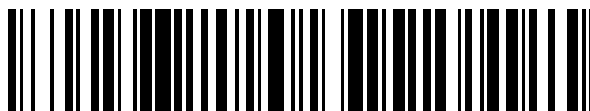


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 685 710**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.10.2013** **PCT/US2013/065681**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.04.2014** **WO14063051**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.10.2013** **E 13786570 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.05.2018** **EP 2909339**

54 Título: **Kits que comprenden controles para amplificación de ácido nucleico**

30 Prioridad:

18.10.2012 US 201261715596 P
15.03.2013 US 201361790854 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.10.2018

73 Titular/es:

IDEXX LABORATORIES, INC. (100.0%)
One Idexx Drive
Westbrook, ME 04092, US

72 Inventor/es:

LEUTENEGGER, CHRISTIAN y
ANGELICHIO, MICHAEL, JOHN

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 685 710 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

Kits que comprenden controles para amplificación de ácido nucleico

La presente invención se refiere a kits de amplificación de ácidos nucleicos que comprenden una mezcla maestra que comprende una o más ADN polimerasas, nucleósidos trifosfato y, opcionalmente, una o más transcriptasas inversas; un control positivo diana agrupado que comprende dos o más polinucleótidos de control positivo diana bacterianos o virales para dos o más polinucleótidos diana y uno o más polinucleótidos de secuencia distintiva que no se amplifican de manera cruzada con ninguno de los otros polinucleótidos o controles en el kit; y una mezcla de detección de control de muestra interno que comprende uno o más cebadores directos, uno o más cebadores inversos, y una o más sondas que pueden amplificar y detectar uno o más polinucleótidos eucarióticos conservados.

La PCR en tiempo real ha creado una revolución en el diagnóstico, con mayor velocidad, sensibilidad y especificidad sobre muchas otras ofertas. Los componentes de las pruebas de PCR en tiempo real pueden incluir, p.ej., i) una mezcla maestra (que contiene enzima, tampón y nucleótidos), ii) controles positivos, iii) controles internos positivos (para asegurar la adecuada purificación de ácidos nucleicos), iv) una mezcla de detección (que contiene los cebadores y sondas específicos de la diana), v) un control interno de la muestra; o vi) combinaciones de los mismos. En la presente memoria se describen los sistemas de PCR, incluidos los sistemas de PCR en tiempo real, en los que todas las pruebas y protocolos de prueba están normalizados. El objetivo de esta plataforma es minimizar tanto la manipulación del material como el tiempo dedicado a ejecutar las muestras. Por ejemplo, un único Control Positivo Interno (CPI) puede proporcionar un medio para asegurar la purificación adecuada de ácidos nucleicos para dianas de prueba de ARN y ADN. Además, las condiciones de ciclación convencionales para todas las pruebas de diagnóstico permiten al usuario ejecutar dianas de ARN y ADN una al lado de la otra en la misma placa de reacción. Los ensayos se ejecutarán en aproximadamente una hora o menos. Se han desarrollado varias pruebas de PCR en tiempo real en la nueva plataforma. Los análisis de sensibilidad analítica para las pruebas IDEXX RealPCR de *Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae*, Virus de la diarrea viral bovina (BVDV), virus de la lengua azul (BTV) y *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (MAP) muestran una sensibilidad de ≤ 10 copias por reacción con alta especificidad y compatibilidad para su uso con uno o más controles positivos internos y/o controles de muestra internos. Los protocolos y componentes convencionales en el sistema de prueba proporcionarán a los laboratorios una plataforma más eficaz y flexible para la prueba de PCR, incluida la PCR en tiempo real, que minimizará en gran medida la manipulación de los componentes, simplificará los flujos de trabajo, reducirá la probabilidad de error del operario y reducirá el tiempo total de la prueba.

En este contexto, Zimmermann y Mannhalter (Zimmermann, K. y Mannhalter, W.; BioTechniques, 21(2); 1996; pág. 268-279) describen los aspectos técnicos de la PCR competitiva cuantitativa. Adicionalmente, el documento WO 2005/040396 A2 describe un sistema integrado basado en qRT-PCR para analizar e informar sobre perfiles de expresión de ARN en muestras biológicas. Además, el documento WO 2004/104229 A2 describe una molécula de ácido nucleico de control interno que comprende sitios de cebador generados aleatoriamente y regiones amplificables. Además, Willey *et al.* (Willey, J.C. et al.; Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 19; 1998; pág. 6-17) describen métodos para la medición de la expresión simultánea de muchos genes mediante qRT-PCR, utilizando dichos métodos mezclas normalizadas de moldes competitivos.

