediante análisis PROBIT			1,3 a 5,7 UI/mL

Tabla 13: Sensibilidad en NHP-LD para VHC

VHC (coformulado) en NHP			
Concentración	Número de réplicas	Número de positivos	Tasa de éxito
16 UI/mL	21	21	100%
8 UI/mL	21	21	100%
4 UI/mL	21	18	85,7%
2 UI/mL	21	15	71,4%
1 UI/mL	21	12	57,4%
0 UI/mL	21	0	0%
LD mediante análisis PROBIT (95% de tasa de éxito)			5,8 UI/mL
Intervalo de confianza del 95% para LD mediante análisis PROBIT			3,7 a 18,5 UI/mL

Tabla 14: Sensibilidad en tampón IC-LD para VIH – 1M

VIH – 1M (coformulado) en tampón IC			
Concentración	Número de réplicas	Número de positivos	Tasa de éxito
40 UI/mL	21	21	100%
20 UI/mL	21	18	85,7%
10 UI/mL	21	16	76,2%
5 UI/mL	21	7	33,3%
2,5 UI/mL	21	4	19,1%
0 UI/mL	21	0	0%
LD mediante análisis PROBIT (95% de tasa de éxito)			27,3 UI/mL
Intervalo de confianza del 95% para LD mediante análisis PROBIT			18,2 a 57,2 UI/mL

Tabla 15: Sensibilidad en tampón IC -LD para VHB

VHB (coformulado) en tampón IC			
Concentración	Número de réplicas	Número de positivos	Tasa de éxito
9,2 UI/mL	21	21	100%
4,6 UI/mL	21	21	100%
2,3 UI/mL	21	21	100%
1,15 UI/mL	21	19	90,5%
0,575 UI/mL	21	15	71,4%
0 UI/mL	21	0	0%
LD mediante análisis PROBIT (95% de tasa de éxito)			1,3 UI/mL
Intervalo de confianza del 95% para LD mediante análisis PROBIT			0,9 a 6,8 UI/mL

Tabla 16: Sensibilidad en tampón IC -LD para VHC

VHC (coformulado) en tampón IC			
Concentración	Número de réplicas	Número de positivos	Tasa de éxito
16 UI/mL	21	21	100%
8 UI/mL	21	20	95,2%
4 UI/mL	21	20	95,2%
2 UI/mL	21	14	66,7%
1 UI/mL	21	11	52,4%
0 UI/mL	21	0	0%
LD mediante análisis PROBIT (95% de tasa de éxito)			5,9 UI/mL
Intervalo de confianza del 95% para LD mediante análisis PROBIT			3,8 a 16,9 UI/mL

Tabla 17: Sensibilidad - visión general para NHP y tampón IC

LD mediante análisis de PROBIT (95% de tasa de éxito)		
Diana	NHP	Tampón IC
VIH-1 M	41,7 UI/mL (24,2 - 128,0 UI/mL)	27,3 UI/mL (18,2-57,2 UI/mL)
HBV	1,9 UI/mL (1,3 - 5,7 UI/mL)	1,3 UI/mL (0,9 - 6,8 UI/mL)
HCV	5,8 UI/mL (3,7-18,5 UI/mL)	5,9 UI/mL (3,8 - 16,9 UI/MI)

Ejemplo 4

5 El material estándar de VIH descrito anteriormente se ensayó cuantitativamente bajo condiciones equivalentes a las descritas anteriormente. El título del material de VIH se determinó en NHP y en el tampón acuoso descrito (tampón IC).

10 Se utilizó VIH en las siguientes concentraciones (HPC = Control positivo alto, LPC = Control positivo bajo):

Tabla 18: Títulos de material de VIH cuantificado

Control	Concentración del proceso
HPC	2E + 05 cp/ml
LPC	200 cp/ml

15 Este estudio de precisión dedicado entre las muestras de VIH basadas en NHP y basadas en tampón IC demostró una equivalencia positiva para ambos controles positivos como se evidencia por la diferencia media de log10 entre las dos matrices. La diferencia media de log10 (cp/mL) entre las dos matrices (tampón NHP) para el LPC y HPC fue:

LPC: - 0,03

HPC: - 0,08

20 Los controles positivos diana se ensayaron con 42 repeticiones por matriz de muestra.

Todas las diferencias medias de log10 de título fueron de $\pm 0,5$ log10. Por lo tanto, el experimento muestra la equivalencia de matriz para el tampón IC y la matriz de NHP.

Ejemplo 5

30 Los valores de LD que representan la sensibilidad cuantitativa del ensayo de VIH se determinaron de una manera análoga al panel de ácido nucleico descrito en el Ejemplo 2. El resultado demuestra que la sensibilidad del ensayo de VIH es equivalente en ambas matrices de muestra, como se evidencia mediante la superposición del 95% de los intervalos de confianza para ambas matrices de muestra (ver Tabla 19 y Tabla 20).

Tabla 19: sensibilidad en NHP

Concentración para 100 μ l de volumen de entrada	Conc. correspondiente para 500 μ l de volumen de entrada	Número de replicados	Número de positivos	Tasa de éxito
0 cp/ml	0 cp/ml	21	0	0,0%
30 cp/ml	6 cp/ml	21	15	71,4%
45 cp/ml	9 cp/ml	21	12	57,1%
67,5 cp/ml	13,5 cp/ml	17	15	81,0%
100 cp/ml	20 cp/ml	21	17	81,0%
125 cp/ml	25 cp/ml	21	21	100,0%
150 cp/ml	30 cp/ml	21	20	95,2%
Valor de análisis PROBIT al 95% de tasa de éxito:				34,0 cp/mL
Intervalo de confianza del 95% para el valor de análisis PROBIT al 95% de tasa de éxito:				21,5-154,5 cp/mL
$\geq 95\%$ análisis de tasa de éxito				25,0 cp/mL

