

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 644 516**

51 Int. Cl.:

C12N 1/06 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.01.2010 PCT/US2010/022264**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.08.2010 WO10088292**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.01.2010 E 10702955 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.08.2017 EP 2385979**

54 Título: **Método y ensayo de preparación de muestras de gran volumen específico de secuencia**

30 Prioridad:

28.01.2009 US 147862 P

14.09.2009 US 242193 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.11.2017

73 Titular/es:

QIAGEN GAITHERSBURG, INC. (100.0%)
1201 Clopper Road
Gaithersburg, MD 20878, US

72 Inventor/es:

O'NEIL, DOMINIC;
UPTON, KAROLINA;
NAZARENKO, IRINA;
DOSEVA, VICTORIA;
LOEFFERT, DIRK;
FORBES, THOMAS;
WOLFF, JOHN;
KOBAYASHI, LORI y
RANGWALLA, SAMEERA

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 644 516 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método y ensayo de preparación de muestras de gran volumen específico de secuencia

Campo de la invención

5 La presente descripción se refiere a métodos y ensayos para procesar y preparar muestras biológicas de gran volumen de una manera eficiente. La presente descripción también se refiere a métodos y ensayos capaces de aislar selectiva y rápidamente bajas concentraciones de moléculas de ácido nucleico diana aisladas de muestras biológicas o clínicas y suspendidas en un gran volumen de medios de recogida.

Antecedentes de la invención

10 Existe un desafío inherente a la preparación de muestras a partir de muestras clínicas de gran volumen en las que la diana está presente a una concentración baja, tales como muestras cervicales en medios citológicos de base líquida. La mayoría de las soluciones disponibles en el mercado implican pasos de método que incluyen etapas de proceso que consumen tiempo que retardan el procesamiento de muestras biológicas o clínicas presentes en un gran volumen de medios a bajas concentraciones. Por ejemplo, muchas soluciones y métodos de preparación incluyen etapas de centrifugación o absorción inespecífica de muestras diana sobre perlas paramagnéticas. Los pasos de
15 centrifugación, por ejemplo, pueden agregar una hora o más para secuenciar protocolos y metodología de preparación específicos de muestras. Además de consumir tiempo, tanto la centrifugación como la absorción inespecífica en perlas paramagnéticas requieren etapas que a menudo disminuyen el rendimiento del ensayo y generan una mezcla compleja de componentes celulares que pueden influir negativamente en las aplicaciones subsiguientes. La presente descripción aborda estas limitaciones mediante la introducción de un protocolo único de
20 preparación de muestras capaz de identificar moléculas de ácido nucleico diana presentes a una concentración baja y suspendidas en un gran volumen de medio.

Mediante el uso de los métodos de la presente descripción, las moléculas de ácido nucleico diana contenidas en una solución acuosa pueden detectarse rápida y selectivamente en un ajuste de gran volumen.

25 También existe la necesidad de proporcionar métodos, composiciones y kits nuevos y eficaces para determinar moléculas de ácido nucleico diana de una manera rápida, rentable y fiable en países en desarrollo donde el acceso a la atención médica no está fácilmente disponible. Por ejemplo, la velocidad en la obtención de resultados es particularmente importante en lugares donde los individuos viajan largas distancias para proporcionar muestras para el análisis clínico. En tales lugares, es ventajoso que los resultados se obtengan en varias horas o en el mismo día mientras el paciente está todavía presente para evitar la pérdida de seguimiento asociada con el viaje desde el
30 hogar hasta el sitio de la prueba. Los métodos y ensayos de la presente descripción satisfacen estas necesidades al permitir que técnicos médicos, médicos u otros individuos cualificados obtengan muestras de pacientes y detecten con rapidez y precisión trastornos mediante la detección de ácidos nucleicos diana.

Sumario

35 En un aspecto, la descripción se refiere a un método de preparación de muestras de gran volumen, comprendiendo el método:

- (a) suspender una muestra biológica en aproximadamente 1 ml o más de un medio de recogida;
- (b) desnaturalizar y lisar la muestra biológica añadiendo un agente de desnaturalización y tampón de lisis a la muestra biológica suspendida;
- (c) hibridar una molécula de ácido nucleico diana con al menos una sonda polinucleotídica;
- 40 (d) capturar la molécula de ácido nucleico diana hibridada sobre un soporte;
- (e) lavar el soporte híbrido capturado con tampón de lavado.

En un aspecto, la descripción se refiere a un método de preparación de muestras de gran volumen, comprendiendo el método:

- (a) obtener una muestra biológica en aproximadamente 1 ml o más de orina, sangre o suero;
- 45 (b) desnaturalizar y lisar la muestra biológica añadiendo un agente de desnaturalización y tampón de lisis a la muestra biológica suspendida;
- (c) hibridar una molécula de ácido nucleico diana con al menos una sonda polinucleotídica;
- (d) capturar la molécula de ácido nucleico diana hibridada sobre un soporte;
- (e) lavar el soporte híbrido capturado con tampón de lavado.

En un aspecto, la descripción se refiere a un método de preparación de muestras de gran volumen, comprendiendo el método:

(a) suspender una muestra biológica en aproximadamente 1 ml o más de un medio de recogida;

5 (b) desnaturalizar y lisar la muestra biológica añadiendo un agente de desnaturalización y tampón de lisis a la muestra biológica suspendida;

(c) hibridar una molécula de ácido nucleico diana con al menos una sonda polinucleotídica;

(d) capturar la molécula de ácido nucleico diana hibridada sobre un soporte;

10 en el que la etapa de desnaturalización y lisis (b) está completa en menos de aproximadamente 10 minutos y la combinación de la etapa de hibridación (c) y la etapa de captura (d) ha terminado en menos de aproximadamente 25 minutos.

En un aspecto, la descripción se refiere a un método de preparación de muestras de gran volumen, comprendiendo el método:

(a) suspender una muestra biológica en aproximadamente 1 ml o más de un medio de recogida u obtener una muestra biológica en orina, sangre o suero;

15 (b) desnaturalizar y lisar la muestra biológica añadiendo un agente de desnaturalización y tampón de lisis a la muestra biológica suspendida;

(c) hibridar una molécula de ácido nucleico diana con al menos una sonda polinucleotídica;

(d) capturar la molécula de ácido nucleico diana hibridada sobre un soporte;

20 en el que la etapa de desnaturalización y lisis (b) está completa en menos de aproximadamente 30 minutos y la combinación de la etapa de hibridación (c) y la etapa de captura (d) ha terminado en menos de aproximadamente 30 minutos y

se aíslan 10 copias o más de la molécula de ácido nucleico diana en menos de aproximadamente 1 hora.

En un aspecto, la descripción se refiere a un ensayo de preparación de muestras de gran volumen, comprendiendo el ensayo:

25 (a) suspender una muestra biológica en aproximadamente 1 ml o más de un medio de recogida;

(b) desnaturalizar y lisar la muestra biológica añadiendo un agente de desnaturalización y tampón de lisis a la muestra biológica suspendida;

(c) hibridar una molécula de ácido nucleico diana con al menos una sonda polinucleotídica;

(d) capturar la molécula de ácido nucleico diana hibridada sobre un soporte;

30 en el que la etapa de desnaturalización y lisis (b) está completa en menos de aproximadamente 30 minutos y la combinación de la etapa de hibridación (c) y la etapa de captura (d) ha terminado en menos de aproximadamente 30 minutos, se aíslan 10 copias o más de la molécula de ácido nucleico diana en menos de aproximadamente 1 hora, y el método no incluye una etapa de centrifugación.

35 En un aspecto, la etapa de desnaturalización y lisis (b) está completa en menos de aproximadamente 10 minutos y la combinación de la etapa de hibridación (c) y la etapa de captura (d) ha terminado en menos de aproximadamente 25 minutos. En otro aspecto más, la etapa de desnaturalización y lisis (b) está completa en menos de aproximadamente 7,5 minutos y la combinación de la etapa de hibridación (c) y la etapa de captura (d) ha terminado en menos de aproximadamente 22,5 minutos. En otro aspecto, la etapa de desnaturalización y lisis (b) está completa en menos de aproximadamente 5 minutos y la combinación de la etapa de hibridación (c) y la etapa de captura (d) ha terminado en menos de aproximadamente 15 minutos.

40

En un aspecto, la descripción se refiere a un ensayo de preparación de muestras, comprendiendo el ensayo:

(a) suspender una muestra biológica en aproximadamente 0,25 ml a aproximadamente 1,0 ml de un medio de recogida u obtener una muestra biológica en orina, sangre o suero;

45 (b) desnaturalizar y/o lisar la muestra biológica añadiendo un agente de desnaturalización y/o tampón de lisis a la muestra biológica suspendida;

(c) hibridar una molécula de ácido nucleico diana con al menos una sonda polinucleotídica;

- (d) capturar la molécula de ácido nucleico diana hibridada sobre un soporte; y
- (e) lavar el soporte híbrido capturado con tampón de lavado.

En un aspecto, la descripción se refiere a un ensayo de preparación de muestras, comprendiendo el ensayo:

- 5 (a) obtener una muestra biológica en aproximadamente 0,25 ml a aproximadamente 1,0 ml de una orina, sangre o suero;
- (b) desnaturalizar y/o lisar la muestra biológica añadiendo un agente de desnaturalización y/o tampón de lisis a la muestra biológica suspendida;
- (c) hibridar una molécula de ácido nucleico diana con al menos una sonda polinucleotídica;
- (d) capturar la molécula de ácido nucleico diana hibridada sobre un soporte; y
- 10 (e) lavar el soporte híbrido capturado con tampón de lavado.

En un aspecto, la etapa de desnaturalización y/o lisis (b) está completa en menos de aproximadamente 10 minutos y la combinación de la etapa de hibridación (c) y la etapa de captura (d) se completa en menos de aproximadamente 25 minutos. En otro aspecto más, la etapa de desnaturalización y/o lisis (b) está completa en menos de aproximadamente 7,5 minutos y la combinación de la etapa de hibridación (c) y la etapa de captura (d) ha terminado en menos de aproximadamente 22,5 minutos. En otro aspecto, la etapa de desnaturalización y/o lisis (b) está completa en menos de aproximadamente 5 minutos y la combinación de la etapa de hibridación (c) y la etapa de captura (d) se completa en menos de aproximadamente 15 minutos.

En un aspecto, la descripción se refiere a un método para detectar la presencia de una baja concentración de molécula de ácido nucleico diana en un gran volumen de muestra, comprendiendo el método:

- 20 (a) suspender la muestra biológica en aproximadamente 0,25 ml a aproximadamente 1,0 ml de un medio de recogida;
- (b) desnaturalizar la molécula de ácido nucleico diana en la muestra biológica;
- (c) formar un híbrido de ácido nucleico bicatenario poniendo en contacto al menos una sonda polinucleotídica con la molécula de ácido nucleico diana; y
- 25 (d) formar un complejo híbrido-soporte de ácido nucleico bicatenario capturando el híbrido de ácido nucleico bicatenario sobre un soporte.

En otro aspecto, la descripción se refiere a un método para detectar la presencia de una baja concentración de la molécula de ácido nucleico diana en un gran volumen, comprendiendo el método:

- 30 (a) suspender la muestra biológica en aproximadamente 0,25 ml a aproximadamente 1,0 ml de un medio de recogida;
- (b) desnaturalizar la molécula de ácido nucleico diana en la muestra biológica;
- (c) formar un híbrido de ácido nucleico bicatenario poniendo en contacto al menos una sonda polinucleotídica con la molécula de ácido nucleico diana;
- 35 (d) formar un complejo de híbrido-soporte de ácido nucleico bicatenario capturando el híbrido de ácido nucleico bicatenario sobre un soporte; y
- (e) lavar el soporte híbrido capturado con tampón de lavado

en el que se aíslan 10 copias o más de la molécula de ácido nucleico diana en menos de aproximadamente 30 minutos.

- 40 En otro aspecto, la descripción se refiere a un método para detectar la presencia de una baja concentración de molécula de ácido nucleico diana en un gran volumen, comprendiendo el método:

- (a) suspender la muestra biológica en aproximadamente 0,25 ml a aproximadamente 1,0 ml de un medio de recogida;
- (b) desnaturalizar la molécula de ácido nucleico diana en la muestra biológica;
- 45 (c) formar un híbrido de ácido nucleico bicatenario poniendo en contacto al menos una sonda polinucleotídica con la molécula de ácido nucleico diana;

(d) formar un complejo de híbrido-soporte de ácido nucleico bicatenario capturando el híbrido de ácido nucleico bicatenario sobre un soporte; y

(e) lavar el soporte híbrido capturado con tampón de lavado,

en el que los pasos del método (a) - (e) no incluyen una etapa de centrifugación.

5 Un método para determinar la presencia de una molécula de ácido nucleico diana en una muestra, comprendiendo el método:

(a) suspender una muestra biológica en aproximadamente 0,25 ml a aproximadamente 1,0 ml de un medio de recogida;

(b) desnaturalizar la molécula de ácido nucleico diana en la muestra;

10 (c) formar un híbrido de ácido nucleico bicatenario poniendo en contacto al menos una sonda polinucleotídica con la molécula de ácido nucleico diana;

(d) formar un complejo de híbrido-soporte de ácido nucleico bicatenario capturando el híbrido de ácido nucleico bicatenario sobre un soporte;

15 en el que la molécula de ácido nucleico diana se identifica en aproximadamente 15 minutos a aproximadamente 3 horas.

En otro aspecto, se aíslan 10 copias o más de la molécula de ácido nucleico diana en menos de aproximadamente 15 minutos, menos de aproximadamente 30 minutos, menos de aproximadamente 45 minutos o menos de aproximadamente 1 hora.

20 En otro aspecto, se detectan 50 copias o menos de una molécula de ácido nucleico diana durante un periodo de tiempo de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 1 hora.

En un aspecto, entre aproximadamente 10 y aproximadamente 100 copias de la molécula de ácido nucleico diana son capaces de ser identificadas en aproximadamente 15 minutos a aproximadamente 2 horas.

En un aspecto, el método de preparación de muestras de gran volumen se realiza en una plataforma automatizada, semiautomática o totalmente automatizada.

25 En un aspecto, los medios de recogida comprenden de 0,5% a aproximadamente 2,0% de NP-40, de aproximadamente 10% a aproximadamente 0,40% de desoxicolato de sodio, de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 75 mM de Tris-HCl, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 50 mM de EDTA, de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 200 mM de NaCl y de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 0,10% de azida de sodio.

30 En otro aspecto, el medio de recogida se selecciona del grupo que consiste en PRESERVCYT, STM y SUREPATH.

En otro aspecto, la muestra biológica se obtiene a partir de orina, sangre o suero.

En un aspecto, la etapa de desnaturalización se completa en menos de aproximadamente 30 minutos.

En otro aspecto, la etapa de captura híbrida está completa en menos de aproximadamente 30 minutos.

35 En otro aspecto, todo el material celular lisado permanece en la solución de preparación de la muestra durante las etapas de desnaturalización, hibridación y captura. En otro aspecto, la molécula de ácido nucleico diana no se separa del recordatorio del material biológico lisado hasta la etapa de lavado (e).

Estos y otros aspectos se explican en la siguiente descripción detallada de la descripción.

Breve descripción de los dibujos

40 La Fig. 1 muestra un intervalo de concentraciones de perlas ensayado en 1 ml de PRESERVCYT limpio frente a 0, 10, 25 y 100 copias del ADN genómico de *Neisseria gonorrhoeae*. 1X representa una concentración de perlas de 0,04% en 25 μ l de bloqueador YT.

La Fig. 2 muestra una etapa de preparación de la muestra de híbrido/captura a 30 minutos y 60 minutos de incubación usando 1 mL de PRESERVCYT limpio y clínico y pruebas de 0, 10, 100 y 1000 copias del ADN genómico de *Neisseria gonorrhoeae*.

45 La Fig. 3 muestra una etapa de preparación de muestras de híbrido/captura con 30 minutos de incubación a temperatura ambiente y 50°C usando 1 mL de PRESERVCYT limpio y clínico y pruebas de 0, 10, 100 y 1000 copias de ADN genómico de *Neisseria gonorrhoeae*.

La Fig. 4 muestra una etapa de preparación de la muestra de híbrido/captura a 30 minutos de incubación a 50°C utilizando 1 mL de PRESERVICYT clínico o 1 mL de orina (pH 6,5) como medio de recolección y pruebas de 0, 10, 25, 100, 1.000 y 10.000 copias de ADN genómico de *Neisseria gonorrhoeae*.

5 La Fig. 5 muestra una preparación de muestras de gran volumen usando un tampón de lisis que contiene Sarkosyl, DTT y Tween 20 o tampón de lisis de Maas - Dalhoff.

La Fig. 6 muestra una preparación de muestras de gran volumen a los 15 minutos y 30 minutos con detección de 25 y 100 copias de *Chlamydia trachomatis*.

La Fig. 7 muestra la lisis en un protocolo de preparación de muestras a gran volumen a 15 minutos y 30 minutos con detección de 25 y 100 copias de *Neisseria gonorrhoeae*.

10 La Fig. 8 muestra la etapa de híbrido/captura en un protocolo de preparación de muestras de gran volumen a 15 minutos y 30 minutos con detección de 25 y 100 copias de *Neisseria gonorrhoeae*.

La Fig. 9 muestra un ejemplo de un protocolo de preparación de muestras de gran volumen de 60 minutos.

La Fig. 10 muestra un ejemplo de un protocolo de preparación de muestras de gran volumen de 30 minutos.

15 La Fig. 11 muestra un híbrido de gran volumen/captura con un tampón de resuspensión que contiene 50 mM de NaOH o 100 NaOH probado con 0, 10, 25 y 100 copias de *Neisseria gonorrhoeae*.

La Fig. 12 muestra (A) una preparación de muestras de gran volumen que implica una comparación entre la concentración de 2 nM y 3 nM de synARN a los 15 minutos y 30 minutos de tiempo de incubación mediante la prueba de *Chlamydia trachomatis*; (B) una comparación de la etapa de hibridación entre el PRESERVICYT limpio y clínico a los 15 minutos y 30 minutos mediante la prueba *Neisseria gonorrhoeae*.

20 La Fig. 13 muestra una preparación de muestras de gran volumen en medio PRESERVICYT con un paso de desnaturalización de 15 minutos a 68,5°C y un paso híbrido/captura de 15 minutos a 5°C con reactivos calentados. Las células de *Neisseria gonorrhoeae* y *Chlamydia trachomatis* fueron sometidas a prueba.

25 La Fig. 14 muestra una preparación de muestras de gran volumen en medio PRESERVICYT con un paso de desnaturalización de 7,5 minutos a 68,5°C y un paso híbrido/captura de 22,5 minutos a 50°C con reactivos calentados. Las células de *Neisseria gonorrhoeae* y *Chlamydia trachomatis* fueron sometidas a prueba.

La Fig. 15 muestra una preparación de muestra en 100 µl, 250 µl, 500 µl y 1000 µl de medio STM. Las células de *Neisseria gonorrhoeae* y *Chlamydia trachomatis* fueron sometidas a prueba.

Descripción detallada

30 La presente descripción se refiere a métodos, composiciones, reactivos y kits para determinar rápida y selectivamente la presencia de una baja concentración de moléculas de ácido nucleico diana en grandes volúmenes o volúmenes pequeños de medio de recogida. Los métodos, composiciones, reactivos y kits se pueden utilizar con fines de diagnóstico clínico, incluyendo, pero sin limitarse a, la detección e identificación de organismos patógenos y la detección de una predisposición genética a una enfermedad particular.