Además, el documento WO 03/083051 A2 describe un método para la comparación directa de valores numéricos de expresión génica entre muestras de genes utilizando RT-PCR. Por otra parte, el documento WO 98/58083 A2 describe un método y un aparato para la medición cuantitativa de la expresión génica utilizando RT-PCR competitiva múltiple. Finalmente, el documento US 2012/0115154 A1 describe oligómeros de ADN que comprenden secuencias que están ausentes del genoma de uno o más organismos de interés que pueden utilizarse como marcadores de referencia.

La presente invención se refiere a los siguientes apartados:

1. Un kit de amplificación de ácido nucleico que comprende:

(a) una mezcla maestra que comprende una o más ADN polimerasas, nucleósidos trifosfato y, opcionalmente, una o más transcriptasas inversas;

(b) un control positivo diana agrupado que comprende dos o más polinucleótidos de control positivo diana bacterianos o virales para dos o más polinucleótidos diana y uno o más polinucleótidos de secuencia distintiva que no se amplifican de manera cruzada con ninguno de los otros polinucleótidos o controles en el kit; y

(c) una mezcla de detección de control de muestra interno que comprende uno o más cebadores directos, uno o más cebadores inversos, y una o más sondas que pueden amplificar y detectar uno o más polinucleótidos eucarióticos conservados.

2. El kit de amplificación de ácido nucleico del apartado 1, en donde las una o más ADN polimerasas se combinan con una o más polimerasas de transcriptasa inversa.

3. El kit de amplificación de ácidos nucleicos del apartado 1, que comprende adicionalmente una mezcla de detección de polinucleótidos diana específica del ensayo que comprende uno o más cebadores directos específicos del ensayo, uno o más cebadores inversos específicos del ensayo, y una o más sondas específicas del ensayo.
- 5 4. El kit de amplificación de ácido nucleico del apartado 1, en donde el control positivo diana agrupado comprende 10, 20, 30 o más polinucleótidos de control positivo diana para 10, 20, 30 o más polinucleótidos diana.
5. El kit de amplificación de ácido nucleico del apartado 1 que comprende adicionalmente una mezcla de detección de control de calidad que comprende uno o más de:
 - 10 (a) un par de polinucleótidos de control positivo interno que comprende un polinucleótido de control positivo interno (CPI) de ADN y un polinucleótido de control positivo interno (CPI) de ARN, en donde el CPI de ADN y el CPI de ARN comparten una o dos regiones de unión del cebador directo, regiones de unión de la sonda, o regiones de unión del cebador inverso iguales o similares, y en donde una o dos de las regiones de unión del cebador directo, regiones de unión de la sonda, o regiones de unión del
 - 15 cebador inverso del CPI de ADN y el CPI de ARN son diferentes; y
 - (b) una mezcla de detección PanB que comprende uno o más cebadores directos, uno o más cebadores inversos y una o más sondas que pueden amplificar y detectar uno o más polinucleótidos procarióticos conservados.
- 20 6. El kit de amplificación de ácido nucleico del apartado 3, en donde la mezcla de detección de polinucleótidos diana específica del ensayo comprende adicionalmente uno o más cebadores directos de control positivo interno, uno o más cebadores inversos de control positivo interno, y una o más sondas de control positivo interno.
7. El kit de amplificación de ácido nucleico del apartado 5, en donde la mezcla maestra, el control positivo diana agrupado y el par de polinucleótidos de control positivo interno son componentes universales que se
- 25 pueden utilizar con cualquier mezcla de detección de polinucleótidos diana específico del ensayo.
8. El kit de amplificación de ácido nucleico del apartado 3, en donde la mezcla de detección de polinucleótidos diana específica del ensayo comprende cebadores inversos específicos del ensayo, cebadores directos específicos del ensayo y una o más sondas específicas del ensayo para dos o más polinucleótidos diana diferentes.
- 30 9. El kit de amplificación de ácido nucleico del apartado 8, en donde las una o más sondas específicas del ensayo para dos o más polinucleótidos diana diferentes son sondas para dos o más polinucleótidos diana diferentes que son polinucleótidos de ARN y polinucleótidos de ADN.
10. El kit de amplificación de ácido nucleico del apartado 1, en donde uno o más de los polinucleótidos de control positivos diana agrupados comprenden una región de unión del cebador directo, una región de unión
- 35 de la sonda y una región de unión del cebador inverso, en donde cada una de la región de unión del cebador, la región de unión de la sonda, y la región de unión del cebador inverso tienen homología con una región de unión del cebador directo, una región de unión de la sonda y una región de unión del cebador inverso correspondientes en un polinucleótido diana, y en donde uno o más de los polinucleótidos de control positivo diana agrupados tienen 10 o más bases de ácido nucleico menos que una región del polinucleótido diana que
- 40 comprende la región de unión del cebador directo, la región de unión de la sonda, la región de unión del cebador inverso y cualquier región intermedia para la cual los polinucleótidos de control positivo diana sirven como control.
11. El kit de amplificación de ácido nucleico del apartado 1, en donde los dos o más polinucleótidos de control positivo diana para dos o más polinucleótidos diana comprenden polinucleótidos de control positivo diana
- 45 tanto de ADN como de ARN.
12. El kit de amplificación de ácido nucleico del apartado 1, en donde la concentración molar de uno o más polinucleótidos de secuencia distintiva es mayor que la concentración molar de los dos o más polinucleótidos de control positivo diana.
13. El kit de amplificación de ácido nucleico del apartado 1, que comprende adicionalmente un cebador
- 50 directo para la secuencia distintiva, un cebador inverso para la secuencia distintiva, y una o más sondas que pueden detectar la secuencia distintiva.