35 Tabla 20: sensibilidad en tampón IC

Concentración para 100 μ l de volumen de entrada	Conc. correspondiente para 500 μ l de volumen de entrada	Número de replicados	Número de positivos	Tasa de éxito
0 cp/ml	0 cp/ml	21	0	0,0%
30 cp/ml	6 cp/ml	21	9	42,9%
45 cp/ml	9 cp/ml	21	13	61,9%
67,5 cp/ml	13,5 cp/ml	21	14	66,7%
100 cp/ml	20 cp/ml	21	19	90,5%
125 cp/ml	25 cp/ml	21	20	95,2%
150 cp/ml	30 cp/ml	21	21	100,0%

Valor de análisis PROBIT al 95% de tasa de éxito;	25,9 cp/mL
Intervalo de confianza del 95% para el valor de análisis PROBIT al 95% de tasa de éxito:	19,5-45,8 cp/mL
≥95% análisis de tasa de éxito	25,0 cp/mL

Ejemplo 6

5 Un estudio de estabilidad a largo plazo para muestras de VHC basadas en NHP y basadas en tampón IC demostró que la estabilidad del RMC es equivalente en ambas matrices de control como se evidencia por la tasa de éxito estable, el valor CT y el valor RFI durante 6 meses de almacenamiento (Véase la Tabla 22).

Se utilizaron los siguientes controles positivo alto (HPC) y controles positivos bajos (LPC):

10

Tabla 21: Títulos de material de HCV cuantificado

Control	Concentración del proceso
HPC	1E + 05 cp/ml
LPC	100 UI/ml

Se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 22: Estabilidad VHC LPC y VHC del HPC en NHP y tampón IC

Nombre	Tiempo	Valor CT	DE CT	Valor RFI	DE RFI	Tasa de éxito
baja PC (NHP)	Día 0	35,53	0,34	17,62	1,17	100%
	6 meses	35,71	0,28	17,26	1,14	100%
baja PC (tampon IC)	Día 0	36,08	0,37	20,74	0,71	100%
	6 meses	36,15	0,32	18,95	0,78	100%
alta PC (NHP)	Día 0	23,47	0,16	19,91	1,06	100%
	6 meses	23,79	0,09	19,89	0,77	100%
alta PC (tampon IC)	Día 0	24,25	0,14	23,07	0,52	100%
	6 meses	24,70	0,16	20,63	0,53	100%

15

Listado de secuencias

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

5 <120> Matriz genérica para ácidos nucleicos de control
 <130> 26553 EP
 <160> 89
 <170> PatentIn versión 3.5

10 <210> 1
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador/sonda

15 <400> 1
 agtgggggga catcaagcag ccatgcaaa 29
 <210> 2
 <211> 30
 <212> DNA

20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador/sonda
 <400> 2
 agtgggggga catcaagcag ccatgcaaat 30

25 <210> 3
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>

30 <223> cebador/sonda
 <400> 3
 gctttcagcc cagaagtaat acc 23
 <210> 4
 <211> 25
 <212> DNA

35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador/sonda
 <400> 4

40 ggacacatca agcagccatg caaat 25
 <210> 5
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> cebador/sonda
 <400> 5
 agagaaccaa ggggaagtga 20
 <210> 6

50 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador/sonda

55 <400> 6
 ataatccacc tatcccagta ggagaaat 28
 <210> 7
 <211> 29
 <212> DNA

60 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador/sonda
 <400> 7

65 agtgggggga caccagcag caatgcaaa 29
 <210> 8
 <211> 20

<212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador/sonda
 <400> 8
 5 catagcagga actactagta 20
 <210> 9
 <211> 30
 <212> DNA
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador/sonda
 <400> 9
 15 ggtactagta gttcctgcta tgcacttcc 30
 <210> 10
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> cebador/sonda
 <400> 10
 ctatgtcact tccccttgg tctct 25
 <210> 11
 <211> 30
 25 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador/sonda
 <400> 11
 30 ggtactagta gttcctgcta tatcacttcc 30
 <210> 12
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> cebador/sonda
 <400> 12
 tcctgtctt atgtccagaa 20
 <210> 13
 40 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador/sonda
 45 <400> 13
 fttggtcctt gtctatgta cagaatgc 28
 <210> 14
 <211> 28
 <212> DNA
 50 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador/sonda
 <400> 14
 tactagtagt tctgctatg tcacttcc 28
 55 <210> 15
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 60 <223> cebador/sonda
 <400> 15
 tgggttatga tgggtttaa atc 23
 <210> 16
 <211> 20
 65 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador/sonda
 <400> 16
 actctaaagg gtcctttgg 20
 5 <210> 17
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 10 <223> cebador/sonda
 <400> 17
 tctgcagctt cctcattgat ggtatctttt aac 33
 <210> 18
 <211> 29
 15 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador/sonda
 <400> 18
 20 tcagcattat cagaaggagc cacccaca 29
 <210> 19
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> cebador/sonda
 <400> 19
 tctgcagctt cctcattgag gtatctttta ac 32
 <210> 20
 30 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador/sonda
 <400> 20
 35 atcctgggat taaataaat agtaagaatg tatagcccta c 41
 <210> 21
 <211> 29
 <212> DNA
 40 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador/sonda
 <400> 21
 accatcaatg agggaagctg cagaatggg 29
 45 <210> 22
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 50 <223> cebador/sonda
 <400> 22
 tgactctggt aactagagat ccctca 26
 <210> 23
 <211> 30
 55 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador/sonda
 <400> 23
 60 tgttcaacct tggtatctag agatccctca 30
 <210> 24
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 65 <220>
 <223> cebador/sonda