Preparación de la muestra

35 Las muestras de gran volumen son aquéllas en las que la diana a purificar, enriquecer o detectar se encuentra en una gran cantidad de muestra, por ejemplo el procesamiento en aproximadamente 0,5 ml, aproximadamente 1 ml y aproximadamente 2 ml de muestra o más. Generalmente, la diana se diluye en la muestra y como resultado, es difícil de purificar, enriquecer o detectar. Usando sangre como ejemplo, la detección de patógenos sería un gran volumen de uso del método específico de secuencia.

40 En otro aspecto, los métodos de preparación de muestras descritos en la presente memoria descriptiva no están limitados a grandes volúmenes de muestra. Por ejemplo, se puede usar un tamaño de muestra de aproximadamente 50 µl, aproximadamente 100 µl, aproximadamente 250 µl, de aproximadamente 100 µl a aproximadamente 250 µl, o de aproximadamente 150 µl a aproximadamente 250 µl junto con la preparación de muestra descrita en la presente memoria. En otro aspecto, los tamaños de muestra más pequeños de aproximadamente 50 µl, aproximadamente 45 100 µl, aproximadamente 250 µl, de aproximadamente 100 µl a aproximadamente 250 µl o de aproximadamente 150 µl a aproximadamente 250 µl pueden analizarse en una placa de microvaloración junto con los métodos descritos en esta.

50 En un aspecto, se recoge u obtiene una muestra biológica o clínica, se añade 1 mL o más de un medio de recogida a la muestra, la muestra biológica suspendida experimenta una etapa de lisis y/o desnaturalización, después de que se realizan las etapas de lisis y/o desnaturalización la muestra biológica experimenta una etapa de híbrido/captura, y posteriormente se lava. Después de las etapas de lavado, se puede responder a la muestra y se puede detectar la molécula de ácido nucleico diana. En un aspecto, las etapas de lisis y desnaturalización se completan en menos de

aproximadamente 10 minutos y la etapa de híbrido/captura se completa en menos de aproximadamente 25 minutos. En otro aspecto, las etapas de lisis y desnaturalización se completan en menos de aproximadamente 15 minutos y la etapa de híbrido/captura se completa en menos de aproximadamente 15 minutos. En otro aspecto, se puede usar un volumen de muestra de 50 µl, aproximadamente 100 µl, aproximadamente 250 µl, de aproximadamente 100 µl a aproximadamente 250 µl, o de aproximadamente 150 µl a aproximadamente 250 µl en el método anterior. En otro aspecto, tal como el caso con sangre, suero y orina, se recoge u obtiene una muestra biológica o clínica y no hay necesidad de añadir medios de recogida a la muestra porque la molécula de ácido nucleico diana está contenida dentro de la orina, el suero, o la sangre.

En un aspecto, el método de preparación de muestras de gran volumen incluye:

- 10 (a) añadir un tampón de lisis a una muestra biológica o cervical suspendida en 1 ml o más de medios de recogida;
- (b) añadir tampón de desnaturalización a la muestra biológica o cervical suspendida en 1 ml o más de medios de recogida;
- (c) hibridar una molécula de ácido nucleico diana con al menos una sonda polinucleotídica;
- (d) capturar la molécula de ácido nucleico diana hibridada; y
- 15 (e) lavar el soporte híbrido capturado con tampón de lavado.

En un aspecto, después de la etapa de lavado, el soporte de captura híbrido se resuspende en un tampón de resuspensión. En otro aspecto, después de completarse el protocolo de preparación de muestras de gran volumen, se detecta la molécula de ácido nucleico diana. En otro aspecto, después de completarse el protocolo de preparación de muestras de gran volumen, se realiza la PCR sobre las moléculas de ácido nucleico diana. Los protocolos de preparación de muestra de gran volumen también pueden usarse con los métodos para aislar y reconocer las moléculas de ácido nucleico expuestas en la Solicitud Provisional de EE.UU. No. 12/605.540 y en la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 12/605.605.

Los protocolos de preparación de volumen de muestra descritos también pueden usarse conjuntamente con las patentes basadas en la tecnología Hybrid Capture de la Patente de Estados Unidos N° 4.732.847, Patente de Estados Unidos N° 4.865.980 y Patente de Estados Unidos N° 6.228.578.

En otro aspecto, se puede usar un volumen de muestra de 50 µl, aproximadamente 100 µl, aproximadamente 250 µl, de aproximadamente 100 µl a aproximadamente 250 µl, o de aproximadamente 150 µl a aproximadamente 250 µl en los métodos anteriores.

Sin estar limitadas, las figuras 9 y 10 proporcionan ejemplos de protocolos de preparación de muestras de gran volumen. En otro aspecto, los métodos de preparación de muestra descritos en las Figuras 9 y 10 pueden tener un volumen de muestra de aproximadamente 50 µl o más, aproximadamente 100 µl o más, aproximadamente 250 µl o más, de aproximadamente 100 µl a aproximadamente 250 µl, o de aproximadamente 150 µl a aproximadamente 250 µl, aproximadamente 0,5 ml o más, aproximadamente 1 ml o más, aproximadamente 2 ml o más, aproximadamente 3 ml o más, aproximadamente 4 ml o más, aproximadamente 5 ml o más, aproximadamente 10 ml o más, o aproximadamente 20 ml o más.

En un aspecto, se puede procesar una muestra clínica o biológica utilizando la metodología de preparación de muestras de gran volumen descrita junto con un ensayo o instrumento semiautomatizado o totalmente automatizado. Por ejemplo, se puede procesar una muestra clínica o biológica utilizando la metodología de preparación de muestras de gran volumen descrita en conjunción con los ensayos, métodos e instrumentos expuestos en la Solicitud de Patente de Estados Unidos No. 12/508.304, Solicitud de Patente de Estados Unidos No. 12/508.306, y la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 12/622.131.

Muestra biológica

Los métodos de preparación de muestras de la descripción pueden usarse para aislar o detectar la molécula de ácido nucleico diana a partir de muestras, incluyendo, sin limitación, un espécimen o cultivo (por ejemplo, cultivos celulares, microbiológicos y virales) incluyendo muestras biológicas y ambientales. Las muestras biológicas pueden proceder de un animal, incluyendo un ser humano, ser fluidas, sólidas (por ejemplo, heces) o tejidos, así como productos e ingredientes líquidos y sólidos para alimentos y piensos e ingredientes tales como productos lácteos, verduras, carne y subproductos de la carne y residuos. Las muestras ambientales incluyen material ambiental tales como muestras de superficies, suelo, agua y muestras industriales, así como muestras obtenidas de instrumentos, aparatos, equipos, utensilios, artículos desechables y no desechables de alimentos y productos lácteos.

En un aspecto, las muestras son muestras biológicas que incluyen, pero no se limitan a, células epiteliales cervicales (por ejemplo, una muestra obtenida de un hisopo cervical), células adenoides, células epiteliales anales, sangre, saliva, líquido cefalorraquídeo, líquido pleural, leche, linfa, esputo y semen. La muestra puede comprender una molécula de ácido nucleico bicatenario o puede comprender una molécula de ácido nucleico monocatenario. Si está

presente una molécula de ácido nucleico bicatenario, puede prepararse para el análisis de hibridación por una diversidad de métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, utilizando un álcali, usando proteinasa K/SDS, sales caotrópicas. El proceso de preparación de una molécula de ácido nucleico bicatenario para el análisis de hibridación implica generalmente convertirlo en una molécula de ácido nucleico de cadena sencilla. Este proceso se conoce generalmente como desnaturalización. Sin embargo, también se contempla que una molécula de ácido nucleico bicatenario pueda ser detectada sin desnaturalización, por ejemplo, a través de una construcción de cadena triple.

La molécula de ácido nucleico diana en una muestra puede ser ADN o ARN o bien ADN y ARN. La molécula de ácido nucleico diana puede estar contenida dentro de una molécula de ácido nucleico más grande. La detección de la molécula de ácido nucleico diana o de la molécula de ácido nucleico más grande que contiene la molécula de ácido nucleico diana se contempla en esta descripción.

La muestra biológica puede comprender células cervicales, por ejemplo, células cervicales humanas. La muestra puede recogerse con cualquier método o dispositivo conocido en la técnica, incluyendo un dispositivo de recolección químicamente inerte tal como un hisopo con punta DACRON. Se pueden usar otros dispositivos de recolección aceptables incluyendo, pero no limitándose a, hisopo de algodón, cepillo cervical, hisopo flocado (un hisopo en forma de un hisopo de DACRON, pero hecho con fibras de nylon permitiendo la recolección de más células y la liberación más fácil de las células), escobillas cervicales, mini escobillas, lavados, o cualquier dispositivo de recolección utilizado con frecuencia en pruebas de Papanicolaou.

En un aspecto, los métodos descritos incluyen la recogida de una muestra de una mujer de más de 30 años de edad. El método también puede incluir la recolección de una muestra de una mujer de más de 30 años a través de un frotis de Papanicolaou o una prueba comparable. La muestra recogida mediante el frotis de Papanicolaou o una prueba comparable puede ser una muestra de células cervicales.

Una vez que se recoge la muestra, se puede colocar en un tubo de muestra. El tubo se puede sellar para evitar la contaminación. El dispositivo de recogida (hisopo, cepillo, etc.) puede contener además un mecanismo mediante el cual se puede mover una vez que está dentro del tubo de muestra. En un aspecto, el dispositivo de recogida contiene un inserto que se puede mover utilizando un imán. En un aspecto, este inserto comprende un metal. En otro aspecto, este inserto comprende un material paramagnético. En un aspecto, el inserto incluye materiales ferromagnéticos y diamagnéticos. Una ventaja de mover el dispositivo de recogida una vez que está dentro del tubo de muestra es evitar que el dispositivo de recogida haga contacto con cualquier extractor de muestras o dispositivos de detección de muestras. Ejemplos de dispositivos de extracción de muestras incluyen pipetas, puntas de pipeta, botellas cuentagotas u otros dispositivos de extracción de baja tecnología. Ejemplos de dispositivos de detección de muestras incluyen sondas y puntas de sonda.

En un aspecto, la muestra biológica o clínica no se diluye. Es decir, la muestra biológica o clínica se recoge de un individuo y se inicia inmediatamente la metodología de preparación de grandes muestras descrita. La evaluación de la muestra inmediatamente después de que se recoge de un individuo disminuye el tiempo necesario para identificar una molécula de ácido nucleico diana por los métodos descritos en este documento y es beneficiosa en los lugares de atención, donde se dan al paciente los resultados el mismo día después de la recolección de la muestra biológica o clínica.

Medio de recogida

En un aspecto, el método de preparación de muestras de gran volumen tiene lugar en un medio de recogida. En otro aspecto, la muestra biológica se recoge y se almacena en un medio de recogida. El medio de recogida tiene varias funciones, incluyendo como medio conservante, para conservar ácidos nucleicos e inhibir las nucleasas para prevenir la degradación de ácidos nucleicos antes del análisis. En un aspecto, el medio de recogida está basado en detergentes. Sin ser limitados, se pueden encontrar ejemplos de medios de recogida adecuados para uso con la descripción en la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 12/605.540 y en la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 12/605 605.

En un aspecto, el medio de recogida a base de detergente comprende, consiste esencialmente en, o consiste en 1,0% de NP-40, 0,25% de desoxicolato sódico, 50 mM de Tris-HCl, 25 mM de EDTA, 150 mM de NaCl y 0,05% de azida sódica. En otro aspecto, el medio de recogida a base de detergente comprende, consiste esencialmente en, o consiste en aproximadamente de 0,5% a aproximadamente 2,0% de NP-40, de aproximadamente 0,10% a aproximadamente 0,40% de desoxicolato de sodio, de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 75 mM de Tris-HCl, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 50 mM de EDTA, de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 200 mM de NaCl, y de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 0,10% de azida sódica. En otros aspectos, el medio de recogida a base de detergente comprende, consiste esencialmente en, o consiste en aproximadamente de 0,8% a aproximadamente 1,5% de NP-40, de aproximadamente 0,20% a aproximadamente 0,40% de desoxicolato de sodio, de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 60 mM de Tris-HCl, de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 40 mM de EDTA, de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 200 mM de NaCl, y de aproximadamente 0,025% a aproximadamente 0,075% de azida sódica. En aún otro aspecto, el medio de recogida a base de detergente comprende, consiste esencialmente en, o consiste en aproximadamente de 0,9% a aproximadamente 1,2% de NP-40, de aproximadamente 0,20% a aproximadamente 0,30% de

desoxicolato de sodio, de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 60 mM de Tris-HCl, de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 30 mM de EDTA, de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 150 mM de NaCl y de aproximadamente 0,04% a aproximadamente 0,06% de azida sódica.

- 5 En un aspecto, el medio de recogida comprende, consiste esencialmente en, o consiste en NP-40 y EDTA. En otro aspecto, el medio de recogida comprende, consiste esencialmente en, o consiste en NP-40, EDTA y azida sódica. En un aspecto, el medio de recogida comprende, consta esencialmente de, o consta de desoxicolato sódico, EDTA y azida sódica. En un aspecto, el medio de recogida comprende, consiste esencialmente en, o consiste en aproximadamente NP-40, desoxicolato sódico, EDTA y azida sódica. En un aspecto, el medio de recogida comprende, consiste esencialmente en, o consiste en NP-40, desoxicolato sódico, Tris-HCl, EDTA y azida sódica.
- 10 En otro aspecto, el medio de recogida comprende, consiste esencialmente en, o consiste en de 0,5% a aproximadamente 2,0% de NP-40 y de 10 mM a aproximadamente 50 mM de EDTA. En otro aspecto, el medio de recogida comprende, consiste esencialmente en, o consiste en de 0,5% a aproximadamente 2,0% de NP - 40, de 10 mM a aproximadamente 50 mM de EDTA y de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 0,10% de azida de sodio. En un aspecto, el medio de recogida comprende, consiste esencialmente en, o consta de aproximadamente 0,10% a aproximadamente 0,40% de desoxicolato sódico, de 10 mM hasta aproximadamente 50 mM de EDTA y de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 0,10% de azida sódica. En un aspecto, el medio de recogida comprende, consiste esencialmente en, o consiste en aproximadamente de 0,5% a aproximadamente 2,0% de NP-40, de aproximadamente 0,10% a aproximadamente 0,40% de desoxicolato de sodio, de 10 mM a aproximadamente 50 mM de EDTA y de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 0,10% de azida sódica. En un aspecto, el medio de recogida comprende, consiste esencialmente en, o consiste en de aproximadamente 0,5% a aproximadamente 2,0% de NP - 40, de aproximadamente 0,10% a aproximadamente 0,40% de desoxicolato de sodio, de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 75 mM de Tris - HCl, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 50 mM de EDTA, y de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 0,10% de azida sódica. En ciertas realizaciones, el medio comprende o consiste esencialmente en NP-40 al 1%, desoxicolato sódico al 0,25%, Tris-HCl 50 mM, EDTA 25 mM, NaCl 150 mM y azida sódica al 0,09%. Este medio se refiere a menudo en este documento y en las figuras como Medio de Colección Digene o DCM.
- 15
20
25

Las muestras pueden recogerse en otros medios de recogida conocidos y pueden usarse en los métodos descritos en la presente memoria. Ejemplos de otros medios de recogida incluyen PRESERVCYT, SUREPATH y STM (Muestra/Medio de Transporte de Muestras).

- 30 Ciertos medios de recogida son específicos de ácido nucleico. Las muestras recogidas en algunos de estos medios pueden requerir un tratamiento antes de que los ácidos nucleicos en las muestras puedan ser detectados y analizados. Se conocen en la técnica varios métodos de procesamiento de muestras (también conocidos como preparación de las muestras). Por ejemplo, las muestras de células cervicales recogidas para análisis citológico en un medio tal como PRESERVCYT pueden combinarse con un tampón de lisis basado en detergente seguido por la adición de perlas paramagnéticas que comprenden superficies de unión de ácido nucleico. Además, se pueden combinar otras muestras de células recogidas en otros medios de recogida disponibles comúnmente conocidos con un tampón de lisis basado en detergente seguido de la adición de perlas paramagnéticas que comprenden superficies de unión a ácidos nucleicos.
- 35

- 40 El medio a base de detergente puede mezclarse con PRESERVCYT, SUREPATH o STM. En un aspecto, se mezcla con PRESERVCYT, SUREPATH o STM un medio de recogida que incluye NP-40 al 1%, desoxicolato sódico al 0,25%, Tris-HCl 50 mM, EDTA 25 mM, NaCl 150 mM y azida sódica al 0,09% y se añade por una muestra biológica. En otro aspecto, se mezcla un medio de recogida de aproximadamente el 75% de PRESERVCYT, SUREPATH o STM con aproximadamente 25% de un medio de recogida que incluye 1% de NP-40, 0,25% de desoxicolato de sodio, 50 mM de Tris-HCl, 25 mM de EDTA, 150 mM de NaCl y azida sódica al 0,09%. En otro aspecto, se mezcla un medio de recogida de aproximadamente el 50% de PRESERVCYT, SUREPATH o STM con aproximadamente 50% de un medio de recogida incluyendo NP-40 al 1%, desoxicolato sódico al 0,25%, Tris-HCl 50 mM, EDTA 25 mM, NaCl 150 mM y 0,09% de azida sódica. En un aspecto, PRESERVCYT, SUREPATH o STM se diluyen con agua, lo que puede mejorar la relación señal-ruido. Aunque la detección en SUREPATH, PRESERVCYT o STM al 100% es factible, tanto el fondo como la señal mejoran con la dilución mediante un medio de recogida que incluye 1% de NP-40, 0,25% de desoxicolato de sodio, 50 mM de Tris-HCl, 25 mM de EDTA, 150 mM de NaCl y 0,09% de azida sódica.
- 45
50

- 55 En un aspecto, se usan medios de recolección "limpios" o "clínicos" para suspender la muestra biológica. Medios de recogida "limpios" se refieren a medios de recogida que no contienen una muestra biológica, tal como una muestra de células. En un aspecto, las moléculas de ácido nucleico diana pueden suspenderse en medios de recogida "limpios". En una muestra de medios de recogida "limpios" no hay antecedentes clínicos presentes. Los medios de recogida "clínicos" se refieren a los medios de recogida que contienen una muestra biológica, tal como una muestra de células.