Una realización descrita en la presente memoria proporciona un kit de amplificación de ácido nucleico. El kit comprende:

- (a) una mezcla maestra que comprende una o más ADN polimerasas, nucleósidos trifosfato y, opcionalmente,

una o más transcriptasas inversas;

(b) un control positivo diana agrupado que comprende dos o más polinucleótidos de control positivo diana para dos o más polinucleótidos diana y uno o más polinucleótidos de secuencia distintiva; y

5 (c) una mezcla de detección de control de muestra interno que comprende uno o más cebadores directos, uno o más cebadores inversos, y una o más sondas que pueden amplificar y detectar uno o más polinucleótidos eucarióticos conservados

Las una o más ADN polimerasas se pueden combinar con una o más polimerasas de transcriptasa inversa. El kit puede comprender adicionalmente una mezcla de detección de polinucleótidos diana específica del ensayo que comprende uno o más cebadores directos específicos del ensayo, uno o más cebadores inversos específicos del ensayo, y una o más sondas específicas del ensayo. El control positivo diana agrupado puede comprender 10, 20, 30 o más polinucleótidos de control positivo diana para 10, 20, 30 o más polinucleótidos diana. El kit puede comprender adicionalmente una mezcla de detección de control de calidad que comprende uno o más de:

15 (a) un par de polinucleótidos de control positivo interno que comprende un polinucleótido de control positivo interno (CPI) de ADN y un polinucleótido de control positivo interno (CPI) de ARN, en donde el CPI de ADN y el CPI de ARN comparten una o dos regiones de unión del cebador directo, regiones de unión de la sonda, o regiones de unión del cebador inverso iguales o similares, y en donde una o dos de las regiones de unión del cebador directo, regiones de unión de la sonda, o regiones de unión del cebador inverso del CPI de ADN y el CPI de ARN son diferentes; y

20 (b) una mezcla de detección PanB que comprende uno o más cebadores directos, uno o más cebadores inversos y una o más sondas que pueden amplificar y detectar uno o más polinucleótidos procarióticos conservados.