<400> 24
 ggctaactag ggaccactg 20
 <210> 25
 <211> 18
 5 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador/sonda
 <400> 25
 10 actaggaac cactgct 18
 <210> 26
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> cebador/sonda
 <400> 26
 tcagcaagcc ggtcctgctg tcgaga 26
 <210> 27
 20 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador/sonda
 25 <400> 27
 ccgctaagcc gagcccttg cgctgga 27
 <210> 28
 <211> 17
 <212> DNA
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador/sonda
 <400> 28
 ggtctgagg atctcta 17
 35 <210> 29
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40 <223> cebador/sonda
 <400> 29
 ctgctagaga tttccacac tgac 24
 <210> 30
 <211> 23
 45 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador/sonda
 <400> 30
 50 ggctccacgc ttgctgctt aaa 23
 <210> 31
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> cebador/sonda
 <400> 31
 ggctccacgc ttgctgctt 18
 <210> 32
 60 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador/sonda
 65 <400> 32
 ttccaaagc aagaagggtc ctaacagacc a 31

<210> 33
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> cebador/sonda
 <400> 33
 tctctagcag tggcgcccga acagggac 28
 <210> 34
 10 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador/sonda
 15 <400> 34
 accagagtca cacaacagac gggcacacac tact 34
 <210> 35
 <211> 31
 <212> DNA
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador/sonda
 <400> 35
 tcttagtgc cgctgtgca ttcggtgta a 31
 25 <210> 36
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> cebador/sonda
 <400> 36
 catgcaactt ttcacctct gccta 25
 <210> 37
 <211> 27
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador/sonda
 <400> 37
 40 aactcacag tagctcaaa ttctta 27
 <210> 38
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> cebador/sonda
 <400> 38
 ccaagctgtg cctgggtgg cttggggca tgg 33
 50 <210> 39
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador/sonda
 55 <400> 39
 gcagaaagcg tctagccatg gcgta 26
 <210> 40
 <211> 22
 <212> DNA
 60 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador/sonda
 <400> 40
 ccaagcttca ccatagatca ct 22
 65 <210> 41
 <211> 24

<212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador/sonda
 5 <400> 41
 ggcgacactc cacatagat cact 24
 <210> 42
 <211> 31
 <212> DNA
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador/sonda
 <400> 42
 ccaagcttag atcactccc tgtgaggaac t 31
 15 <210> 43
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> cebador/sonda
 <400> 43
 ccaagcttca cgcagaaagc gtctagccat 30
 <210> 44
 <211> 24
 25 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador/sonda
 <400> 44
 30 gcagaaagcg tctagccatg gcgt 24
 <210> 45
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> cebador/sonda
 <400> 45
 acgcagaaag cgtctagcca tggcgt 26
 40 <210> 46
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador/sonda
 45 <400> 46
 cctccaggac cccccctccc gggagagcca 30
 <210> 47
 <211> 27
 <212> DNA
 50 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador/sonda
 <400> 47
 gagtacaccg gaattgccag gacgacc 27
 55 <210> 48
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 60 <223> cebador/sonda
 <400> 48
 acccgctcaa tgcctggaga t 21
 <210> 49
 <211> 22
 65 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador/sonda
 <400> 49
 cgaagcttgc tagccgagta gt 22
 5 <210> 50
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 10 <223> cebador/sonda
 <400> 50
 ccgcaagact gctagccgag tagt 24
 <210> 51
 <211> 25
 15 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador/sonda
 <400> 51
 20 gttgggtcgc gaaaggcctt gtgt 25
 <210> 52
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> cebador/sonda
 <400> 52
 ggtgcttgcg agtgccccgg gaggtctcgt 30
 <210> 53
 30 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador/sonda
 35 <400> 53
 gacttccgag cggtcgcaac ctcg 24
 <210> 54
 <211> 25
 <212> DNA
 40 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador/sonda
 <400> 54
 gcaagcacc tataggcagt accac 25
 45 <210> 55
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 50 <223> cebador/sonda
 <400> 55
 gggagagcca tagtggctg cggaaccggt gag 33
 <210> 56
 <211> 25
 55 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador/sonda
 <400> 56
 60 cccaacacta ctcggctagc agtct 25
 <210> 57
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 65 <220>
 <223> cebador/sonda

<400> 57
 aaggcctttc gcgaccaac actact 26
 <210> 58
 <211> 26
 5 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador/sonda
 <400> 58
 10 cacaaggcct ttcgacccc aactact 26
 <210> 59
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> cebador/sonda
 <400> 59
 ctgcaagca ccctatcagg cagt 24
 <210> 60
 20 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador/sonda
 25 <400> 60
 ccgggagagc catagtggtc tgcggaaccg gtg 33
 <210> 61
 <211> 33
 <212> DNA
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador/sonda
 <400> 61
 caccggttcc gcagaccact atggctctcc cgg 33
 35 <210> 62
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40 <223> cebador/sonda
 <400> 62
 cactcgcaag caccctatca ggcagt 26
 <210> 63
 <211> 29
 45 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador/sonda
 <400> 63
 50 ggaattcgc aagcaccta tcaggcagt 29
 <210> 64
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> cebador/sonda
 <400> 64
 cgaggttgcg accgctcgga agt 23
 <210> 65
 60 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador/sonda
 65 <400> 65
 aggttgcgac cgctcggaag t 21