- 60 En un aspecto, la muestra biológica o clínica se suspende en aproximadamente 50 µl, aproximadamente 100 µl, aproximadamente 250 µl, aproximadamente 0,5 ml, aproximadamente 0,75 ml, aproximadamente 1,0 ml, aproximadamente 1,25 ml, aproximadamente 1,5 ml, aproximadamente 2,0 ml, aproximadamente 2,5 ml,

aproximadamente 3,0 ml, aproximadamente 5,0 ml, aproximadamente 10 ml, aproximadamente 15 ml, aproximadamente 25 ml, aproximadamente 30 ml, aproximadamente 50 ml, o aproximadamente 100 ml de uno de los medios de recogida anteriores o mezclas de los mismos. En un aspecto, la muestra biológica o clínica se suspende en aproximadamente 50 µl o más, aproximadamente 100 µl o más, aproximadamente 250 µl, aproximadamente 0,5 ml o más, aproximadamente 0,75 ml o más, aproximadamente 1,0 ml o más, aproximadamente 1,25 ml o más, aproximadamente 1,5 ml o más, aproximadamente 2,0 ml o más, aproximadamente 2,5 ml o más, aproximadamente 3,0 ml o más, aproximadamente 5,0 ml o más, aproximadamente 10 ml o más, aproximadamente 15 ml o más, aproximadamente 25 ml o más, aproximadamente 30 ml o más, aproximadamente 50 ml o más, o aproximadamente 100 ml o más de cualquiera de los medios de recogida anteriores o mezclas de los mismos. En un aspecto, la muestra biológica o clínica se suspende en aproximadamente 50 µl, aproximadamente 100 µl, aproximadamente 250 µl, 0,5 ml, aproximadamente 0,75 ml, aproximadamente 1 ml, aproximadamente 1,25 ml, aproximadamente 1,5 ml, aproximadamente 2,0 ml, aproximadamente 2,5 mL, aproximadamente 3,0 mL, aproximadamente 5,0 mL, aproximadamente 10 mL, aproximadamente 15 mL, aproximadamente 25 mL, aproximadamente 30 mL, aproximadamente 50 mL, o aproximadamente 100 mL de PRESERVCYT, SUREPATH, STM, o un medio de recolección que incluye aproximadamente de 0,5% a aproximadamente 2,0% de NP - 40, de aproximadamente 0,10% a aproximadamente 0,40% de desoxicolato de sodio, de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 75 mM de Tris - HCl, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 50 mM de EDTA, de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 200 mM de NaCl y de aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 0,10% de azida sódica o mezclas de los mismos.

En otro aspecto, la muestra biológica a analizar y procesar por los métodos descritos en el presente documento está presente en una muestra de orina, suero o sangre en cualquiera de los volúmenes anteriores. Cuando la muestra biológica a analizar está presente en la orina, el suero, la sangre o cualquier otro fluido corporal, la muestra puede recogerse y tomarse una alícuota para realizar el análisis de la preparación de la muestra de gran volumen por cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria. En un aspecto, la orina tiene un pH de aproximadamente pH 3,5, aproximadamente pH 4,0, aproximadamente pH 5, aproximadamente pH 6; aproximadamente pH 6,5, aproximadamente pH 7,0, aproximadamente pH 8,0, aproximadamente pH 9,0, de aproximadamente pH 4,5 a aproximadamente pH 9,0, de aproximadamente pH 6,0 a aproximadamente pH 8,0, o de aproximadamente pH 6,0 a aproximadamente pH 7,0.

En un aspecto, los métodos de preparación de muestras descritos en este documento se aplican a muestras biológicas que se han preparado previamente para el análisis de diagnóstico. En un aspecto, la muestra biológica a la que se aplican los métodos de preparación de muestra descritos ha sido preparada previamente para el análisis citológico. En un aspecto, la muestra biológica se recoge de un paciente y se suspende en un medio, tal como SUREPATH, PRESERVCYT, STM o un medio de recogida que incluye de aproximadamente 0,5% a aproximadamente 2,0% de NP-40, de aproximadamente 0,10% a aproximadamente 0,40% de desoxicolato de sodio, de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 75 mM de Tris-HCl, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 50 mM de EDTA, de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 200 mM de NaCl y de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 0,10% de azida sódica. En otro aspecto, la muestra biológica a analizar y procesar por los métodos descritos en el presente documento está presente en una muestra de orina, suero o sangre. En un aspecto, una parte de la muestra suspendida se evalúa con fines citológicos y se retira una alícuota para fines de preparación de muestras siguiendo la metodología descrita en la presente memoria. En otro aspecto, se separa una alícuota de aproximadamente 0,1 ml a aproximadamente 0,5 ml, de aproximadamente 0,5 ml a aproximadamente 1,0 ml, o de aproximadamente 1,0 ml a 2,0 ml de la muestra biológica suspendida y se somete a los métodos de preparación de la muestra descritos en la presente memoria.

En un aspecto, la muestra biológica se recoge de un paciente y se suspende en aproximadamente 1 ml o más, aproximadamente 2 ml o más, aproximadamente 5 ml o más, aproximadamente 10 ml o más, o aproximadamente 20 ml o más de medios. En otro aspecto, la muestra biológica se recoge de un paciente y se suspende en aproximadamente 1 ml de medio STM, aproximadamente 10 ml de medio SUREPATH o aproximadamente 20 ml de medio PRESERVCYT. En otro aspecto, después de suspender la muestra biológica en el medio anterior, se toma una alícuota y se somete a los métodos de preparación de muestras descritos en la presente memoria. En un aspecto, se separa de la muestra biológica una alícuota de aproximadamente 0,1 ml a aproximadamente 0,5 ml, de aproximadamente 0,5 ml a aproximadamente 1,0 ml, o de aproximadamente 1,0 ml a 2,0 ml y se somete a los métodos de preparación de la muestra descritos en el presente documento.

En un aspecto, la muestra se evalúa mediante los métodos de preparación de muestras descritos en este documento antes de la prueba citológica. En otro aspecto, la muestra se evalúa mediante los métodos de preparación de muestras descritos en este documento después de la prueba citológica.

En un aspecto, la muestra se prepara usando un ensayo de citología en base líquida (LBC). Los medios LBC pueden contener fijadores tisulares tales como alcohol y formalina que sirven para estabilizar la muestra, inhibir el crecimiento bacteriano, preservar la morfología celular y los grupos de diagnóstico, y asegurar la preparación de los portaobjetos de citología de monocapa de tejido. Sin embargo, muchas composiciones utilizadas para conservar las muestras biológicas, tales como SUREPATH, contienen alcohol o formalina que puede ser perjudicial para el análisis de las moléculas de ácido nucleico usando la metodología de preparación de muestras convencional. En un aspecto, los portaobjetos citológicos contienen muestras de células cervicales o cualquier otra muestra biológica capaz de ser

evaluada. En un aspecto, se utiliza el medio SUREPATH para preparar la muestra de LBC. Además de la preparación citológica, las muestras de LBC pueden ser utilizadas para la detección de trastornos, tales como los patógenos comunes transmitidos sexualmente, como el virus del papiloma humano, *Neisseria gonorrhoeae* y *Chlamydia trachomatis*, entre otros.

5 Moléculas de ácido nucleico diana

Las moléculas de ácido nucleico diana incluyen, sin limitación, moléculas de ácido nucleico encontradas en especímenes o cultivos (por ejemplo, cultivos celulares, microbiológicos y virales) incluyendo muestras biológicas y ambientales. Las moléculas de ácido nucleico diana pueden encontrarse en muestras biológicas de un animal, incluyendo un ser humano, fluidos, sólidos (por ejemplo, heces) o tejidos, así como alimentos y productos alimenticios líquidos y sólidos e ingredientes tales como productos lácteos, verduras, carne y subproductos de la carne, y residuos. Las moléculas de ácido nucleico diana se pueden encontrar en muestras ambientales e incluyen material ambiental tales como muestras de superficie, suelo, agua e industriales, así como muestras obtenidas de instrumentos, aparatos, equipos, utensilios, artículos desechables y no desechables de alimentos y productos lácteos.

Las moléculas de ácido nucleico diana encontradas en muestras biológicas incluyen, pero no se limitan a, muestras cervicales (p.ej., una muestra obtenida de un hisopo cervical) o muestras de células cervicales, células adenoides, células epiteliales anales, sangre, suero, saliva, líquido cefalorraquídeo, líquido pleural, leche, linfa, esputo, orina y semen. Las moléculas de ácido nucleico diana pueden ser de otros virus, bacterias, micobacterias o plasmidios, por ejemplo citomegalovirus (CMV), herpes, HIV, HINI, clamidia, gonorrea, *Neisseria gonorrhoeae* (GC), *Chlamydia trachomatis* (CT), *Trichomonas vaginalis*, *Staphylococcus aureus*, tuberculosis, coronavirus asociado al SARS o influenza. En un aspecto, las moléculas de ácido nucleico diana son al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98% al menos el 99%, o 100% idénticas a las moléculas de ácido nucleico asociadas con cualquiera de las muestras cervicales (por ejemplo, una muestra obtenida de un hisopo cervical) o muestras de células cervicales, células adenoides, células epiteliales anales, sangre, saliva, líquido cefalorraquídeo, líquido pleural, leche, linfa, esputo, orina y semen, otros virales, bacterias, micobacterias o plasmidios, por ejemplo citomegalovirus (CMV), herpes, HIV, HINI, clamidia, gonorrea, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis*, *Staphylococcus aureus*, tuberculosis, coronavirus asociado al SRAS o influenza.

En un aspecto, las moléculas de ácido nucleico diana son virus del papiloma humano (HPV) e incluyen variantes genéticas del VPH. Una variante incluye polimorfismos, mutantes, derivados, formas modificadas, alteradas, o similares del ácido nucleico diana. En un aspecto, el ácido nucleico diana es un ácido nucleico de HPV. En otro aspecto, el ácido nucleico de VPH es ADN de VPH de un tipo de VPH de alto riesgo. En otro aspecto, el ácido nucleico de VPH es ARN de VPH de un tipo de VPH de alto riesgo. En otro aspecto, los ácidos nucleicos diana son cualquiera de los tipos de VPH de alto riesgo 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 y 82 o cualquiera de los tipos 6, 11, 40, 43, 53, 61, 67, 69, 70, 71, 72, 81 y 83 del VPH de bajo riesgo.

En otro aspecto, se reconoce una combinación o conjunto de moléculas de ácido nucleico. Por ejemplo, un conjunto de moléculas de ácido nucleico diana puede incluir tipos de VPH de alto riesgo 16, 18 y 45. En un aspecto, el conjunto de moléculas de ácido nucleico a ser reconocidas incluyen sólo tipos de VPH de alto riesgo 16, 18 y 45. Además, un conjunto de moléculas de ácido nucleico diana puede comprender, consistir esencialmente o consistir en tipos de VPH de alto riesgo 16, 18 y 45.

En otro aspecto, la molécula de ácido nucleico diana es al menos 70%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 98%, al menos 99% o 100% idénticas a moléculas de ácido nucleico asociadas con cualquiera de *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, HPV, variantes genéticas de HPV, ADN de HPV de un tipo de VPH de alto riesgo o ARN de VPH de alto riesgo tipo HPV. En otro aspecto, los ácidos nucleicos diana son al menos 70%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 98%, al menos 99%, o 100% idéntico a moléculas de ácido nucleico asociadas con cualquiera de los tipos de VPH de alto riesgo 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 y 82 o cualquiera de los tipos de VPH de bajo riesgo 6, 11, 40, 43, 53, 61, 67, 69, 70, 71, 72, 81 y 83.

Usando métodos de la presente invención, la molécula de ácido nucleico diana puede estar presente en concentraciones menores que aproximadamente 1 pg por ml, menores de aproximadamente 0,75 pg por ml, menores de 0,5 pg por ml, menores de 0,25 pg por ml y menores de 0,2 pg por ml.

Como se ha indicado anteriormente, la molécula de ácido nucleico diana puede ser ADN o ARN.

Cuando la molécula de ácido nucleico diana es ADN, la sonda puede ser ARN y cuando el ácido nucleico diana es ARN, la sonda puede ser ADN. Sin embargo, se puede usar una sonda de ADN con una molécula de ácido nucleico diana de ADN y se puede usar una sonda de ARN con una molécula de ácido nucleico diana de ARN.

Desnaturalización y lisis

Después de que la muestra se recoja en un medio de recogida o se obtenga, por ejemplo, en sangre, suero u orina como se ha descrito, la muestra puede tratarse con un reactivo de desnaturalización para hacer accesible la molécula de ácido nucleico diana a la hibridación. En un aspecto, la muestra se desnaturaliza con una solución alcalina. Puede usarse cualquier álcali que pueda llevar un pH de solución a aproximadamente pH 12, aproximadamente pH 13 o aproximadamente pH 14. Además, puede usarse cualquier álcali que pueda llevar un pH de solución a un intervalo de aproximadamente pH 12 a aproximadamente pH 13, de aproximadamente pH 12 a aproximadamente pH 14 y de aproximadamente pH 13 a aproximadamente pH 14. Las concentraciones adecuadas de álcali incluyen de aproximadamente 1,0 N a aproximadamente 2,0 N, de aproximadamente 1,25 N a aproximadamente 1,75 N, y de aproximadamente 1,25 N a aproximadamente 1,5 N, y aproximadamente 1,5 N así como cualquier número dentro de los intervalos recitados. Sin limitarse, los álcalis adecuados incluyen NaOH y KOH.

A temperatura ambiente, la muestra tratada con el reactivo de desnaturalización se puede mezclar mezclando a mano o agitando mecánicamente a aproximadamente 800 rpm, aproximadamente 900 rpm, aproximadamente 1000 rpm, entre aproximadamente 600 y aproximadamente 1000 rpm, o entre aproximadamente 600 y 1200 rpm. En un aspecto, la muestra tratada con el reactivo de desnaturalización no se agita. El pH de la muestra después de la adición del reactivo de desnaturalización puede ser aproximadamente 14. En otro aspecto, el pH puede ser de aproximadamente pH 12 o pH 13. Dicho pH básico cortará y desnaturalizará la mayoría del ácido nucleico en la muestra. Además, el tratamiento alcalino puede romper las interacciones entre los péptidos y los ácidos nucleicos para mejorar la accesibilidad del ácido nucleico diana y degradar la proteína.

El tratamiento alcalino de la proteína homogeneiza eficazmente la muestra para asegurar la reproducibilidad de los resultados del análisis para una muestra dada. También puede reducir la viscosidad de la muestra para aumentar la cinética, homogenizar la muestra y reducir el fondo mediante la destrucción de cualquier ácido nucleico de ARN monocatenario endógeno, híbridos de ADN-ARN o híbridos de ARN-ARN en la muestra. También ayuda a inactivar enzimas tales como RNasas y DNasas que pueden estar presentes en la muestra. Cualquier experto en la materia apreciaría que si el ARN es el ácido nucleico diana (en oposición al ADN), pueden ser preferibles diferentes reactivos, incluyendo, pero sin limitarse a, extracción con fenol y precipitación con TCA/acetona, y extracción con tiocianato de guanidinio-fenol-cloroformo.

Se pueden emplear otros métodos de desnaturalización tales como la utilización de una etapa de calentamiento, por ejemplo, calentamiento de la muestra a aproximadamente 95°C para separar las cadenas de ácido nucleico. También se pueden utilizar enzimas como la helicasa.

En un aspecto, el tampón de desnaturalización, tal como NaOH, se añade a la muestra y se calienta. En otro aspecto, se añade NaOH de 1,5 N a 2,0 N a la muestra y se calienta. La muestra con reactivo de desnaturalización se puede calentar de aproximadamente 60°C a aproximadamente 80°C durante aproximadamente menos de 30 minutos, de aproximadamente 65°C a aproximadamente 75°C durante aproximadamente menos de 30 minutos, de aproximadamente 67°C a aproximadamente 70°C durante aproximadamente menos de 30 minutos, a 68,5°C durante aproximadamente menos de 30 minutos; o a aproximadamente 70°C durante aproximadamente menos de 30 minutos, o cualquier número dentro de los intervalos mencionados. En otro aspecto, la muestra con reactivo de desnaturalización se calienta de aproximadamente 60°C a aproximadamente 80°C durante aproximadamente 10 a aproximadamente 30 minutos, o de aproximadamente 65°C a aproximadamente 75°C durante aproximadamente 10 a aproximadamente 30 minutos, de aproximadamente 67°C a aproximadamente 70°C durante aproximadamente 10 a aproximadamente 30 minutos, a aproximadamente 68,5°C durante aproximadamente 10 a aproximadamente 30 minutos, o a aproximadamente 70°C durante aproximadamente 10 a aproximadamente 30 minutos, o cualquier número dentro de los intervalos mencionados. En un aspecto, la muestra puede calentarse en el reactivo de desnaturalización en las condiciones anteriores durante aproximadamente 5 a aproximadamente 30 minutos, de aproximadamente 10 a aproximadamente 40 minutos, de aproximadamente 20 minutos a aproximadamente 40 minutos, o a aproximadamente 5 minutos, aproximadamente 7,5 minutos, aproximadamente 10 minutos, aproximadamente 15 minutos, aproximadamente 20 minutos, o aproximadamente 30 minutos, o cualquier número dentro de los intervalos mencionados. En aún otro aspecto, los tiempos de incubación y temperatura anteriores pueden completarse con o sin agitación.

En un aspecto, la etapa de desnaturalización se realiza a aproximadamente 68,5°C durante aproximadamente 5 a 30 minutos; a aproximadamente 68,5°C durante aproximadamente 5 a 15 minutos; a aproximadamente 68,5°C durante aproximadamente 5 a 10 minutos; y aproximadamente 68,5°C durante aproximadamente 7,5 minutos con o sin agitación. En otro aspecto, la etapa de desnaturalización se realiza a dos temperaturas: 67,5°C durante aproximadamente 7,5 min y 60°C durante aproximadamente 12,5 minutos.

En un aspecto, puede usarse cualquier tampón de lisis capaz de lisar células o material biológico. En otro aspecto, el tampón de lisis contiene Sarkosyl, DTT y Tween. En otro aspecto, el tampón de lisis comprende, consiste en, o consiste esencialmente en aproximadamente 7,5% de sarkosyl, aproximadamente 2,5% de NP-40 y aproximadamente 10 mM de DTT. En otro aspecto, el tampón de lisis comprende, consiste en, o consiste esencialmente en aproximadamente de 5,0% a aproximadamente 10% de sarkosyl, de aproximadamente 1,0 a

aproximadamente 5,0% de NP-40, y de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 20 mM de DTT. En otro aspecto, el tampón de lisis comprende, consiste en, o consiste esencialmente en aproximadamente 6,0% a aproximadamente 8% de sarkosyl, de aproximadamente 2,0 a aproximadamente 3,0% de NP-40 y de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 15 mM de DTT. También se puede usar tampón de lisis de Maas-Dalhoff.

En un aspecto, la muestra biológica o clínica puede someterse a una etapa de lisis sin retirar el material celular extraído. En un aspecto, el material celular extraído o lisado está presente durante la etapa de lisis y/o desnaturalización y la etapa de hibridación/captura y se elimina primero con lavado. Adicionalmente, en algunos aspectos, los métodos y ensayos descritos se realizan con una muestra biológica o clínica no purificada. Por consiguiente, los métodos y ensayos descritos realizados con muestras biológicas o clínicas no purificadas pueden contener, por ejemplo, cremas, lociones y antifúngicos, material celular y otras impurezas. Realizar los métodos descritos en muestras biológicas o clínicas, previamente no purificadas, disminuye el tiempo necesario para detectar moléculas de ácido nucleico diana en situaciones en las que la diana está presente en bajas concentraciones. La reducción del tiempo necesario para detectar moléculas de ácido nucleico diana es particularmente útil cuando es deseable alcanzar una identificación rápida de un trastorno o enfermedad, tal como en países en desarrollo donde el acceso a medicamentos y equipo médico puede ser escaso.

Hibridación y unión de sondas

En un aspecto, después de que la muestra que contiene el ácido nucleico experimente una etapa de lisis o desnaturalización, la muestra puede ponerse en contacto con una o más sondas polinucleotídicas bajo una condición suficiente para que una o más sondas polinucleotídicas hibriden con el ácido nucleico diana en la muestra para formar un híbrido de ácido nucleico bicatenario. La sonda puede ser ADN de longitud completa, truncada o sintética o ARN de longitud total, truncada o sintética ("ARN sin"). Si el ácido nucleico diana es ADN, entonces la sonda puede ser ARN y si el ácido nucleico diana es ARN, entonces la sonda puede ser ADN. Preferiblemente, las una o más sondas polinucleotídicas se diluyen en un diluyente de sonda que también puede actuar como un tampón de hibridación neutralizante (para neutralizar el reactivo de desnaturalización básico).

El diluyente de la sonda utilizado para las sondas de ADN o ARN será diferente debido a los diferentes requisitos necesarios para la estabilidad del ADN frente al ARN. Por ejemplo, si las sondas son ARN, es preferible neutralizar primero la muestra y añadir entonces la sonda o bien añadir la sonda de ARN y el agente neutralizante (diluyente de la sonda) a la muestra al mismo tiempo que el NaOH puede destruir el ARN. El diluyente de la sonda se puede usar para disolver y diluir la sonda y también a ayudar a restaurar la muestra a aproximadamente un pH neutro, por ejemplo, de aproximadamente pH 6 a aproximadamente pH 9, para proporcionar un entorno más favorable para la hibridación. Se puede utilizar un volumen suficiente de diluyente de la sonda, preferiblemente la mitad del volumen de la muestra, para neutralizar la muestra tratada con base.

En un aspecto, el diluyente de sonda comprende un tampón, ácido poliacrílico, NaOH y azida de sodio. El diluyente de la sonda puede comprender ácido acético. En un aspecto, el diluyente de sonda comprende 2,2 M de BES (ácido N,N-Bis(2-hidroxietil)-2-aminoetanosulfónico), ácido poliacrílico (PAA) al 2,6%, NaOH 0,7 N y azida sódica al 0,05%. El diluyente de sonda puede contener de aproximadamente 1,2 M a aproximadamente 2,6 M de BES, de aproximadamente 1,5 M a aproximadamente 2,5 M de BES; desde aproximadamente 1,75 M hasta aproximadamente 2,25 M de BES; desde aproximadamente 2 M hasta 2,4 M de BES, o aproximadamente 2,2 M de BES, así como cualquier número dentro de los intervalos mencionados. En un aspecto, el diluyente de sonda puede contener de aproximadamente 2% a aproximadamente 3,0% de PAA o, así como cualquier número dentro de los intervalos mencionados. En otro aspecto, la concentración de PAA es de aproximadamente 2,2% a aproximadamente 2,7%. En aún otro aspecto, la concentración de PAA es de aproximadamente 2,6%. En un aspecto adicional, el diluyente de sonda puede contener de aproximadamente 0,6 N a aproximadamente 0,8 N de NaOH, por ejemplo, aproximadamente 0,7 N de NaOH. La concentración de NaOH aumenta generalmente a medida que aumenta la cantidad de BES.

Para sondas de longitud completa, se puede añadir una solución alcalina calentada a la muestra, a continuación se puede añadir el diluyente de la sonda a la muestra a temperatura ambiente y, a continuación, se puede recalentar la muestra. Tal proceso puede inhibir la formación de la estructura secundaria. Los anticuerpos tienden a unirse irreversiblemente a estructuras con estructura secundaria. Cuando se utilizan sondas de longitud no completa tales como sondas truncadas o sintéticas, el calentamiento de las soluciones o la muestra puede no ser necesario debido a que no están presentes dificultades de estructuras secundarias. En un aspecto, la muestra no se calienta cuando se usa con sondas truncadas o sintéticas.

En un aspecto, después del tratamiento con el reactivo de desnaturalización, se puede añadir a la muestra una alícuota de tampón de neutralización, en un aspecto el diluyente de sonda descrito, en el que la o las sondas están disueltas, en condiciones apropiadas para permitir la hibridación o unión de la sonda y el ácido nucleico diana que se produzca. El tampón de neutralización puede contener una única sal tampón. En un aspecto, el tampón de neutralización no contiene más de una sal tampón única. La condición de hibridación es suficiente para permitir que una o más sondas polinucleotídicas se hibriden con una correspondiente secuencia de ácido nucleico complementaria, si está presente, en la muestra para formar un híbrido de ácido nucleico bicatenario.

Se emplean condiciones de hibridación adecuadas para las sondas y diluyentes particulares descritos en la presente memoria. Las sondas y los ácidos nucleicos de la muestra pueden incubarse durante un tiempo de hibridación, por ejemplo, al menos de aproximadamente 5 a aproximadamente 15 minutos, de aproximadamente 10 a aproximadamente 20 minutos, de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 minutos, de aproximadamente 20 a aproximadamente 30 minutos, de aproximadamente 20 a aproximadamente 45 minutos, de aproximadamente 30 a aproximadamente 1 hora, de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 2 horas, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 4 horas, de aproximadamente 4 horas a aproximadamente 24 horas a una temperatura de hibridación de aproximadamente 20°C, aproximadamente 25°C, aproximadamente 35°C, aproximadamente 40°C, aproximadamente 45°C, aproximadamente 50°C, aproximadamente 55°C, aproximadamente 60°C, y aproximadamente 65°C así como cualquier número dentro de los intervalos mencionados suficientes para permitir que una o más sondas polinucleotídicas se hibriden con una secuencia de ácido nucleico complementaria correspondiente. Las muestras se pueden incubar con o sin agitación a las temperaturas y tiempos anteriores.

Se emplean condiciones de hibridación adecuadas para las sondas y diluyentes particulares descritos en la presente memoria. Las sondas y los ácidos nucleicos de la muestra pueden incubarse durante un tiempo de hibridación, por ejemplo, de al menos aproximadamente 5 a aproximadamente 15 minutos, de aproximadamente 10 a aproximadamente 20 minutos, de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 minutos, de aproximadamente 20 a aproximadamente 30 minutos, de aproximadamente 20 a aproximadamente 45 minutos, de aproximadamente 30 a aproximadamente 1 hora, de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 2 horas, de aproximadamente 2 horas a aproximadamente 4 horas, de aproximadamente 4 horas a aproximadamente 24 horas a una temperatura de hibridación de aproximadamente 20°C a aproximadamente 25°C, de aproximadamente 35°C a aproximadamente 40°C, de aproximadamente 45°C a aproximadamente 50°C, de aproximadamente 55°C a aproximadamente 60°C y de aproximadamente 65°C a aproximadamente 70°C, así como cualquier número dentro de los intervalos mencionados suficientes para permitir que una o más sondas polinucleotídicas se hibriden con una secuencia de ácido nucleico complementaria correspondiente. Las muestras se pueden incubar con o sin agitación a las temperaturas y tiempos anteriores.

Sin limitarse, las condiciones de hibridación rigurosas pueden controlarse aumentando la temperatura, aumentando las condiciones iónicas por encima de 0,5 M (por ejemplo, NaCl) o reduciendo la concentración de PAA. Como ejemplo no limitativo, las condiciones de hibridación rigurosas pueden incluir la realización de una reacción de hibridación a temperaturas elevadas, tales como al menos aproximadamente 65°C, al menos aproximadamente 68,5°C, entre aproximadamente 67°C y aproximadamente 70°C, y entre aproximadamente 69°C y aproximadamente 70°C. Las condiciones de hibridación rigurosas también pueden incluir temperaturas elevadas, tales como de al menos aproximadamente 65°C, al menos aproximadamente 68,5°C y entre aproximadamente 67°C y aproximadamente 70°C.

En un aspecto, la etapa de hibridación y/o captura se completa a aproximadamente 50°C en aproximadamente 15 a aproximadamente 25 minutos; a aproximadamente 50°C en aproximadamente 20 a aproximadamente 25 minutos; o aproximadamente 50°C en aproximadamente 22,5 minutos. En un aspecto, la hibridación/captura se incuba con o sin agitación.

En un aspecto no limitativo, la sonda es capaz de hibridar o unirse a moléculas de ácido nucleico al menos 70%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 98%, al menos 99%, o 100% idéntico a moléculas de ácido nucleico asociadas con *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, HPV, variantes genéticas de HPV, ADN de HPV de un tipo de VPH de alto riesgo, o ARN de VPH de un tipo de VPH de alto riesgo, o cualquiera de los tipos de VPH de alto riesgo 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 y 82 o cualquiera de los tipos de VPH de bajo riesgo 6, 11, 40, 43, 53, 61, 67, 69, 70, 71, 72, 81 y 83. En otro aspecto, la sonda es complementaria a HPV, variantes genéticas de HPV, ADN de HPV de un tipo de HPV de alto riesgo, ARN de VPH de un tipo de VPH de alto riesgo, o cualquiera de los tipos de VPH de alto riesgo 16, 18, 31, 33, 56, 58, 59, 66, 68 y 82 o cualquiera de los tipos de VPH de bajo riesgo 6, 11, 40, 43, 53, 61, 67, 69, 70, 71, 72, 81 y 83.

En un aspecto, se añade a la muestra una sustancia del tipo aceite o aceite, tal como aceite de silicona, antes del calentamiento. En un aspecto, se añade una sustancia de tipo aceite o aceite a la muestra antes del calentamiento y la muestra se examina en una plataforma automatizada, tal como, por ejemplo, las descritas en la Solicitud de EE.UU. No. 12/605.605, Solicitud de Patente de EE.UU. 12/508.304, Solicitud de Patente de EE.UU. No. 12/508.306, y Solicitud de Patente de EE.UU. No. 12/622.131. El aceite puede tener una viscosidad de aproximadamente 0,5 Cst a aproximadamente 20 Cst, de aproximadamente 1,0 Cst a aproximadamente 10 Cst, o de aproximadamente 2,0 Cst a aproximadamente 5 Cst. En un aspecto, el volumen es de aproximadamente 5 Cst. En un aspecto se añaden aproximadamente 10 µl a aproximadamente 45 µl del aceite de silicona anterior a 1 ml o más de medios de recogida y se evalúa en una plataforma automatizada. Una ventaja de añadir aceite es que la muestra se calienta más uniformemente.

En un aspecto, la muestra se suspende en medio de recogida, el ácido nucleico diana se desnaturaliza con un reactivo de desnaturalización y se hibrida con sondas de ácido nucleico suspendidas en un tampón neutralizante. En otro aspecto, el tampón de neutralización es el diluyente de sonda de la presente invención. El diluyente de sonda

puede comprender 2,2 M de BES (ácido N,N-bis(2-hidroxietil)-2-aminoetanosulfónico), 2,6% de ácido poliacrílico, NaOH 0,7 N y azida sódica al 0,05%.

Captura

5 Después de que las sondas se hibriden con la molécula de ácido nucleico diana y formen un híbrido de ácido nucleico bicatenario, el híbrido puede ser capturado por una molécula que sea específica para el híbrido de ácido nucleico bicatenario. Las moléculas específicas para los híbridos de ácido nucleico bicatenarios incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, proteínas tales como, pero sin limitarse a, RNAsa H, ácidos nucleicos incluyendo, pero sin limitarse a, aptámeros o ácidos nucleicos específicos de secuencia. Los aptámeros son tramos cortos de secuencias aleatorias que se seleccionan sucesivamente a partir de una biblioteca de secuencias por hibridación con un blanco, amplificación de los aptámeros hibridados y repetición del proceso de selección. En un aspecto, la molécula específica para el híbrido de ácido nucleico bicatenario es capturada por un anticuerpo, conocido como anticuerpo antihíbrido.

15 En un aspecto, un anticuerpo antihíbrido se inmoviliza sobre un soporte usando técnicas que son estándar en la técnica. Ejemplos de soportes adecuados incluyen enlaces covalentes o adsorción, por ejemplo, interacciones proteína-proteína, perlas de proteína G, interacción biotina-estreptavidina, EDAC para enlazar con un grupo carboxilo o tosilo, etc., o hibridación directamente sobre el soporte sólido usando, por ejemplo, ácidos nucleicos específicos de secuencia en una columna de afinidad.

20 Los soportes incluyen, pero no se limitan a perlas, perlas paramagnéticas, diamagnéticas, ferromagnéticas, ferromagnéticas y diamagnéticas, columnas, placas, papel de filtro, polidimetilsiloxano (PDMS) y varillas de medición. Cualquier soporte puede ser utilizado siempre y cuando permita la extracción de la fase líquida y proporcione la capacidad de separar los anticuerpos unidos y no unidos. Las perlas paramagnéticas son particularmente útiles porque pueden dejarse en la solución y la fase líquida puede extraerse o decantarse, si se aplica un campo magnético para inmovilizar las perlas. Pueden usarse perlas que sean pequeñas y que tengan un área superficial alta, tal como perlas de aproximadamente 1 μm de diámetro. También se pueden usar otras perlas que emplean conmutación de carga o captura de sílice (en oposición a campos magnéticos).

25 Los híbridos pueden incubarse con el anticuerpo antihíbrido unido al soporte durante una cantidad de tiempo suficiente para permitir la captura de los híbridos de ácido nucleico de doble hebra por los anticuerpos antihíbridos inmovilizados. En un aspecto, el soporte es una perla.

30 El anticuerpo antihíbrido puede ser monoclonal o policlonal. En un aspecto, el anticuerpo es monoclonal. En otro aspecto, el anticuerpo se acopla al soporte mediante un enlace de hidrocioruro de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil] carbodiimida (EDAC). En un aspecto, el soporte es una perla de poliestireno. En un aspecto, el soporte o perla acoplada al anticuerpo se diluye en un tampón de dilución de perlas. El tampón de dilución de perlas es útil para minimizar la desnaturalización de proteínas en la perla. Un ejemplo de un tampón de dilución de perlas incluye caseína al 6%, Tris-HCl 100 mM, NaCl 300 mM y azida sódica al 0,05%.

35 En un aspecto, las perlas recubiertas con el anticuerpo antihíbrido se incuban con la muestra a aproximadamente de 45°C a aproximadamente 55°C durante aproximadamente 30 minutos y de aproximadamente 50°C a aproximadamente 60°C durante aproximadamente 30 minutos. En un aspecto, el tiempo de incubación puede oscilar entre aproximadamente 5 minutos y aproximadamente 60 minutos, entre aproximadamente 15 minutos y aproximadamente 45 minutos, entre aproximadamente 20 minutos y aproximadamente 40 minutos, o cualquier número dentro de los intervalos mencionados. En un aspecto, el tiempo de incubación es de aproximadamente 10 minutos, aproximadamente 15 minutos, aproximadamente 20 minutos, aproximadamente 22,5 minutos, aproximadamente 25 minutos, aproximadamente 30 minutos o aproximadamente 45 minutos a entre 45°C y 55°C con o sin agitar. En otro aspecto, la incubación tiene lugar a aproximadamente 22,5 minutos a 5°C sin agitación.

40 Después de la captura del híbrido de ácido nucleico/sonda objetivo tal como se ha descrito anteriormente, el híbrido capturado puede separarse del resto de la muestra por el lavado de los ácidos nucleicos no capturados.

Conjugación

50 En un aspecto, otra etapa en el método de preparación de muestras de gran volumen puede implicar proporcionar un segundo anticuerpo que sea también específico para híbridos de ácidos nucleicos de doble hebra o alternativamente sea específico para el primer anticuerpo. El segundo anticuerpo, si está presente, puede marcarse de forma detectable, directa o indirectamente, y puede ser un anticuerpo monoclonal o policlonal. En un aspecto, el segundo anticuerpo es monoclonal. En otro aspecto, el segundo anticuerpo está marcado directamente con un marcador detectable y es monoclonal. El segundo anticuerpo se utiliza para detectar la presencia de híbridos de ácido nucleico bicatenarios. En un aspecto, el segundo anticuerpo tiene un marcador que debe reaccionar con un sustrato para proporcionar una señal que puede ser detectada. El segundo anticuerpo puede disolverse en un tampón adecuado. En un aspecto, el tampón comprende TrisHCl 100 mM, pH 7,4, NaCl 0,5 M, ZnCl₂ 0,1 mM, MgCl₂ 1,0 mM, Tween 20 a 0,25%, RNasa a 0,2 mg/ml, hidroxipropil-b-ciclodextrina al 4% (ciclodextrina), tampón de dilución de perlas al 30% tal como se discutió anteriormente, 0,05% de IgG de cabra, 0,05% de azida de sodio.

En un aspecto, la reacción de conjugación tiene lugar a temperatura ambiente. En un aspecto, la reacción de conjugación tiene lugar a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 hora y aproximadamente 2 horas. En otro aspecto, la reacción de conjugación tiene lugar a temperatura ambiente durante aproximadamente 2 horas. En otro aspecto, la reacción de conjugación tiene lugar a aproximadamente 37°C, aproximadamente 45°C, o aproximadamente 50°C. En un aspecto, la reacción de conjugación tiene lugar a aproximadamente 37°C, aproximadamente 45°C, o aproximadamente 50°C, de aproximadamente 35°C a aproximadamente 40°C, o de aproximadamente 40°C a aproximadamente 50°C entre aproximadamente 15 minutos y aproximadamente 30 minutos. En un aspecto, la reacción de conjugación tiene lugar a aproximadamente 37°C, aproximadamente 45°C o aproximadamente 50°C entre aproximadamente 20 minutos y 40 minutos. En otro aspecto, la reacción de conjugación tiene lugar a aproximadamente 45°C durante aproximadamente 30 minutos.

Los expertos en la técnica entenderán que puede usarse cualquier marcador detectable tal como, pero no limitado a, una enzima, molécula radiactiva, molécula fluorescente o partícula metálica tal como partícula de oro. En ciertos aspectos, el marcador detectable es fosfatasa alcalina. Se conocen métodos de conjugación de un marcador a un anticuerpo. Por ejemplo, se puede reducir un anticuerpo con ditiotreitól (DTT) para producir fragmentos de anticuerpo monovalentes. El anticuerpo reducido puede ser entonces directamente conjugado a la fosfatasa alcalina maleinizada por los métodos de Ishikawa et al, J. Immunoassay 4: 209-237 (1983) y Means et al, Chem. 1: 2 - 12 (1990), y el conjugado resultante puede purificarse por HPLC. El conjugado también puede purificarse usando cualquier tipo de cromatografía de exclusión por tamaños. Una ventaja de la purificación es que los conjugados de una proteína a un anticuerpo pueden separarse de aquellos conjugados con otras proporciones de proteína a anticuerpo.

En otro aspecto, los híbridos de ácido nucleico bicatenarios pueden detectarse con un segundo anticuerpo antihíbrido que no está marcado directamente. Por ejemplo, el segundo anticuerpo puede ser una inmunoglobulina de ratón que se detecta mediante un anticuerpo anti-ratón de cabra marcado.

Lavado

En un aspecto, después de la hibridación y captura, la muestra puede lavarse con un tampón de lavado. El tampón de lavado puede contener uno o más detergentes o puede estar libre de un detergente. Si el tampón de lavado contiene un detergente, el detergente puede ser un detergente iónico o no iónico. Un ejemplo de un detergente no iónico es Triton-X. El detergente puede estar presente en el tampón de lavado a una concentración de aproximadamente 0,05% a aproximadamente 1,5%, o de aproximadamente 0,075% a aproximadamente 1,0%, o de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 0,75%, o aproximadamente 0,5% o cualquier número dentro de los intervalos mencionados. Un ejemplo de un tampón de lavado adecuado comprende Tris 40 mM, pH 8,2, NaCl 100 mM, Triton-X100 al 0,5% y azida de sodio al 0,05%. En otro aspecto, el tampón de lavado es de aproximadamente 0,5 - 2 mM de Tris, de aproximadamente 0,02 - 0,10% de azida de sodio, con un pH de aproximadamente 7,6 - aproximadamente 8,4. En otro aspecto, el tampón de lavado es aproximadamente Tris 1 mM, aproximadamente 0,09% de azida sódica, con un pH de aproximadamente 7,6 - aproximadamente 8,4.