<210> 66
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> cebador/sonda
 <400> 66
 caccggttcc gcagaccact atggctctcc egg 33
 10 <210> 67
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador/sonda
 15 <400> 67
 aatgcatag agggccaag g 21
 <210> 68
 <211> 21
 <212> DNA
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador/sonda
 <400> 68
 attgcatag agggccaag g 21
 25 <210> 69
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> cebador/sonda
 <400> 69
 cagaattcat tgcatagag gggccaagga t 31
 <210> 70
 <211> 22
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador/sonda
 <400> 70
 40 cagaattcgc cctcattgcc at 22
 <210> 71
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> cebador/sonda
 <400> 71
 ctgcaagca ccctacagg caga 24
 <210> 72
 50 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador/sonda
 55 <400> 72
 cccaccccaa gccctcattg ccat 24
 <210> 73
 <211> 24
 <212> DNA
 60 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador/sonda
 <400> 73
 ttgccgaaa gactgggtcc tttc 24
 65 <210> 74
 <211> 24

<212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador/sonda
 5 <400> 74
 caaaagaaac acaaaccgcc gcc 24
 <210> 75
 <211> 24
 <212> DNA
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador/sonda
 <400> 75
 ccagcccatc ccgaaagatc ggcg 24
 15 <210> 76
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> cebador/sonda
 <400> 76
 tgtccgtca ttgggcg 18
 <210> 77
 <211> 21
 25 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador/sonda
 <400> 77
 30 aaaccactc tatgtccgt c 21
 <210> 78
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> cebador/sonda
 <400> 78
 gtacgccgga attgccgga a 21
 <210> 79
 40 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador/sonda
 45 <400> 79
 cctcaaagaa aaaccaaag a 21
 <210> 80
 <211> 21
 <212> DNA
 50 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador/sonda
 <400> 80
 tggcgtctcc cacgcgctg g 21
 55 <210> 81
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 60 <223> cebador/sonda
 <400> 81
 cttccccag gacctgccg t 21
 <210> 82
 <211> 26
 65 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

ES 2 621 268 T3

<220>
 <223> cebador/sonda
 <400> 82
 5 catagtggtc tgcggaaccg gtgagt 26
 <210> 83
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 10 <223> cebador/sonda
 <400> 83
 ttgatagcaa tccgctatcg actaa 25
 <210> 84
 <211> 28
 15 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador/sonda
 <400> 84
 20 gcttcgatac tcagtcattc cggataaa 28
 <210> 85
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> cebador/sonda
 <400> 85
 tctctcgcca tctctaccg cattggc 27
 <210> 86
 30 <211> 269
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> ácido nucleico de control interno
 35 <400> 86

aattcaagct tagatctagc tttgcttgc tgatagcaat cggctatcga ctaatgactg 60
tcctggcggc ctctcgccat ctctaccgc attggctcat aggtaagctc gctgtcacc 120
agtacggagg tgccagtaga ttattagaga cagtcgcca tcgatcgtta taccgagatg 180
actgagtatc gaagctacat tgtagccgca cataggacca cccatcttca tgttgaaaca 240
tgaggattac ccatgtggat ccaagcttg 269

 <210> 87
 40 <211> 235
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> ácido nucleico de control interno
 45 <400> 87

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

 <210> 88
 50 <211> 350

ES 2 621 268 T3

<212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> ácido nucleico de control interno
 <400> 88

5
 cgactctaga tgaaggggagc cttagaacgg ggctgcgcta gctggcatca aagtccgtca 60
 gagctcaacc ctccaacgag gattcctgaa tactcgaaag tcagtgtgca gttactaaca 120
 acagctgctc gacctcgggg tctcgaacaa tccatacctg ctatcgctgc cttcagacat 180
 acggatgggc taggaggcaa gagctacctg tctcaacgaa ctatcggagt gggacccgat 240
 gaagctgtca gcgccacttc cggcggtaag gctttaaaac gcgcccgccg gttatcacgc 300
 gcggggagca cagcgcggac tgacgtgctg ggaagcaccg gttaaggatc 350

10
 <210> 89
 <211> 470
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> ácido nucleico de control interno
 15 <400> 89

cgactctaga aactgggtag taactgcggg ggcgaatgat gcaggcttca gaaattaaac 60
 tcaatagtat ccggtgtctc aatctttttc gggccaggcg gcggtggacg acagacaatt 120

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento para aislar, amplificar y detectar al menos un ácido nucleico diana que puede estar presente en al menos una muestra de fluido, en el que dicha muestra de fluido es un líquido corporal, comprendiendo dicho procedimiento las etapas automatizadas de:
- 10 a. Añadir un ácido nucleico de control interno a dicha muestra de fluido
 b. Combinar juntos un material de soporte sólido y dicha muestra de fluido en un recipiente durante un periodo de tiempo y bajo condiciones suficientes para permitir que los ácidos nucleicos que comprenden el ácido nucleico 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 la muestra de fluido en una estación de separación
 d. Purificar los ácidos nucleicos en dicha estación de separación y lavar el material de soporte sólido una o más veces con un tampón de lavado
 15 e. Poner en contacto el ácido nucleico diana purificado y el ácido nucleico de control interno purificado en al menos un primer recipiente y al menos un ácido nucleico de control externo en un tampón acuoso en al menos un segundo recipiente con uno o más reactivos de amplificación
 f. Incubar en dichos recipientes de reacción dicho ácido nucleico diana purificado, dicho ácido nucleico de control interno purificado y dicho al menos un ácido nucleico de control externo en un tampón acuoso con dichos uno o
 20 más reactivos de amplificación durante un periodo de tiempo y bajo condiciones suficientes para que ocurra una reacción de amplificación indicativa de la presencia o ausencia de dicho ácido nucleico diana y de dichos ácidos nucleicos de control
- 25 en donde las condiciones para la amplificación en las etapas e. a f son idénticas para dicho ácido nucleico diana purificado, dicho ácido nucleico de control interno y dicho al menos un ácido nucleico de control externo en un tampón acuoso, y en el que dicho al menos un ácido nucleico de control externo en un tampón acuoso se somete a las etapas posteriores a la etapa a .
- 30 2. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el tampón acuoso tiene un pH de 6-12 y comprende:
- Tris: 1-100 mM
 - EDTA: 0,01-1 mM
 - Azida sódica: 0,005-0,5% (p/v)
 - RNA poli(rA): 1-200 mg/l
- 35
- 40 3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que el tampón acuoso tiene un pH de aproximadamente 8 y comprende:
- Tris: 10 mM
 - EDTA: 0,1 mM
 - Azida sódica: 0,05% (p/v)
 - RNA poli(rA): 20 mg/l
- 45
4. El proceso de la reivindicación 1, en el que un control negativo se somete a todas las etapas posteriores a la etapa a.
5. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que al menos una muestra de fluido es una muestra clínica.
- 50
6. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además la siguiente etapa:
- 55 g. Determinar la cantidad de dicho ácido nucleico diana.
7. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende más de un ácido nucleico de control externo.