La muestra puede lavarse con el tampón de lavado de una a diez veces, o de tres a siete veces, o de cuatro a seis veces, o dos, tres, cuatro, cinco veces, o cualquier número dentro de los intervalos mencionados. La muestra también puede lavarse con un solo tampón de lavado o con múltiples tampones de lavado. Cada lavado puede usar el mismo tampón de lavado o un tampón de lavado diferente. Por ejemplo, se puede usar un tampón de lavado que contiene detergente para un lavado mientras que se puede usar un tampón de lavado sin detergente para otro lavado. En un aspecto, uno de los tampones de lavado no incluye Triton.

Un beneficio del tampón de lavado que contiene detergente es los efectos positivos sobre el comportamiento de las perlas cuando se compara con tampones de lavado libres de detergente. El tampón de lavado que contiene detergente permite una unión rápida, eficiente y elástica de las perlas al campo magnético. La unión de las perlas al campo magnético es suficientemente fuerte para que las perlas queden unidas mediante inversión física y decantación. Mientras que los tampones de lavado libres de detergente generalmente no permiten la inversión física sin pérdida de perlas, pueden usarse para otros fines. Un ejemplo del uso de un tampón de lavado sin detergente es retirar o diluir un detergente en la muestra, reduciendo así cualquier problema de detección probable.

Detección

En un aspecto, la molécula de ácido nucleico diana capturada puede identificarse mediante un dispositivo de detección o un método de detección. Cualquier dispositivo de detección capaz de detectar moléculas de ácido nucleico diana puede usarse junto con los métodos de preparación de muestras descritos en la presente memoria. En la técnica se conocen métodos para detectar diversos marcadores. Por ejemplo, métodos de colorimetría, radiación, resonancia de plasmón superficial o quimioluminiscencia se describen, por ejemplo, en Coutlee et al., J. Clin. Microbiol. 27: 1002-1007 (1989).

En un aspecto, la molécula de ácido nucleico diana capturada es amplificada y sometida a PCR. En un aspecto, la PCR se realiza sobre una muestra previamente procesada utilizando la metodología de preparación de muestra

descrita. En otro aspecto más, la PCR se realiza en presencia de perlas, por ejemplo perlas paramagnéticas, después de que la muestra biológica experimente etapas de desnaturalización, hibridación y captura, y lavado.

En un aspecto, el marcador presente en un segundo o tercer anticuerpo o más se detecta para indicar así la presencia de la molécula de ácido nucleico diana. En la técnica se conocen métodos para detectar diversos marcadores. Por ejemplo, se puede detectar un conjugado de fosfatasa alcalina unida mediante quimioluminiscencia con un reactivo tal como un reactivo LUMI-PHOS 530 (Lumigen, Detroit, MI) o DR2 (Applied Biosystems, Foster City, CA) usando un detector tal como un luminómetro E/LUMINA (Source Scientific Systems, Inc., Garden Grove, CA), un Luminómetro OPTOCOMP I (MGM Instruments, Hamden, CT) o similares, tal como un Veritas Microplate Luminometer de Turner Biosystems. Las técnicas de detección múltiple también pueden usarse en secuencia o en paralelo. Por ejemplo, el conjugado puede detectarse por quimioluminiscencia y fluorescencia. En otro aspecto, el conjugado puede ser detectado por quimioluminiscencia.

Los detectores que utilizan diferentes técnicas de detección para el conjugado pueden estar reversible o irreversiblemente unidos, por ejemplo de manera modular, a una máquina que es capaz de realizar el método para determinar la presencia de una molécula de ácido nucleico diana en una muestra.

15 Sondas de polinucleótidos

Las sondas polinucleotídicas están diseñadas para hibridar o unirse con las moléculas de ácido nucleico diana. En un aspecto, las sondas polinucleotídicas están diseñadas para unirse específicamente a moléculas de ácido nucleico diana. En un aspecto, las sondas polinucleotídicas son aproximadamente de 15 bases, aproximadamente 20 bases, aproximadamente 25 bases, aproximadamente 30 bases, aproximadamente 50 bases, aproximadamente 100 bases, aproximadamente 250 bases, aproximadamente 500 bases, aproximadamente 1000 bases de longitud. En otro aspecto, las sondas polinucleotídicas son de aproximadamente 15 bases o más, aproximadamente 20 bases o más, aproximadamente 25 bases o más, aproximadamente 30 bases o más, aproximadamente 50 bases o más, aproximadamente 100 bases o más, aproximadamente 250 bases o más, aproximadamente 500 bases o más, o aproximadamente 1000 bases o más de longitud. En otro aspecto, las sondas polinucleotídicas son de aproximadamente 15 bases a aproximadamente 25 bases, de aproximadamente 25 bases a aproximadamente 50 bases, de aproximadamente 50 a aproximadamente 100 bases, de aproximadamente 250 bases a aproximadamente 500 bases, o de aproximadamente 1000 bases a aproximadamente 5000 bases de longitud.

En un aspecto, las sondas polinucleotídicas son capaces de hibridarse o unirse a *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, VPH, VPH de alto riesgo y variantes de bajo riesgo de VPH. En un aspecto adicional, las sondas polinucleotídicas son específicas para las variantes de alto riesgo de HPV y HPV. Las sondas de ácido nucleico de alto riesgo pueden incluir sondas para los tipos de alto riesgo de VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 y 82. En otros aspectos, las sondas de ARN o ADN son fragmentos. En un aspecto, las sondas tienen de aproximadamente 6 a aproximadamente 8 kilobases de longitud, preferiblemente aproximadamente 7,5 kilobases, y pueden producirse usando un molde de plásmido usando un vector BLUESCRIPT. Sin embargo, otros plásmidos, vectores y métodos son conocidos en la técnica y también podrían usarse para producir las sondas de ARN descritas en la presente memoria.

Las sondas pueden variar en una cantidad de aproximadamente 7,5 ng a aproximadamente 60 ng por tipo de HPV por ensayo, o de aproximadamente 20 ng a aproximadamente 45 ng por tipo de HPV por ensayo, o aproximadamente 30 ng de sonda para cada tipo de HPV por ensayo. Por lo tanto, en un aspecto las sondas de HR consisten en o consisten esencialmente en una o más sondas para tipos de alto riesgo de VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, y 82 o los tipos 6, 11, 40, 43, 53, 61, 67, 69, 70, 71, 72, 81, y 83 del VPH de bajo riesgo, en los que se utilizan aproximadamente 30 ng de cada sonda por ensayo para la detección de la molécula de ácido nucleico diana.

Las sondas de ARN pueden ser sondas cortas de ARN sintético que se unen específicamente sólo a la molécula de ácido nucleico diana. Ejemplos se describen en la Solicitud de Patente de EE.UU. No. 12/426.076, presentada el 17 de abril de 2009.

Reactividad cruzada

La presente descripción también proporciona composiciones de ensayo, sondas y condiciones en las que la reactividad cruzada entre los conjuntos de sondas de HPV HR y los tipos de HPV de bajo riesgo se reduce drásticamente cuando se compara con el ensayo estándar de HPV aprobado por la FDA y el conjunto de sondas. En un aspecto, el conjunto de sondas de HP HRV se selecciona del grupo que consiste en tipos de alto riesgo de HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 y 82 o de VPH de bajo riesgo 6, 11, 40, 43, 53, 61, 67, 69, 70, 71, 72, 81 y 83. Usando el presente ensayo con estas sondas de HPV de HR, se reduce la reactividad cruzada entre los tipos de VPH de bajo riesgo y las sondas de VPH de alto riesgo. Véase, por ejemplo, la Solicitud De Pat. N° 12/426.076.

La presente descripción también proporciona un método para determinar la presencia de una molécula de ácido nucleico diana en una muestra utilizando los métodos de preparación de muestras de gran volumen descritos en aproximadamente 30 minutos o menos, aproximadamente 1 hora o menos, aproximadamente 2 horas o menos,

aproximadamente 2,5 horas o menos, aproximadamente 3 horas o menos, aproximadamente 3,5 horas o menos, aproximadamente 4 horas o menos, aproximadamente 5 horas o menos, aproximadamente 6 horas o menos, aproximadamente 7 horas o menos, aproximadamente 8 horas o menos, aproximadamente 12 horas o menos, aproximadamente 24 horas o menos, en otros aspectos, menos de aproximadamente 3,5 horas para al menos 10 muestras usando los métodos discutidos anteriormente.

La presente descripción también proporciona métodos y ensayos para detectar el cáncer, por ejemplo el cáncer cervical, detectando la presencia de una molécula de ácido nucleico diana, tal como HPV, en una muestra en aproximadamente 2 horas o menos, aproximadamente 2,5 horas o menos, aproximadamente 3 horas o menos, aproximadamente 3,5 horas o menos, aproximadamente 4 horas o menos, aproximadamente 5 horas o menos, aproximadamente 6 horas o menos, aproximadamente 7 horas o menos, aproximadamente 8 horas o menos, aproximadamente 12 horas o menos, aproximadamente 24 horas o menos, en otros aspectos, menos de aproximadamente 3,5 horas para al menos 10 muestras usando los métodos y ensayos discutidos anteriormente.

Los expertos en la técnica entenderán que la presente invención se puede llevar a cabo en un número de plataformas incluyendo, pero sin limitarse a, tubos, varillas de medición, microarrays, microplacas, placas de 384 pocillos, otras placas de microvaloración y sistemas microfluídicos. Los expertos en la técnica entenderán que en el presente, tan pertinente en los países en desarrollo, se pueden utilizar métodos de baja tecnología tales como botellas cuentagotas, bombillas de caucho, pipetas Pasteur o botellas de chorros para pasos que implican el movimiento de líquidos. Estos dispositivos proporcionan volúmenes relativamente precisos dentro de los intervalos aproximados que son necesarios para el ensayo. En un aspecto, los métodos de la descripción no incluyen pipetadores automáticos u otros dispositivos de pipeteo accionados por baterías o energía.

Tiempo de detección y sensibilidad

En un aspecto, la muestra biológica o clínica está presente y es capaz de ser aislada o detectada a una concentración de aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 5, aproximadamente 10, aproximadamente 25, aproximadamente 50, aproximadamente 100, aproximadamente 200, aproximadamente 500, aproximadamente 1.000, aproximadamente 5.000, aproximadamente 10.000, o aproximadamente 20.000, o aproximadamente 100.000 células diana o copias por 1 mL de medio de recogida. En otro aspecto, la muestra biológica o clínica está presente y es capaz de ser aislada o detectada a una concentración de aproximadamente 2 o más, aproximadamente 5 o más, aproximadamente 10 o más, aproximadamente 25 o más, aproximadamente 50 o más, aproximadamente 100 o más, aproximadamente 200 o más, aproximadamente 500 o más, aproximadamente 1.000 o más, aproximadamente 5.000 o más, aproximadamente 10.000 o más, o aproximadamente 20.000 o más, o aproximadamente 100.000 o más células diana o copias por 1 mL. En otro aspecto, la muestra biológica o clínica está presente y es capaz de ser aislada o detectada a una concentración de aproximadamente 2 o menos, aproximadamente 5 o menos, aproximadamente 10 o menos, aproximadamente 25 o menos, aproximadamente 50 o menos, aproximadamente 100 o menos, aproximadamente 200 o menos, aproximadamente 500 o menos, aproximadamente 1.000 o menos, o aproximadamente 5.000 o menos, o aproximadamente 10.000 o menos, o aproximadamente 20.000 o menos, o aproximadamente 100.000 o menos células diana o copias por 1 mL. Cualquier material biológico o clínico, por ejemplo células SiHa, puede estar presente en la concentración anterior.

En un aspecto, los métodos y ensayos de preparación de muestras descritos en este documento son capaces de aislar, identificar o detectar una concentración de aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 5, aproximadamente 10, aproximadamente 25, aproximadamente 50, aproximadamente 100, aproximadamente 200, aproximadamente 500, aproximadamente 1.000, aproximadamente 5.000, aproximadamente 10.000, o aproximadamente 20.000, o aproximadamente 100.000 células diana o copias por 50 μ l o más, aproximadamente 100 μ l o más, aproximadamente 250 μ l o más, 0,5 ml o más, 1 ml o más, 2 ml o más, 5 ml o más, o 10 ml o más de medio de recogida en menos de aproximadamente 5 minutos, menos de aproximadamente 10 minutos, menos de aproximadamente 15 minutos, menos de aproximadamente 20 minutos, menos de aproximadamente 25 minutos, menos de aproximadamente 30 minutos, menos de aproximadamente 45 minutos, menos de aproximadamente 1 hora, menos de aproximadamente 2 horas, menos de aproximadamente 3 horas, menos de aproximadamente 6 horas, menos de aproximadamente 12 horas o menos de aproximadamente 24 horas.

En otro aspecto, los métodos y ensayos de preparación de muestras descritos en este documento son capaces de aislar, identificar o detectar una concentración de aproximadamente 1 o más, aproximadamente 2 o más, aproximadamente 5 o más, aproximadamente 10 o más, aproximadamente 25 o más, aproximadamente 50 o más, aproximadamente 100 o más, aproximadamente 200 o más, aproximadamente 500 o más, aproximadamente 1.000 o más, aproximadamente 5.000 o más, aproximadamente 10.000 o más, o aproximadamente 20.000 o más, o aproximadamente 100.000 o más células diana o copias por 50 μ l o más, aproximadamente 100 μ l o más, aproximadamente 250 μ l o más, 0,5 ml o más, 1 ml o más, 2 ml o más, 5 ml o más, o 10 ml o más de medio de recogida en menos de aproximadamente 5 minutos, menos de aproximadamente 10 minutos, menos de aproximadamente 15 minutos, menos de aproximadamente 20 minutos, menos de aproximadamente 25 minutos, menos de aproximadamente 30 minutos, menos de aproximadamente 45 minutos, menos de aproximadamente 1 hora, menos de aproximadamente 2 horas, menos de aproximadamente 3 horas, menos de aproximadamente 6 horas, menos de aproximadamente 12 horas, o menos de aproximadamente 24 horas.

En otro aspecto, los métodos y ensayos de preparación de muestras descritos en este documento son capaces de aislar, identificar o detectar una concentración de aproximadamente 2 o menos, aproximadamente 5 o menos, aproximadamente 10 o menos, aproximadamente 25 o menos, aproximadamente 50 o menos, aproximadamente 100 o menos, aproximadamente 200 o menos, aproximadamente 500 o menos, aproximadamente 1.000 o menos, aproximadamente 5.000 o menos, aproximadamente 10.000 o menos, o aproximadamente 20.000 o menos, o aproximadamente 100.000 o menos células diana o copias por 50 µl o más, aproximadamente 100 µl o más, aproximadamente 250 µl o más, 0,5 ml o más, 1 ml o más, 2 ml o más, 5 ml o más, o 10 ml o más de medio de recogida en menos de aproximadamente 5 minutos, menos de aproximadamente 10 minutos, menos de aproximadamente 15 minutos, menos de aproximadamente 20 minutos, menos de aproximadamente 25 minutos, menos de aproximadamente 30 minutos, menos de aproximadamente 45 minutos, menos de aproximadamente 1 hora, menos de aproximadamente 2 horas, menos de aproximadamente 3 horas, menos de aproximadamente 6 horas, menos de aproximadamente 12 horas, o menos de aproximadamente 24 horas.

En un aspecto, se pueden aislar, identificar o detectar aproximadamente 10 copias o menos de una molécula de ácido nucleico diana mediante los métodos descritos en la presente memoria en un volumen de aproximadamente 1 ml a aproximadamente 20 ml de medio de recogida en un periodo de tiempo de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 3 horas. En otro aspecto, se pueden detectar aproximadamente 10 copias o menos de una molécula de ácido nucleico diana mediante los métodos descritos en la presente memoria en un volumen de aproximadamente 1 ml o más de medio de recogida en un periodo de tiempo de aproximadamente 5 minutos, 10 minutos, 15 minutos, aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 45 minutos, aproximadamente 1 hora, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 5 horas, aproximadamente 10 horas, o aproximadamente 24 horas. En otros aspectos, aproximadamente 2 o menos, aproximadamente 5 o menos, aproximadamente 10 o menos, aproximadamente 25 o menos, aproximadamente 50 o menos, aproximadamente 100 o menos, aproximadamente 200 o menos, aproximadamente 500 o menos, aproximadamente 1.000 o menos, aproximadamente 5.000 o menos, aproximadamente 10.000 o menos, o aproximadamente 20.000 o menos, o aproximadamente 100.000 o menos de una molécula de ácido nucleico diana pueden ser detectados por los métodos descritos en este documento en un volumen de aproximadamente 1 ml o más de medios de recogida en un periodo de tiempo de aproximadamente 5 a aproximadamente 15 minutos, de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 minutos, de 30 minutos a aproximadamente 1 hora, de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 2 horas, de aproximadamente 2 horas a aproximadamente 4 horas y de aproximadamente 4 horas a aproximadamente 8 horas. En un aspecto, la molécula de ácido nucleico diana es capaz de unirse o hibridarse a al menos una sonda de HPV seleccionada del grupo que consiste en tipos de alto riesgo de HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 y 82 o tipos de VPH de bajo riesgo 6, 11, 40, 43, 53, 61, 67, 69, 70, 71, 72, 81 y 83. En otro aspecto, la molécula de ácido nucleico diana es capaz de unirse o hibridarse a sondas específicas de dianas de Neisseria gonorrhoeae o Chlamydia trachomatis.

En un aspecto, se puede procesar una muestra clínica o biológica con las sensibilidades de detección anteriores utilizando la metodología de preparación de muestra descrita junto con un ensayo o instrumento semiautomatizado o totalmente automatizado. Por ejemplo, se puede procesar una muestra clínica o biológica utilizando la metodología de preparación de muestras de gran volumen descrita en conjunción con los ensayos, métodos e instrumentos expuestos en la Solicitud de Patente de Estados Unidos No. 12/508.304, Solicitud de Patente de Estados Unidos No. 12/508.306, y la Solicitud de Patente de Estados Unidos No. 12/622.131.

En otro aspecto, los métodos de preparación de muestras de gran volumen específicos de secuencia descritos en este documento son capaces de identificar moléculas de ácido nucleico diana con una sensibilidad de 15.000 copias en un volumen de 1 ml o más de medios de recogida en menos de 3 horas. Además, en otro aspecto, se detecta una sensibilidad de 100 copias de la diana de HPV16 con un volumen de entrada de 2 ml o más de medios de recogida mediante captura híbrida combinada con amplificación de genoma entero (WGA).

En un aspecto, los métodos de descripción pueden incluir la recogida y el procesamiento de muestras de pacientes en el campo. En un aspecto, después de que se recojan las muestras, se llevan a cabo algunas de las etapas del método en el mismo lugar donde se recojan las muestras de pacientes. En otro aspecto, todos los pasos del método pueden llevarse a cabo en el mismo lugar donde se recojan las muestras. La ubicación puede ser una aldea, clínica, laboratorio, o área comunal donde las personas reciban chequeos médicos y evaluaciones. La ubicación puede ser permanente o temporal. En un aspecto, la molécula de ácido nucleico se detecta en un lugar, tal como un laboratorio o clínica, que es diferente del lugar donde se toman las muestras. En un aspecto, se diseña un kit para su uso en un país en desarrollo o áreas geográficas donde el acceso a la atención médica no esté disponible.