Fig. 1

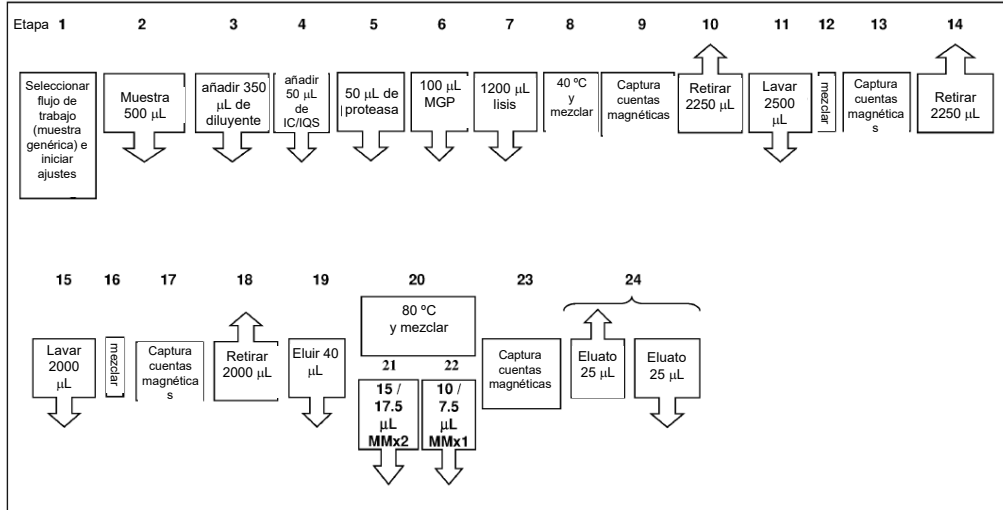


Fig. 2a

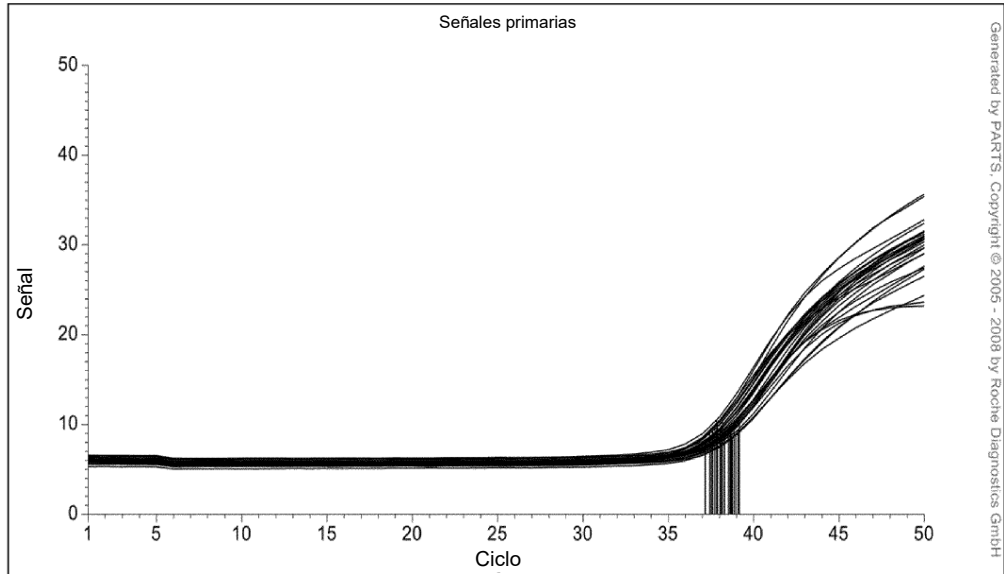


Fig. 2b

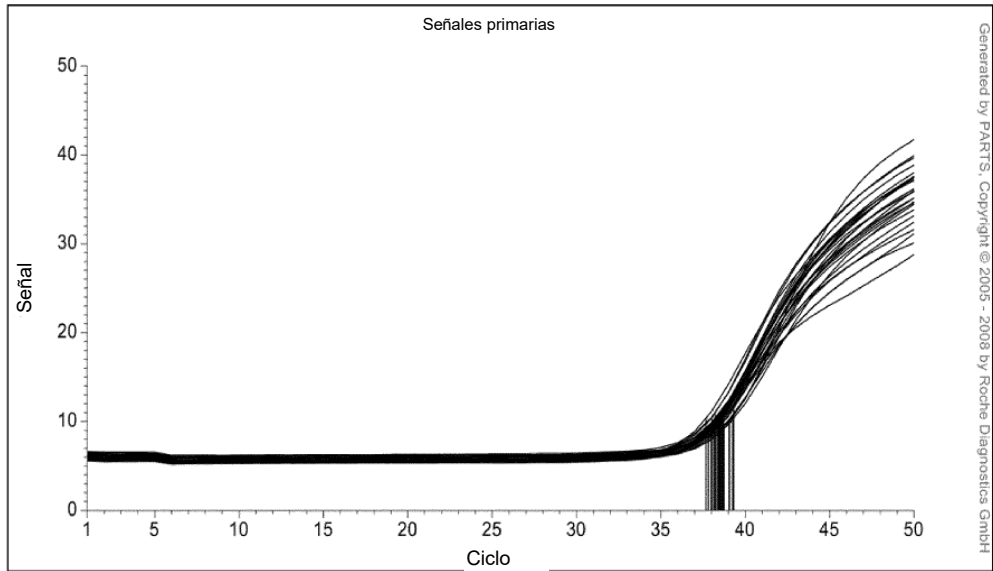


Fig. 2c

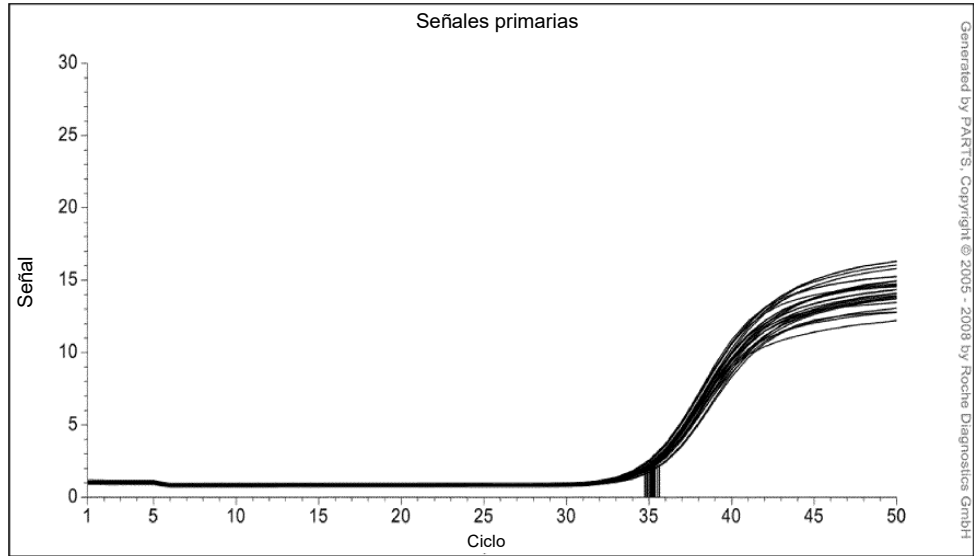


Fig. 2d

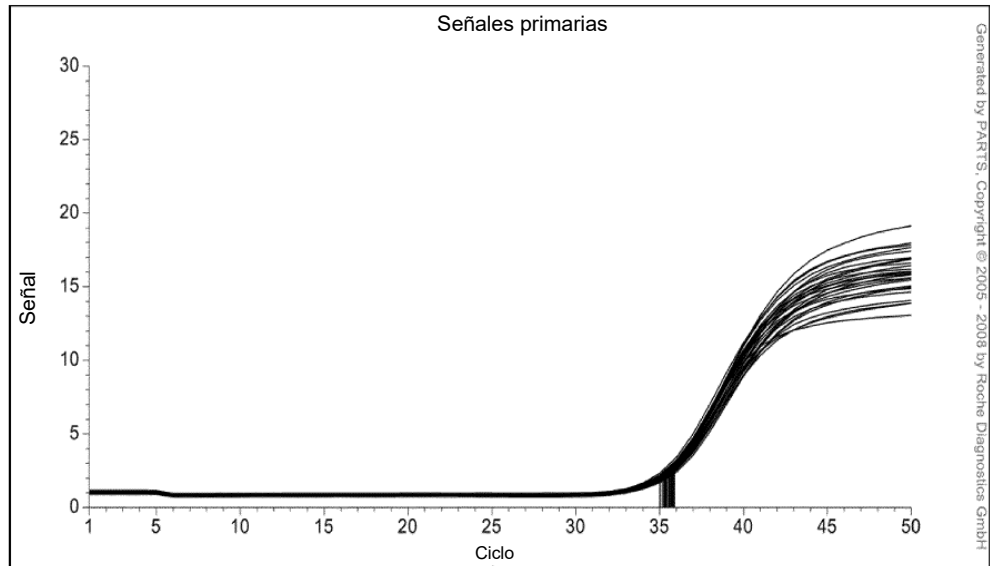