La velocidad de los métodos de preparación y detección de muestras de gran volumen descritos en la presente memoria también es beneficiosa para diagnosticar y seleccionar con rapidez y precisión muestras biológicas o clínicas de pacientes en áreas de vida remotas. A menudo, los pacientes viajarán bastante lejos para visitar al médico o la clínica y probablemente no regresarán hasta algún tiempo después. Por lo tanto, es deseable ser capaz de someter a análisis al paciente y proporcionar los resultados mientras el paciente espera en la clínica. En algunas circunstancias, puede ser difícil contactar con el paciente para proporcionar resultados de la prueba y/o tratar al paciente después de haber salido del consultorio del médico.

Los métodos y ensayos de la descripción se refieren a la necesidad de un método para preparar rápidamente muestras de gran volumen y detectar moléculas de ácido nucleico diana. Los ensayos descritos proporcionan resultados identificando una molécula de ácido nucleico diana durante un tiempo corto, por ejemplo, de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 1 hora, de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 2 horas, de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 2 horas, de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 3 horas, o de aproximadamente 2 horas a aproximadamente 4 horas. En otro aspecto, los métodos y ensayos descritos proporcionan resultados en menos de 15 minutos, menos de 30 minutos, menos de aproximadamente 45 minutos, menos de 1,0 horas, menos de 2 horas, menos de 3 horas, menos de 4 horas, menos de 8 horas, menos de 12 horas y menos de 24 horas. Un tiempo de respuesta tan corto permite al médico proporcionar al paciente los resultados y/o el tratamiento el mismo día que el paciente se encuentra en la clínica.

Kit/Ensayo diagnóstico

También se proporciona un kit de preparación de muestras de gran volumen o un ensayo diagnóstico que comprende, que consiste en, o que consiste esencialmente en:

- A. medio de recogida;
- 15 B. reactivo de desnaturalización;
- C. tampón de lisis;
- D. al menos una sonda polinucleotídica;
- E. una perla recubierta con un anticuerpo; y
- F. tampón de lavado.

20 También se proporciona un kit de preparación de muestras de gran volumen o un ensayo diagnóstico que comprende, consiste en, o consiste esencialmente en:

- A. medio de recogida;
- B. reactivo de desnaturalización;
- C. tampón de lisis;
- 25 D. tampón de lavado;
- E. software informático para generar una sonda polinucleotídica capaz de hibridarse con/capturar una molécula de ácido nucleico diana de interés.

En un aspecto, el kit o ensayo diagnóstico también puede incluir un tampón de resuspensión.

30 En un aspecto, cuando la muestra a evaluar es un fluido corporal, tal como sangre, orina o suero, puede estar ausente un medio de recolección del kit o del ensayo diagnóstico.

En un aspecto, el kit o ensayo diagnóstico está configurado para una preparación de muestras de gran volumen. En un aspecto, el kit o ensayo diagnóstico está configurado para la preparación de muestras de aproximadamente 50 µl o más, aproximadamente 100 µl o más, aproximadamente 250 µl, aproximadamente 0,5 ml o más, aproximadamente 0,75 ml o más, aproximadamente 1,0 ml o más, aproximadamente 1,25 ml o más, aproximadamente 1,5 ml o más, aproximadamente 2,0 ml o más, aproximadamente 2,5 ml o más, aproximadamente 3,0 ml o más, aproximadamente 5,0 ml o más, aproximadamente 10 ml o más, aproximadamente 15 ml o más, aproximadamente 25 ml o más, aproximadamente 30 ml o más, aproximadamente 50 ml o más, o aproximadamente 100 ml o más de cualquiera de los medios de recogida anteriores. En un aspecto, el kit o ensayo diagnóstico, cuando se usa en un método de preparación de muestras para detectar una molécula de ácido nucleico diana, proporciona instrucciones de ensayo detalladas con respecto al aislamiento, identificación o detección de una concentración de aproximadamente 2 o menos, aproximadamente 5 o menos, aproximadamente 10 o menos, aproximadamente 25 o menos, aproximadamente 50 o menos, aproximadamente 100 o menos, aproximadamente 200 o menos, aproximadamente 500 o menos, aproximadamente 1.000 o menos, aproximadamente 5.000 o menos, aproximadamente 10.000 o menos, o aproximadamente 20.000 o menos, o aproximadamente 100.000 o menos células diana o copias por 50 µl o más, aproximadamente 100 µl o más, aproximadamente 250 µl o más, 0,5 ml o más, 1 ml o más, 2 ml o más, 5 ml o más, o 10 ml o más del medio de recogida en menos de aproximadamente 5 minutos, menos de aproximadamente 10 minutos, menos de aproximadamente 15 minutos, menos de aproximadamente 20 minutos, menos de aproximadamente 25 minutos, menos de aproximadamente 30 minutos, menos de aproximadamente 45 minutos, menos de aproximadamente 1 hora, menos de aproximadamente 2 horas, menos de aproximadamente 3 horas, menos de aproximadamente 6 horas, menos de aproximadamente 12 horas, o menos de aproximadamente 24 horas. En un aspecto, sin ser limitados, las instrucciones detalladas son las encontradas en los protocolos de ejemplo en las figuras 9 y 10.

En un aspecto, pueden incluirse con el kit tubos de plástico, por ejemplo, tubos Eppendorf, tubos con tapa a presión o cualesquiera otros tubos capaces de contener los anteriores volúmenes de líquidos.

5 En otro aspecto, el kit o ensayo diagnóstico, cuando se usa en un método de preparación de muestras para detectar una molécula de ácido nucleico diana, proporciona instrucciones de ensayo detalladas con respecto a las condiciones necesarias para aislar, identificar o detectar una concentración. 10 copias o más de la molécula de ácido diana se aíslan en menos de aproximadamente 15 minutos, menos de aproximadamente 30 minutos, menos de aproximadamente 45 minutos o menos de aproximadamente 1 hora. En otro aspecto, se detectan 50 copias o menos de una molécula de ácido nucleico diana durante un periodo de tiempo de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 1 hora.

10 Sin ser limitado, las instrucciones que acompañan al kit pueden ser de papel, un software de una computadora o un enlace a un sitio web para cargar las instrucciones.

En un aspecto, las instrucciones indican que no se utiliza ninguna etapa de centrifugación durante la preparación de la muestra. En otro aspecto, las instrucciones indican que la muestra puede amplificarse por PCR después de la etapa de lavado con las perlas presentes.

15 En un aspecto, el kit o ensayo diagnóstico puede incluir instrucciones que detallan, por ejemplo, los protocolos expuestos en las figuras 9 y 10. En un aspecto, las instrucciones incluidas con el kit, cuando se siguen, dan como resultado la sensibilidad y el tiempo de finalización anteriores para las copias detectadas/volumen de solución/tiempo.

20 En otro aspecto, el kit o el ensayo diagnóstico pueden usarse junto con los ensayos, métodos e instrumentos expuestos en la Solicitud de Patente de EE.UU. No. 12/508.304, Solicitud de Patente de EE.UU. No. 12/508.306, y en la Solicitud de Patente de EE.UU. No. 12/622.131.

25 En otro aspecto, las instrucciones que acompañan al kit proporcionan orientación sobre el uso de los métodos de preparación de muestra descritos junto con una plataforma automatizada o semiautomática. En un aspecto adicional, el kit o ensayo diagnóstico puede incluir tubos, puntas de pipeta, placas de microtitulación o cualquier otro mecanismo para practicar los métodos de preparación de muestras descritos en el presente documento con las citadas referencias automatizadas de la plataforma.

Se puede usar cualquiera de los medios de recogida, reactivo de desnaturalización, tampón de lisis, al menos una sonda polinucleotídica, perla y tampón de lavado descritos anteriormente o pueden acompañar al kit o ensayo diagnóstico.

30 El kit también puede incluir cualquier instrucción para describir los procedimientos asociados con los métodos y ensayos descritos. El kit también puede incluir un medio para transcribir la información del paciente. En un aspecto, los medios incluyen papel, un ordenador o un dispositivo capaz de transmitir información del paciente. El kit puede incluir todos los componentes necesarios para completar los métodos en el mismo lugar donde se toma la muestra del paciente.

35 En un aspecto, el kit puede incluir reactivos codificados por color asociados con el ensayo de detección. Los frascos de reactivo están codificados por colores para facilitar su uso y se pueden incluir en un kit. Los frascos de reactivo también se pueden identificar mediante símbolos, letras u otros identificadores conocidos.

40 Como los componentes individuales del kit pueden reunirse en una plataforma fácil de usar, una ventaja del kit descrito en este documento es que proporciona pruebas inmediatas de muestras. Esto permite una rápida determinación de los resultados de los pacientes.

45 En un aspecto, los métodos de la descripción pueden incluir la recogida y el procesamiento de muestras de pacientes en el campo. En un aspecto, después de que se recojan las muestras, se llevan a cabo algunas de las etapas del método en el mismo lugar donde se recogen las muestras de pacientes. En otro aspecto, todos los pasos del método pueden llevarse a cabo en el mismo lugar donde se recogen las muestras. La ubicación puede ser una aldea, clínica, laboratorio, o área comunal donde las personas reciben chequeos médicos y evaluaciones. La ubicación puede ser permanente o temporal. En un aspecto, la molécula de ácido nucleico se detecta en un lugar, tal como un laboratorio o clínica, que es diferente del lugar donde se toman las muestras. En un aspecto, el kit está diseñado para su uso en un país en desarrollo o áreas geográficas donde el acceso a la atención médica no está fácilmente disponible.

50 Los siguientes ejemplos son sólo ilustrativos y no pretenden limitar la descripción de ninguna manera.

Ejemplos

Ejemplo 1:

La concentración de perlas se prueba a 0,04% en 25 µl de bloqueador YT en 1 ml de medio de recogida PRESERVCYT limpio. La reacción tiene lugar en 1 mL de PRESERVCYT limpio con 250 µl de tampón de lisis, 500

ES 2 644 516 T3

5 μ l de tampón de desnaturalización, 800 μ l de sonda en un diluyente de sonda y con 2 nM de synRNA. La reacción de hibridación tiene lugar durante 30 minutos a temperatura ambiente. La concentración de perlas se ensayó a partir de 0,5, 1,0, 1,5 y 2,0 veces de perlas al 0,04% en 25 μ l de YT. Como se expone en la Figura 1, el fondo depende de la concentración de las perlas. Por otra parte, el aumento de la concentración de las perlas disminuye la señal del fondo, así como la señal en bruto, beneficiando así la relación señal/ruido (S/N).

Ejemplo 2

10 Preparación de muestras a gran volumen de captura del híbrido con 30 minutos y 60 minutos de incubación a temperatura ambiente. La concentración de perlas ensayada es de 0,04% en 25 μ l de YT. 1 mL de medio de recogida PRESERVCYT limpio así como clínico se prueba con 0, 10, 25 y 100 copias del ADN genómico de *Neisseria gonorrhoeae*. La reacción tiene lugar en 1 mL de medio PRESERVCYT limpio o clínico con 250 μ l de tampón de lisis, 500 μ l de tampón de desnaturalización, 800 μ l de sonda en el diluyente de la sonda y con 2 nM de synRNA. Como se expone en la Figura 2, el aumento del tiempo de captura híbrido a 60 minutos no beneficia significativamente la captura de la diana. Por ejemplo, a 10 copias, hay menos fallos con la captura híbrida de 60 min; sin embargo, no se ve claro ningún beneficio a 100 o 1000 copias. La señal bruta a 100 y 1000 copias es mayor con una incubación más corta, con antecedentes comparables. Esto se aplica tanto en los sistemas de fondo limpios como clínicos.

Ejemplo 3

20 La preparación de la muestra de captura híbrida a temperatura ambiente y la incubación con 50°C se investiga en 1 mL de medio de recogida PRESERVCYT limpio así como clínico con 0, 10, 25 y 100 copias de ADN genómico de *Neisseria gonorrhoeae*. La concentración de perlas ensayada es de 0,04% en 25 μ l de YT. La reacción tiene lugar en 1 mL de PRESERVCYT limpio con 250 μ l de tampón de lisis, 500 μ l de tampón de desnaturalización, 800 μ l de sonda en diluyentes de sonda y con 2 nM de synRNA. La reacción de hibridación tiene lugar durante un periodo de tiempo de 30 minutos. Como se expone en la Figura 3 y la Tabla 1, parece que no hay diferencia significativa en la señal para medios de PRESERVCYT limpios versus medios clínicos por encima de 10 copias. Se observa un gran grado de variabilidad a 10 copias, sin embargo, todas las muestras en medio limpio a 10 copias parecen ser detectadas. Tampoco parece haber ninguna diferencia significativa en la detección a 5°C a la temperatura ambiente.

Tabla 1

	Nº de control de preparación de muestra		Preparación de muestra de gran volumen							
			H/C T 50°C				H/C T RmTmp			
			PC limpio		PC limpio		PC limpio		PC limpio	
	Opa	CTs	opa	CTs	opa	CTs	opa	CTs	opa	CTs
0 copias	22	89	13	106	16	102	12	78	5	77
	10	83	7	85	25	88	7	70	6	66
	15	89	17	91	19	92	23	85	26	80
Promedio	16	87	12	94	20	94	14	78	12	74
%CV	38	4	41	12	23	8	58	10	96	10
S/N	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
10 Copias	30	119	101	101	268	95	364	79	33	92
	186	104	503	142	26	100	411	79	503	89
	57	104	337	89	399	93	33	87	560	83
Promedio	91	109	314	111	231	96	269	82	365	88
%CV	92	8	64	25	82	4	76	6	79	5
S/N	5,8	1,3	25,4	1,2	11,6	1,0	19,2	1,1	29,6	1,2
100 Copias	300	795	366	83	346	79	354	69	22	85
	165	87	334	80	297	72	286	68	377	72

ES 2 644 516 T3

	94	502	312	86	325	78	294	71	266	77
Promedio	186	461	337	83	323	76	311	69	222	78
%CV	56	77	8	4	8	5	12	2	82	8
S/N	11,9	5,3	27,4	0,9	16,1	0,8	22,2	0,9	18,0	1,0
1000 Copias	397	110	371	95	392	87	263	62	255	59
	399	114	442	96	455	95	255	62	229	54
	399	1098	368	107	438	110	319	79	154	63
Promedio	398	441	394	99	428	97	279	68	213	59
%CV	0	129	11	7	8	12	12	15	25	8
S/N	25,4	5,1	31,9	1,1	21,4	1,0	19,9	0,9	17,2	0,8

Ejemplo 4

5 Preparación de muestras de gran volumen de captura de híbridos en 1 ml de medio a base de orina, en comparación con 1 ml de medio PRESERVCYT con la detección de 0, 10, 25, 100, 1000 y 10.000 copias de ADN genómico de *Neisseria gonorrhoeae*. La concentración de perlas ensayada es de 0,04% en 25 µl de YT con 250 µl de tampón de lisis, 500 µl de tampón de desnaturalización, 800 µl de sonda en diluyentes de sonda y 2 nM de synRNA. La reacción de híbrido/captura tiene lugar durante un periodo de tiempo de 30 minutos.

10 Como se expone en la Figura 4 y la Tabla 2, se realizó una prueba de compatibilidad de la captura de synRNA en 1 ml de orina (a pH 6,5). Sólo se observan dos fallos para los medios basados en la orina (uno a 100 copias y uno a 10 copias, comparado con 2 a 10 copias y 2 a 25 copias para el control PRESERVCYT). No se observan efectos de gancho significativos hasta 10.000 copias. El fondo en la orina también es bastante bajo, lo que resulta en valores relativamente altos de S/N.

Tabla 2:

opaDv/omp/F9R6/250 copias IC-omp-2MM Todos los cebadores 40/120 nM Todas las sondas 60 nM									
	No prep			Prep. muestra LV-HC					
				PC limpio			Orina		
	IC	opaDv	CTs	IC	opaDv	CTs	IC	opaDv	CTs
0 Copias	1605	81	380	1017	49	135	776	35	99
	1284	50	138	859	35	102	700	23	93
	1164	50	120	793	70	152	414	33	134
	1248	74	481	1020	48	150	963	45	126
Promedio	1325	64	280	922	51	135	713	34	113
%CV	15	25	64	12	29	17	32	27	18
S/N	7,0	1,0	1,0	4,9	1,0	1,0	3,8	1,0	1,0
10 Copias	1204	797	481	1085	50	158	769	755	457
	1093	751	336	960	807	166	865	742	116
	855	1048	171	930	48	127	912	45	111
	1170	751	133	566	697	77	773	752	95

ES 2 644 516 T3

Promedio	1081	837	280	885	401	132	830	574	195
%CV	15	17	57	25	102	31	8	61	90
S/N	5,7	13,1	1,0	4,7	7,9	1,0	4,4	16,9	1,7
25 Copias	295	982	323	811	42	86	759	735	99
	1299	802	185	588	381	74	546	654	72
	1266	1011	432	846	34	83	734	552	71
	1225	1160	412	673	496	341	753	620	71
Promedio	1021	989	338	730	238	146	698	640	78
%CV	48	15	33	16	99	89	15	12	18
S/N	5,4	15,5	1,2	3,9	4,7	1,1	3,7	18,8	0,7
100 Copias	317	997	244	567	861	105	683	70	89
	521	980	374	751	641	87	288	621	78
	770	1028	336	754	908	171	572	706	99
	621	1123	259	883	862	157	712	776	118
Promedio	557	1032	303	739	818	130	564	543	96
%CV	34	6	20	18	15	31	34	59	18
S/N	3,0	16,2	1,1	3,9	16,2	1,0	3,0	16,0	0,8
1.000 Copias	580	1033	661	567	972	159	639	838	129
	341	973	499	128	422	178	382	784	116
	226	827	383	431	815	112	331	747	94
	301	678	398	551	751	111	437	703	90
Promedio	362	878	485	419	740	140	447	768	107
%CV	42	18	26	49	31	24	30	7	17
S/N	1,9	13,8	1,7	2,2	14,7	1,0	2,4	22,6	0,9
10.000 Copias	166	805	737	310	695	77	452	807	97
	148	871	827	216	574	67	303	729	97
	263	919	902	263	584	87	436	744	184
	287	989	823	336	652	63	420	804	96
Promedio	216	896	822	281	626	74	403	771	119
%CV	32	9	8	19	9	15	17	5	37
S/N	1,1	14,1	2,9	1,5	12,4	0,5	2,1	22,7	1,0

Ejemplo 5

Se evalúa un intervalo de concentración de ARN en 1 ml de medio de recolección de PRESERVICYT limpio junto con 10.000 copias de ADN genómico de *Neisseria gonorrhoeae*. Las concentraciones de ARN de 0,672 nM, 1,344 nM y 2,688 nM se ensayan en la Tabla 3. Como se expone en la Tabla 3, no parece haber ninguna diferencia significativa

5

en la señal cruda o en S/N para concentraciones de ARN de 0,672 nM, 1,344 nM y 2,688 nM utilizando la plataforma de gran volumen. La relación señal/ruido (S/N) permanece en aproximadamente 2.