Fig. 2c

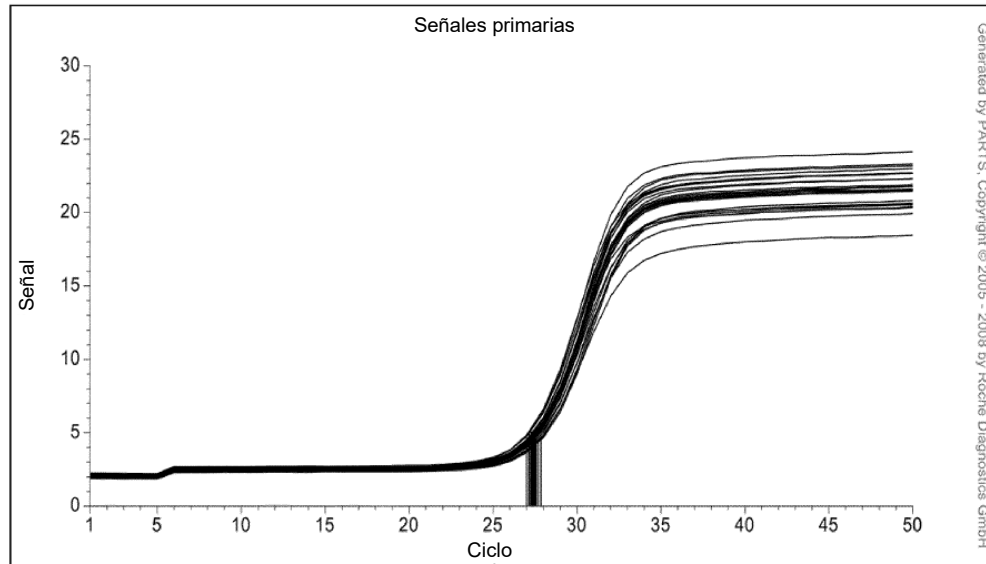
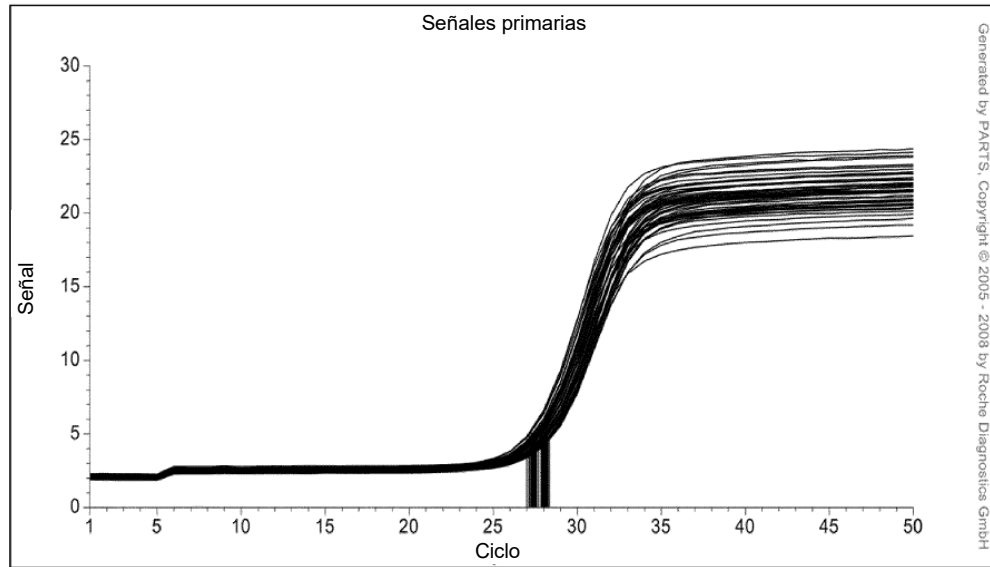
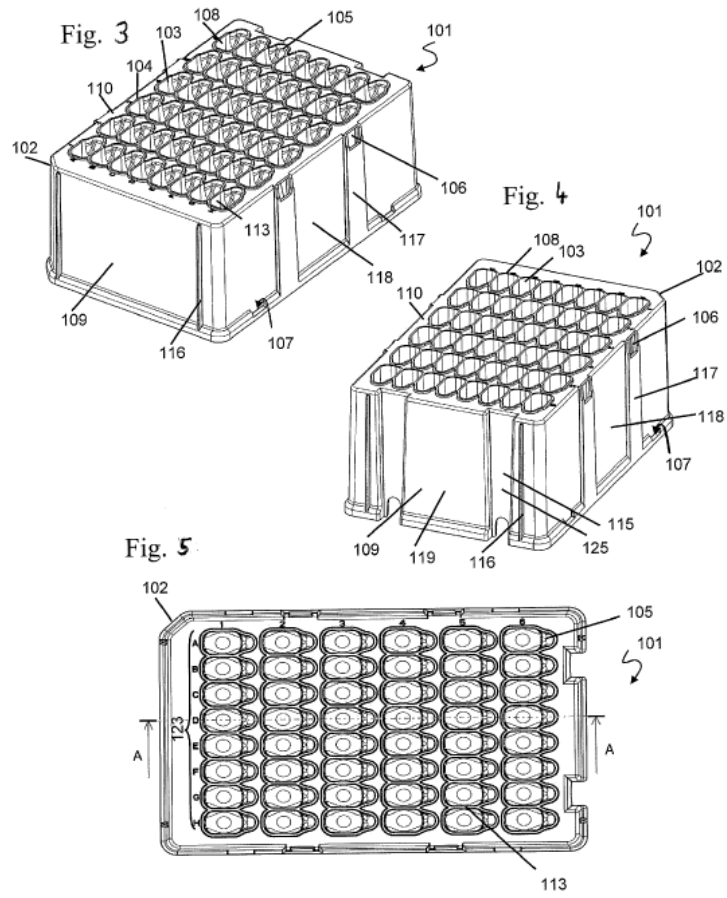


Fig. 2f





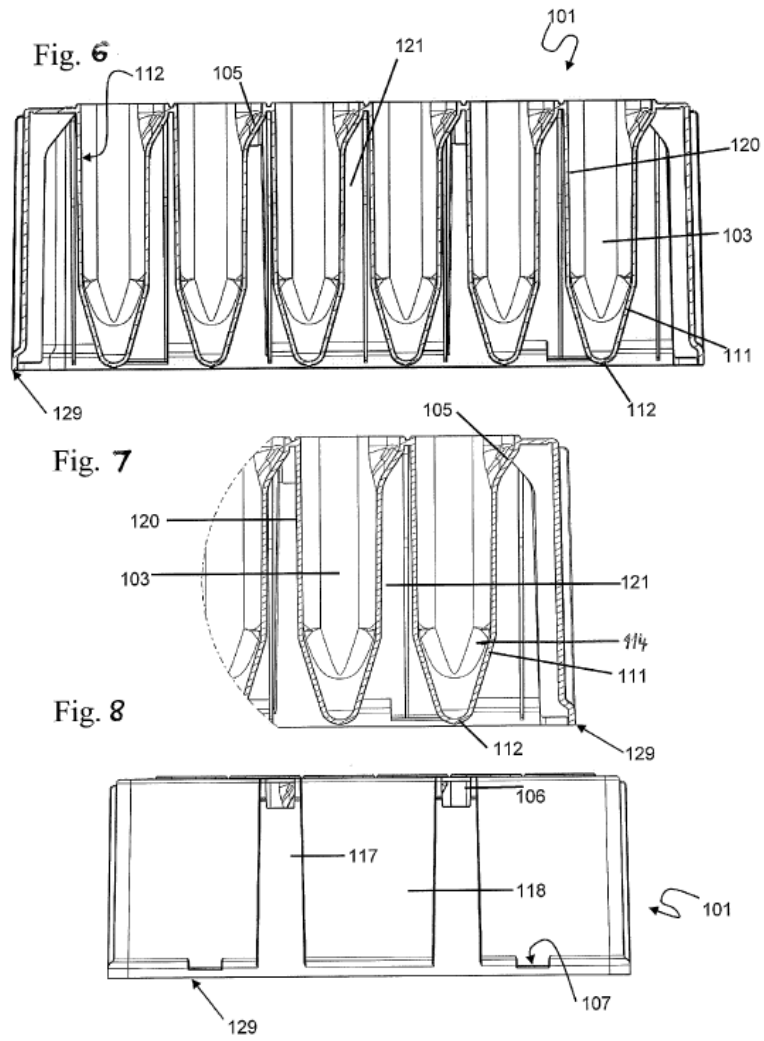
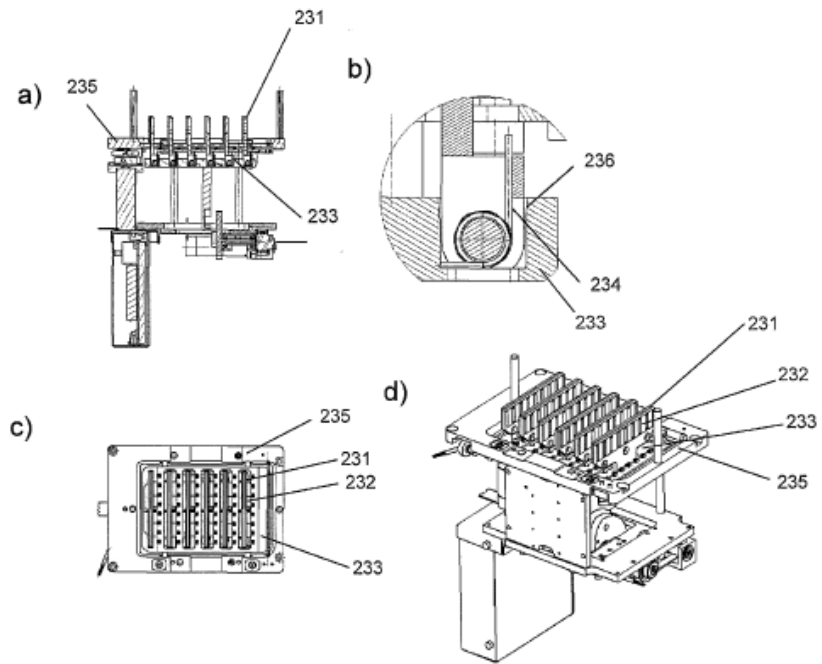


Fig. 9



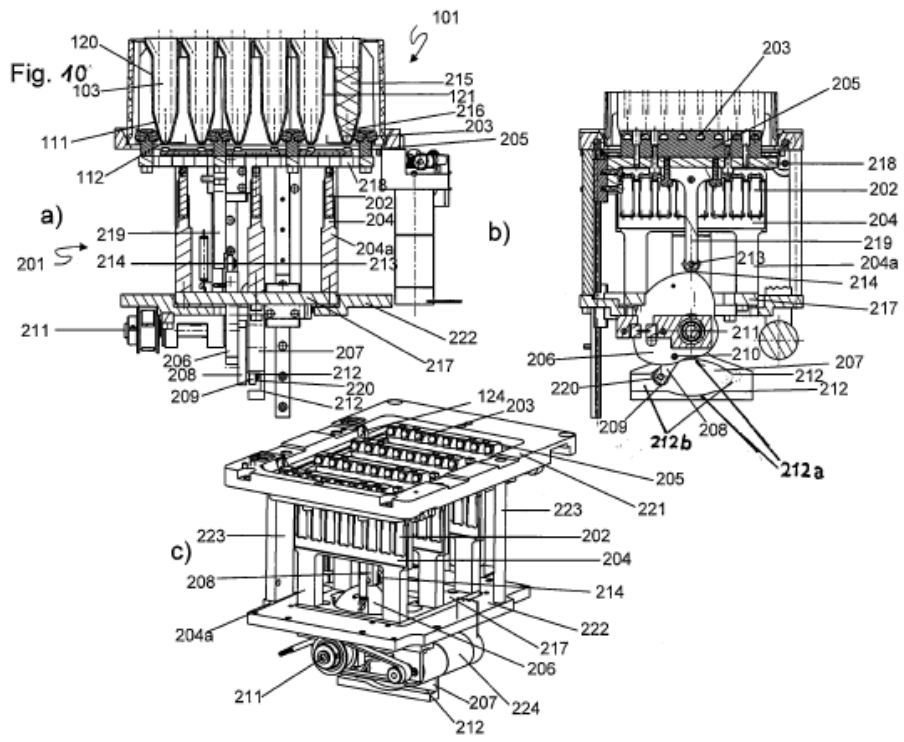


Fig. 11