Tabla 3:

ARN conc.	Diana	RLU			RLU promedio	S/N	S-N	(S-N)/N	Desv. est.	%CV
0,672 nM	0 c	363	183	141	229	1,0	0	0,0	118	51%
	10.000 c	217	1147	263	542	2,4	313	1,4	524	97%
1,344 nM	0 c	393	153	131	226	1,0	0	0,0	145	64%
	10.000 c	301	749	415	488	2,2	263	1,2	233	48%
2,688 nM	0 c	129	163	155	149	1,0	0	0,0	18	12%
	10.000 c	351	383	307	347	2,3	198	1,3	38	11%
DR-1		119	167	109	132					

5 Ejemplo 6

La eficacia de un tampón de lisis que contiene Sarkosyl, DTT y Tween 20 se compara con el tampón de lisis de Maas-Dalhoff (publicado en J.Clin. Microbiol 1994). El tampón de lisis de Maas-Dalhoff contiene Tris-HCl, SDS, Tween 20, NP-40, y Proteinasa K. La etapa de lisis/desnaturalización tiene lugar a 50°C con desnaturalización y un tampón de lisis durante 30 minutos. No hay agitación presente durante la etapa de desnaturalización. La etapa de captura híbrida tiene lugar a aproximadamente 50°C durante aproximadamente 30 minutos con agitación a 900 rpm. El paso de captura híbrido es la captura monoplex usando sondas de synRNA de 500 pares de bases a una concentración de 2,0 nM con perlas de 0,00039%. El experimento se realiza con el modelo de tHDA monoplex, utilizando ya sea CT genómico con los cebadores Omp7 y la sonda omp_TYE, o NG genómico con cebadores OpaDv y la sonda OpaDbI_Tye. Tal como se expone en la Figura 5, usando EBs de CT para la diana, el tampón de lisis que contiene Sarkosyl, DTT y Tween 20 exhibe una relación S/N mayor que los experimentos realizados con tampón de lisis de Maas-Dalhoff.

Ejemplo 7

Se evalúa un tampón de lisis que contiene Sarkosyl, DTT y Tween 20 en una plataforma de gran volumen a lo largo de 15 minutos y 30 minutos de tiempos de incubación a 50°C. No hay agitación presente durante la etapa de desnaturalización/lisis. La etapa de captura híbrida tiene lugar a 50°C durante 30 minutos con agitación a 900 rpm. La etapa de captura híbrido es la captura monoplex usando sondas de synRNA de 500 pares de bases a una concentración de 2,0 nM con perlas de 0,00039%. El experimento se realiza con el modelo de tHDA monoplex utilizando Chlamydia trachomatis genómica con los cebadores Omp7 y la sonda omp_TYE, o Neisseria gonorrhoeae genómico con los cebadores OpaDv y la sonda OpaDbI_Tye. Como se expone en la Figura 6, se evaluó la etapa de lisis/desnaturización con EB de Chlamydia trachomatis como diana a los 15 minutos y 30 minutos. Como se muestra en la Figura 7, se evaluó la etapa de lisis/desnaturización con células NG como diana a los 15 minutos y 30 minutos. El tampón de lisis que contiene Sarkosyl, DTT y Tween 20 exhibe una relación S/N mayor que los experimentos realizados con el Tampón de lisis de Maas-Dalhoff. La disminución del tiempo de desnaturalización/lisis no tiene un impacto negativo sobre S/N. Se observó un fallo con una entrada de 25 EB para la lisis de 15 y 30 minutos.

Bajo las condiciones anteriores, la etapa de híbrido/captura se evalúa a los 15 minutos y 30 minutos. Como se expone en la Figura 8, la disminución del tiempo de hibridación/captura no tiene un impacto negativo sobre la relación señal a ruido. La disminución general en S/N es causada por un ligero aumento en el fondo a los 30 minutos de híbrido/captura. La señal sin procesar para las entradas de 25 y 100 celdas es comparable.

35

REIVINDICACIONES

1. Un método para aislar una molécula de ácido nucleico diana a partir de una muestra de gran volumen, comprendiendo el método:
- (a) suspender una muestra biológica en 1 ml o más de un medio de recogida;
 - 5 (b) desnaturalizar y lisar la muestra biológica añadiendo un agente de desnaturalización y tampón de lisis a la muestra biológica suspendida;
 - (c) hibridar una molécula de ácido nucleico diana con al menos una sonda polinucleotídica;
 - (d) capturar la molécula de ácido nucleico diana hibridada sobre un soporte;
 - 10 (e) lavar el soporte híbrido capturado con tampón de lavado para separar la molécula de ácido nucleico diana hibridada capturada en el soporte de la muestra, aislando de este modo la molécula de ácido nucleico diana; y
 - (f) resuspender el soporte híbrido capturado lavado en un tampón de resuspensión,
- en el que dicho método no incluye una etapa de centrifugación, la muestra de gran volumen es de 0,5 ml o más, la etapa de desnaturalización y lisis (b) se completa en menos de 10 minutos y la combinación de la etapa de hibridación (c) y la etapa de captura (d) se completa en menos de 25 minutos y se aíslan 10 copias o más de la molécula de ácido nucleico diana si están presentes en la muestra en menos de 1 hora.
- 15
2. El método de la reivindicación 1, que tiene una de las características siguientes:
- a) se aíslan 10 copias o más de la molécula de ácido nucleico diana en menos de 30 minutos;
 - b) se aíslan 10 copias o más de la molécula de ácido nucleico diana en menos de 15 minutos;
 - 20 c) en el que dicha etapa de desnaturalización y lisis (b) está completa en menos de 7,5 minutos y la combinación de la etapa de hibridación (c) y la etapa de captura (d) ha terminado en menos de 22,5 minutos; o
 - d) dicha etapa de desnaturalización y lisis (b) ha terminado en menos de 5 minutos y la combinación de la etapa de hibridación (c) y la etapa de captura (d) ha terminado en menos de 15 minutos.
3. El método de la reivindicación 1, que tiene una de las características siguientes:
- 25 a) dichos medios de recogida comprenden de 0,5% a 2,0% de NP - 40, de 0,10% a 0,40% de desoxicolato de sodio, de 25 mM a 75 mM de Tris - HCl, de 10 mM a 50 mM de EDTA, de 50 mM a 200 mM de NaCl y de 0,01% a 0,10% de azida sódica; o
 - b) dichos medios de recogida se seleccionan del grupo constituido por PRESERVCYT, STM y SUREPATH.
4. El método de la reivindicación 1, en el que la etapa (e) comprende permitir que el complejo híbrido-soporte capturado forme un gránulo y el lavado del soporte híbrido capturado con tampón de lavado.
- 30
5. El método de la reivindicación 1, en el que las etapas del método (a) - (e) se completan en 20 minutos a 40 minutos.
6. El método de la reivindicación 1, que tiene una de las siguientes características:
- a) la molécula de ácido nucleico diana está presente en el medio de recogida a una concentración inferior a 1 pg/ml, inferior a 0,75 pg/ml, inferior a 0,5 pg/ml, inferior a 0,25 pg/ml o inferior a 0,2 pg/ml, o
 - 35 b) el ácido nucleico diana está presente en el medio de recogida a una concentración de 10.000 copias/ml o menos, 1.000 copias/ml o menos, 100 copias/ml o menos o 10 copias/ml o menos.
7. El método de la reivindicación 1, en el que la muestra biológica es una célula cervical.
8. El método de la reivindicación 1, en el que la molécula de ácido nucleico diana es de *C. trachomatis* o la molécula de ácido nucleico diana es de *N. gonorrhoeae*.
- 40
9. Un método para aislar y detectar la presencia de una molécula de ácido nucleico diana a partir de un gran volumen de muestra, comprendiendo el método:
- (a) aislar la molécula de ácido nucleico diana con un método según la reivindicación 1; y
 - (b) realizar una PCR sobre la molécula de ácido nucleico diana aislada.

Figura 1:

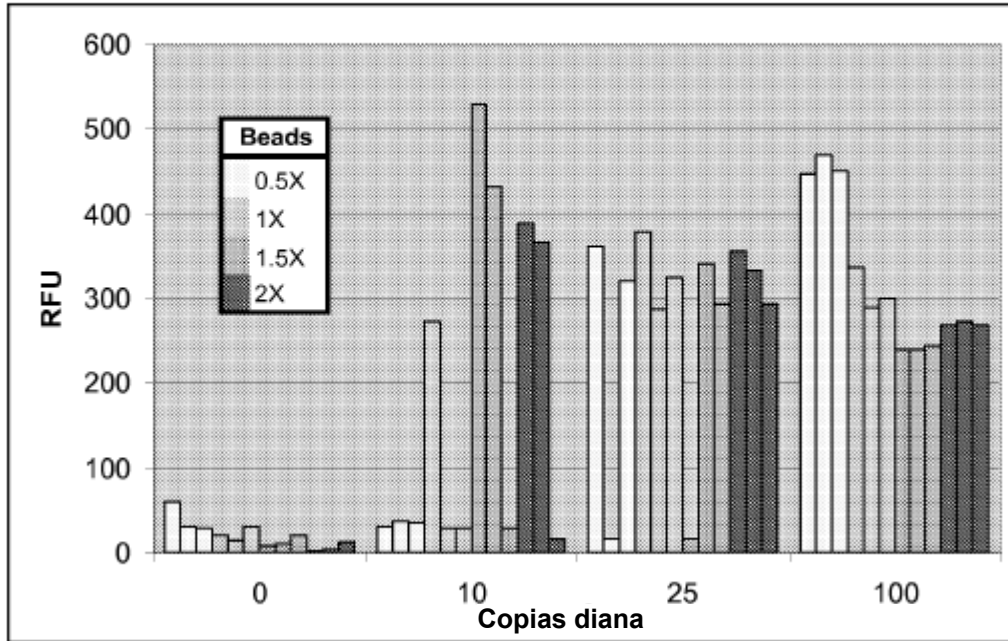


Figura 2:

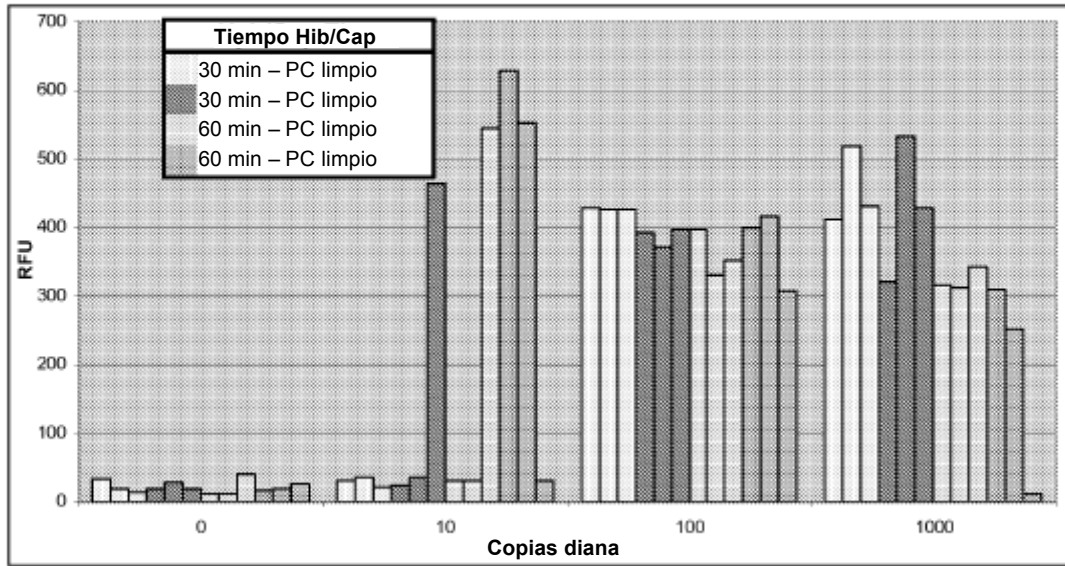


Figura 3:

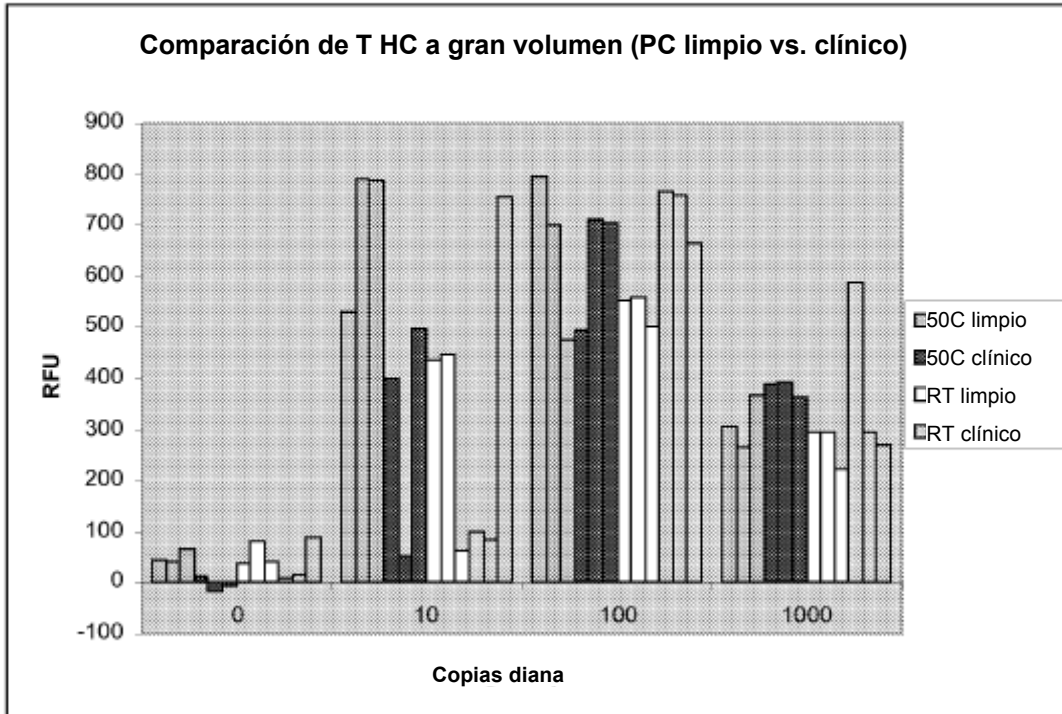


Figura 4:

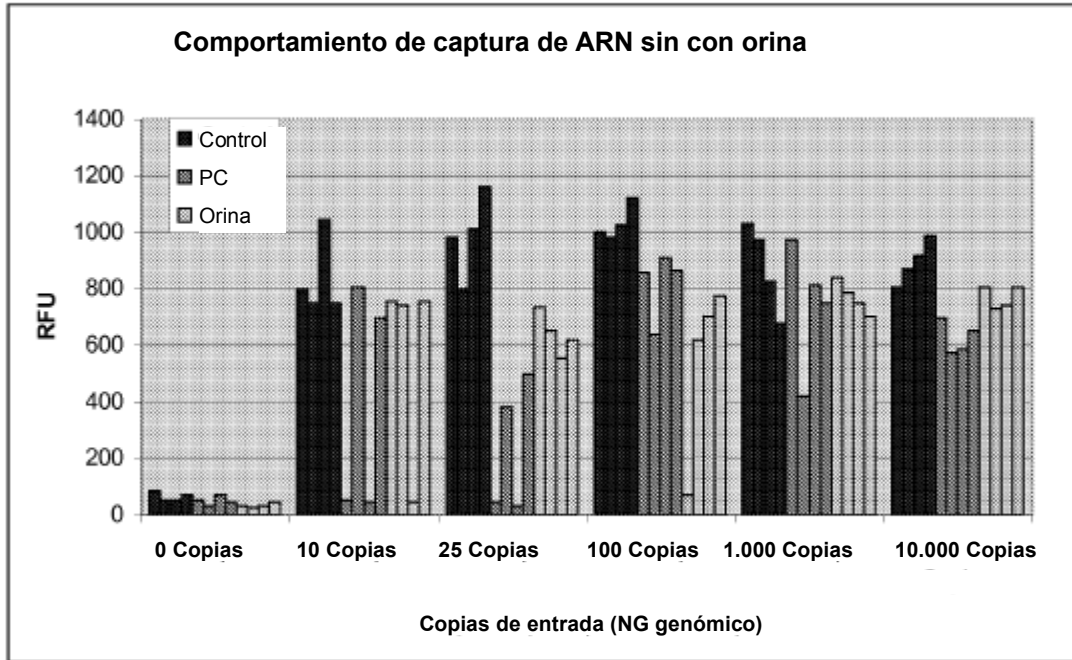


Figura 5:

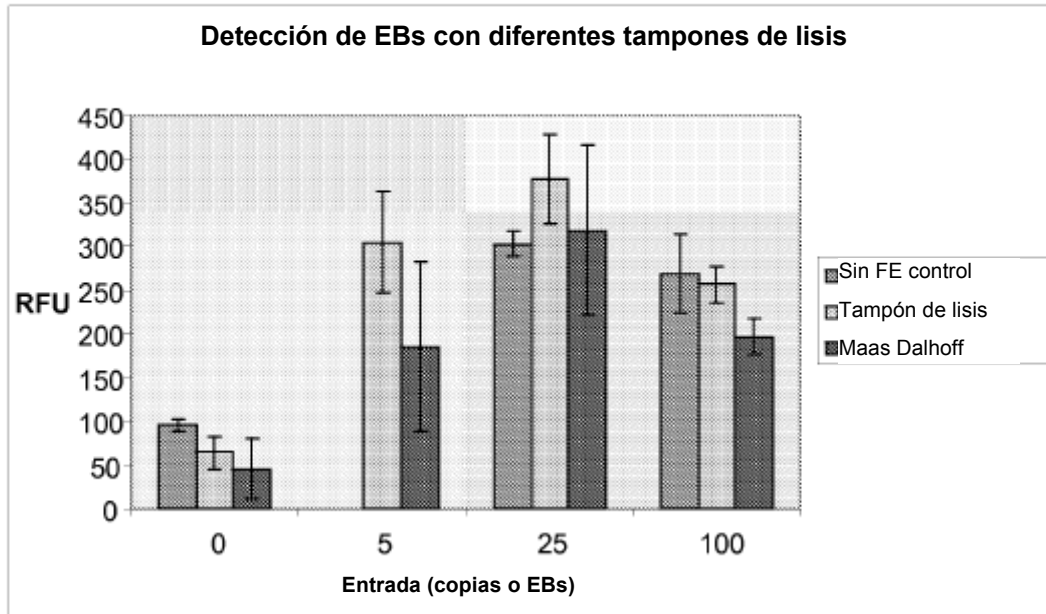


Figura 6:

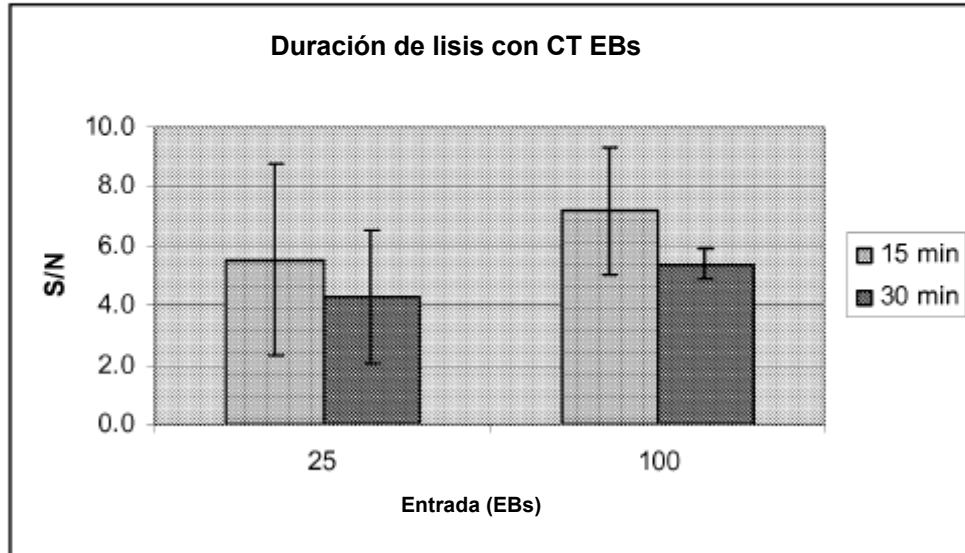


Figura 7:

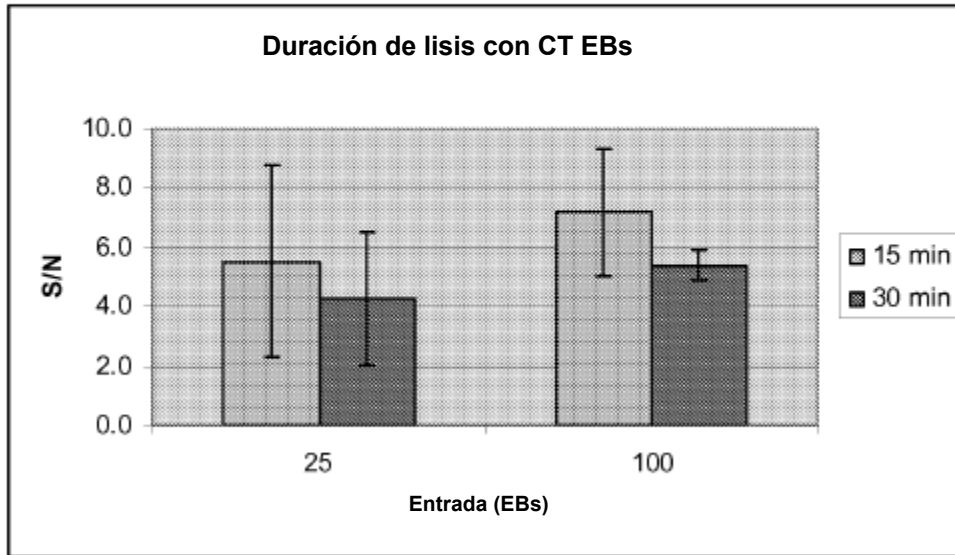


Figura 8:

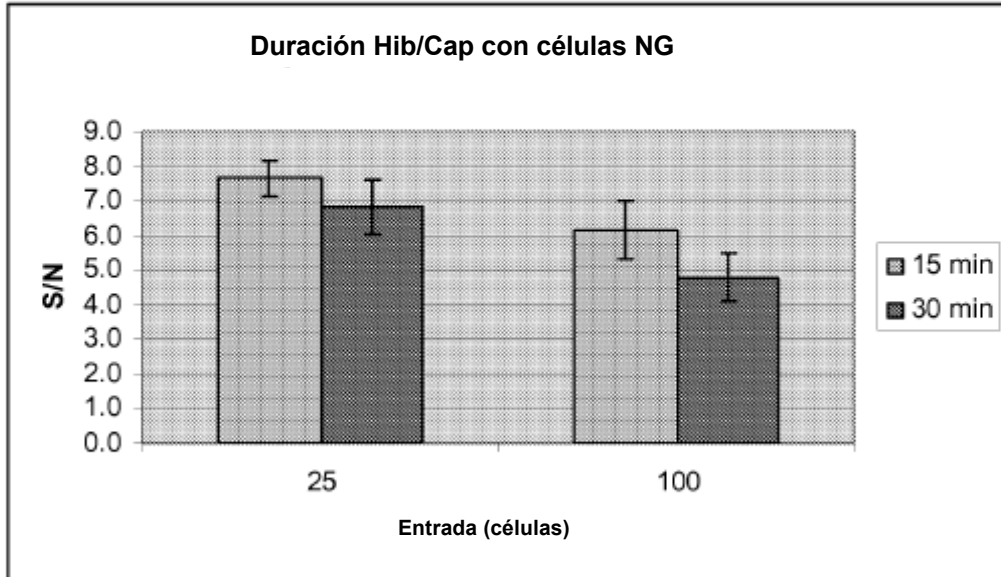


Figura 9:

Prep. muestra a gran volumen de ARN sin – PROTOCOLO CORTO

Lisis/ Desnaturación	1	Alícuota 1 ml. Medio de recuperación a t tubos con tapa a presión de 5 ml. Incremento en 10 µl de diana a tubos control.
	2	Añadir 250 µl de tampón de lisis a cada tubo.
	3	Añadir 500 µl de tampón de desnaturación a cada tubo.
	4	Incubar a 68,5°C en bloque seco SIN agitar durante 7,5 min.
Hibridar/ Captura	5	Colocar sondas y diluciones de perlas en baño maría a 50°C para calentar.
	6	Añadir 800 µl de sondas diluída en Diluyente de Sonda a cada tubo. Neutralizar.
	7	Añadir 25 µl de perlas diluídas en Bloqueante YT a cada tubo.
	8	Incubar a 50°C agitando a 900 rpm durante 22,5 min.
Lavado	9	Colocar el tubo en una cremallera magnética. Permitir a las perlas aglomerarse aprox. 5 min. Aspirar el líquido. Retirar de la cremallera magnética.
	10	Añadir 200 µl de Tampón de Lavado tHDA a cada tubo. Agitar para resuspender las perlas.
	11	Transferir a la placa Costar blanca. Colocar en la cremallera magnética y permitir a las perlas aglomerarse aprox. 2 min. Aspirar el líquido.
	12	Añadir 200 µl de Tampón de Lavado tHDA a cada pocillo. Permitir aglomerarse a las perlas aprox. 2 min. Aspirar el líquido. Repetir para un lavado final (total 3 lavados).
	13	Eliminar el líquido residual con la pipeta de pequeño volumen.
	14	Añadir 10 µl de Tampón 1X TE a cada pocillo. Agitar la placa para resuspender las perlas.
	15	Transferir la diana a la placa PCR para amplificar. (Será transferido CON perlas)
Resuspender		

Figura 10:

Prep. muestra a gran volumen de ARN sin	
Lisis/ Desnaturación	1 Alícuota 1 ml. Medio de recuperación a t tubos con tapa a presión de 5 ml. Incremento en 10 µl de diana de ADN a tubos.
	2 Añadir 250 µl de tampón de lisis a cada tubo.
	3 Añadir 500 µl de tampón de desnaturalación a cada tubo.
	4 Incubar a 50°C en bloque seco SIN agitar durante 30 min.
Hibridar/ Captura	5 Durante este tiempo, preparar diluciones de sondas y perlas.
	Añadir 800 µl de sondas diluida en Diluyente de Sonda a cada tubo. Neutralizar.
	6 Añadir 25 µl de perlas diluidas en Bloqueante YT a cada tubo.
	7 Incubar a 50°C agitando a 900 rpm durante 30 min.
Lavado	8 Colocar el tubo en una cremallera magnética. Permitir a las perlas aglomerarse aprox. 5 min. Aspirar el líquido. Retirar de la cremallera magnética.
	9 Añadir 200 µl de Tampón de Lavado tHDA a cada tubo. Agitar para resuspender las perlas.
	10 Transferir a la placa Costar blanca. Colocar en la cremallera magnética y permitir a las perlas aglomerarse aprox. 2 min. Aspirar el líquido.
	11 Añadir 200 µl de Tampón de Lavado tHDA a cada pocillo. Permitir aglomerarse a las perlas aprox. 2 min. Aspirar el líquido.
	12 Repetir para un lavado final (total 3 lavados).
	13 Eliminar el líquido residual con la pipeta de pequeño volumen.
	14 Añadir 10 µl de NaOH neutralizado con PAA a cada pocillo. Agitar la placa para resuspender las perlas.
Resuspender	Transferir la diana a la placa PCR para amplificar. (Será transferido CON perlas)

Figura 11:

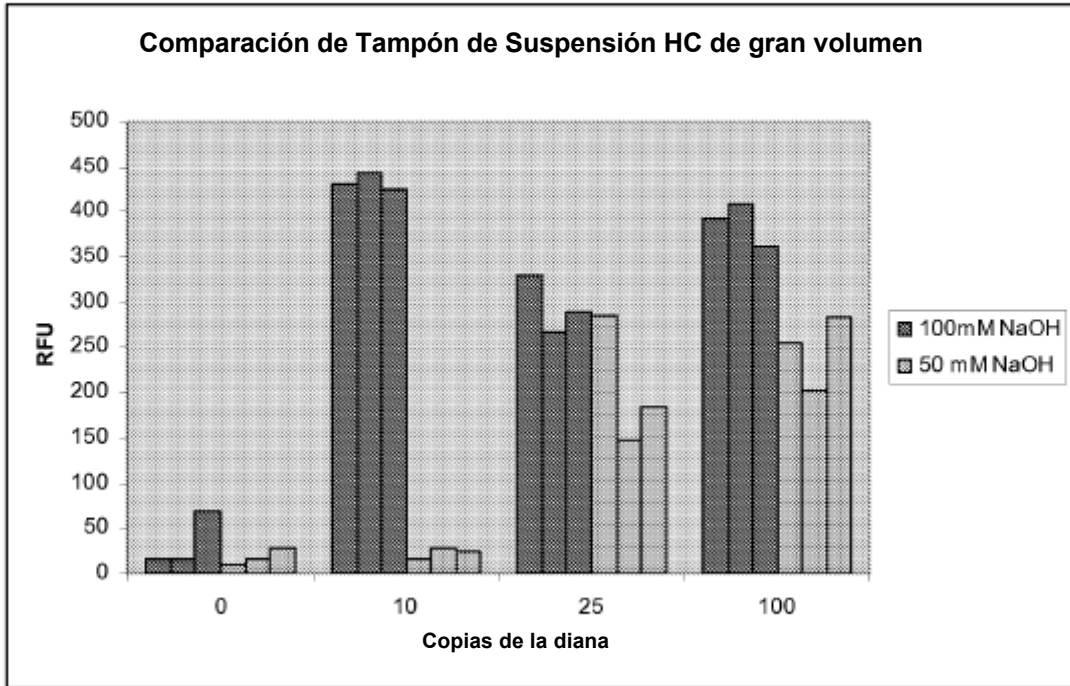
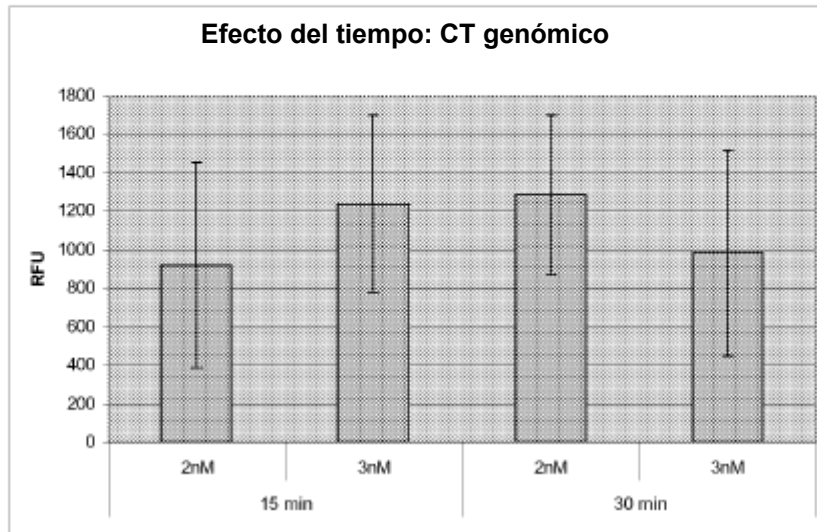


Figura 12:

A



B

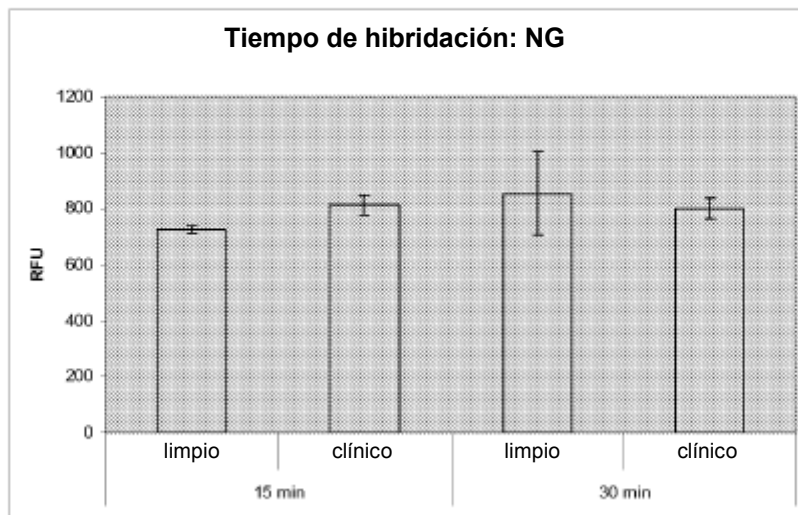


Figura 13:

15 min DNR a 68,5°C+15 min hib/cap a 50°C con reactivo calentado

medio de dilución protocolo diana Sonda tHDA	Sin FE	Grupo LV-HC PC(-) + células NG			
	na	estándar		corto	
	ADN genómico CT				
	OMP7_TYE665				
0	201	163	161	139	166
	216	160	160	187	166
	221	142	155	143	140
promedio	213	157		157	
Desv. est.	10	8		20	
%CV	5	5		12	
25 células/ EBs o 100c ADN	1641	1292	152	308	158
	1645	584	598	149	1488
	1343	1279	274	1480	146
	1422	1346	1239	196	152
	1529	861	853	206	211
	1289	1520	661	1212	1443
	1190	1480	452	119	1515
	487	1255	913	764	549
	997	749	878	135	1076
promedio	1283	910		628	
Desv. est.	365	412		571	
%CV	28	45		91	
S-N	1070	753		471	
S/N	6.0	5.8		4.0	

Figura 14:

7,5 min DNR a 68,5°C+22,5 min hib/cap a 50°C

medio de dilución protocolo Diana Sonda tHDA	Sin FE	Grupo LV-HC PC(-) + células CT EBs y NG			
	na	estándar		corto:	
	ADN genómico CT				
	OMP7_TYE665				
0	52	-4	-23	36	53
	24	-19	-35	54	27
	47	524	50	63	62
promedio	41	82		49	
Desv. est.	15	218		15	
%CV	37	266		30	
25 células/ EBs o 50c ADN	684	735	592	822	720
	670	788	778	788	806
	645	763	73	706	671
	630	627	687	649	624
	592	624	725	555	586
	673	613	678	655	582
	567	477	562	638	507
	715	507	563	454	655
	753	614	581	861	647
promedio	659	611		663	
Desv. est.	58	162		109	
%CV	9	27		16	
S-N	618	528		614	
S/N	16.1	7.4		13.5	

Figura 15:

LV HC ARN sin	100ul STM						250ul STM						500ul STM						1000ul STM													
	CT gen., CT plas., NG gen.			cél. NG			CT gen., CT plas., NG gen.			cél. NG			CT gen., CT plas., NG gen.			cél. NG			CT gen., CT plas., NG gen.			cél. NG										
	na	IC (1000c)	IC- FA M	Opad_TE X	p6_TYE56 3	CT EBS	na	IC (1000c)	IC- FA M	Opad_TE X	p6_TYE56 3	CT EBS	na	IC (1000c)	IC- FA M	Opad_TE X	p6_TYE56 3	CT EBS	na	IC (1000c)	IC- FA M	Opad_TE X	p6_TYE56 3	CT EBS	na	IC (1000c)	IC- FA M	Opad_TE X	p6_TYE56 3	CT EBS		
0	813	137	118	41	651	125	159	58	674	139	87	46	480	122	106	50	490	122	106	50	490	122	106	50	480	122	106	50	490	122	106	50
	781	82	166	55	549	142	144	50	605	143	133	63	646	124	112	45	646	124	112	45	646	124	112	45	646	124	112	45	646	124	112	45
	557	109	139	56	645	140	147	47	607	128	140	76	620	121	112	40	620	121	112	40	620	121	112	40	620	121	112	40	620	121	112	40
	761	143	951.3	121	629	146	155	48	779	134	150	67	434	91	76	30	434	91	76	30	434	91	76	30	434	91	76	30	434	91	76	30
media	728	118	141	68	619	138	151	50	666	136	127	63	548	114	102	41	548	114	102	41	548	114	102	41	548	114	102	41	548	114	102	41
Desv. Est	116	28	24	36	47	9	7	5	82	6	28	13	102	16	17	8	102	16	17	8	102	16	17	8	102	16	17	8	102	16	17	8
%CV	16	24	17	53	8	7	4	10	12	5	22	20	19	14	17	21	19	14	17	21	19	14	17	21	19	14	17	21	19	14	17	21
25	159	574	1298	358	547	174	1016	434	733	440	1812	488	424	550	1234	389	424	550	1234	389	424	550	1234	389	424	550	1234	389	424	550	1234	389
	174	1023	1152	472	242	605	1206	456	142	998	1384	453	102	277	1300	309	102	277	1300	309	102	277	1300	309	102	277	1300	309	102	277	1300	309
	355	376	1321	457	135	1034	1398	389	718	372	1573	477	96	528	1394	376	96	528	1394	376	96	528	1394	376	96	528	1394	376	96	528	1394	376
	209	850	1429	480	171	1168	1418	399	146	1060	1468	493	112	658	1003	291	112	658	1003	291	112	658	1003	291	112	658	1003	291	112	658	1003	291
	129	1203	49	30	187	127	156	73	606	468	1486	410	79	344	1217	289	79	344	1217	289	79	344	1217	289	79	344	1217	289	79	344	1217	289
	127	1226	1194	442	147	1138	1405	462	109	145	1350	337	87	773	1266	371	87	773	1266	371	87	773	1266	371	87	773	1266	371	87	773	1266	371
	409	928	1327	453	149	975	1545	419	117	630	1491	374	111	599	1228	428	111	599	1228	428	111	599	1228	428	111	599	1228	428	111	599	1228	428
	169	1032	246	110	136	339	1301	324	129	917	1029	359	168	994	1236	298	168	994	1236	298	168	994	1236	298	168	994	1236	298	168	994	1236	298
media	216	902	1002	350	214	695	1180	369	337	629	1449	424	148	591	1235	344	148	591	1235	344	148	591	1235	344	148	591	1235	344	148	591	1235	344
Desv. Est	106	296	537	178	139	438	444	128	291	331	221	62	115	228	110	53	115	228	110	53	115	228	110	53	115	228	110	53	115	228	110	53
%CV	49	33	54	51	65	63	38	35	86	53	15	15	78	39	9	16	78	39	9	16	78	39	9	16	78	39	9	16	78	39	9	16
S-N	-512	784	861	282	-404	557	1029	319	-329	493	1322	361	-400	476	1133	303	-400	476	1133	303	-400	476	1133	303	-400	476	1133	303	-400	476	1133	303
S/N	0.3	7.7	7.1	5.1	0.3	5.0	7.8	7.3	0.5	4.6	11.4	6.7	0.3	5.2	12.1	8.4	0.3	5.2	12.1	8.4	0.3	5.2	12.1	8.4	0.3	5.2	12.1	8.4	0.3	5.2	12.1	8.4