La mezcla de detección de polinucleótidos diana específica del ensayo puede comprender adicionalmente uno o más cebadores directos de control positivo interno, uno o más cebadores inversos de control positivo interno, y una o más sondas de control positivo interno. La mezcla maestra, el control positivo diana agrupado y el par de polinucleótidos de control positivo interno pueden ser componentes universales que se pueden utilizar con cualquier mezcla de detección de polinucleótidos diana específica del ensayo. La mezcla de detección de polinucleótidos diana específica del ensayo puede comprender cebadores inversos específicos del ensayo, cebadores directos específicos del ensayo y una o más sondas específicas del ensayo para dos o más polinucleótidos diana diferentes. Los dos o más polinucleótidos diana diferentes pueden comprender polinucleótidos de ADN y polinucleótidos de ARN. La mezcla maestra, el control positivo diana agrupado y la mezcla de detección de control de muestra interno se pueden utilizar para amplificar tanto dianas de polinucleótidos de ADN como dianas de polinucleótidos de ARN en el mismo dispositivo de múltiples pocillos. Uno o más de los polinucleótidos de control positivo diana agrupados pueden comprender una región de unión del cebador directo, una región de unión de la sonda y una región de unión del cebador inverso, en donde cada una de la región de unión del cebador, la región de unión de la sonda y la región de unión del cebador inverso tiene homología con una región de unión del cebador directo, una región de unión de la sonda y una región de unión del cebador inverso correspondientes en un polinucleótido diana, y en donde los uno o más polinucleótidos de control positivo diana agrupados pueden tener 10 o más bases de ácido nucleico menos que una región del polinucleótido diana que comprende la región de unión del cebador directo, la región de unión de la sonda, la región de unión del cebador inverso y cualquier región intermedia para la cual los polinucleótidos de control positivo diana sirven como control.

Otra realización descrita en la presente memoria proporciona un método para realizar una reacción en cadena de la polimerasa. El método comprende cargar uno o más recipientes con:

(a) una muestra de prueba;

45 (b) una mezcla de detección de control de muestra interno que comprende uno o más cebadores directos, uno o más cebadores inversos, y una o más sondas que pueden amplificar y detectar uno o más polinucleótidos eucarióticos conservados;

50 (c) una mezcla de detección de polinucleótidos diana específica del ensayo para un polinucleótido diana de ADN que comprende uno o más cebadores directos específicos del ensayo, uno o más cebadores inversos específicos del ensayo, y una o más sondas específicas del ensayo; o una mezcla de detección de polinucleótidos diana específica del ensayo para un polinucleótido diana de ARN que comprende uno o más cebadores directos específicos del ensayo, uno o más cebadores inversos específicos del ensayo, y una o más sondas específicas del ensayo; o una mezcla de detección combinada para polinucleótidos diana de ADN y ARN; y

55 (d) una mezcla maestra que comprende una o más ADN polimerasas, nucleósidos trifosfato, y opcionalmente una o más transcriptasas inversas.

Los uno o más recipientes se someten a las condiciones de termociclación de la reacción en cadena de la

polimerasa universal al mismo tiempo en el mismo termociclador. Los uno o más recipientes se pueden cargar con una mezcla de detección de polinucleótidos diana específica del ensayo para un polinucleótido diana de ADN y con una mezcla de detección de polinucleótidos diana específica del ensayo para un polinucleótido diana de ARN. Los uno o más recipientes se pueden cargar adicionalmente con:

- 5 (a) polinucleótidos de control positivo diana agrupados o un único polinucleótido de control positivo diana;
- (b) una secuencia distintiva;
- (c) una mezcla de detección de polinucleótidos diana específica del ensayo para un polinucleótido diana de ADN que comprende uno o más cebadores directos específicos del ensayo, uno o más cebadores inversos específicos del ensayo, y una o más sondas específicas del ensayo; o una mezcla de detección de polinucleótidos diana específica del ensayo para un polinucleótido diana de ARN que comprende uno o más cebadores directos específicos del ensayo, uno o más cebadores inversos específicos del ensayo, y una o más sondas específicas del ensayo; o una mezcla de detección combinada para la diana de ADN y ARN; y
- 10 (d) una mezcla maestra que comprende una o más ADN polimerasas, nucleósidos trifosfato, y opcionalmente una o más transcriptasas inversas.
- 15 Uno o más recipientes adicionales se pueden cargar con:
 - (a) agua o tampón;
 - (b) una mezcla de detección de polinucleótidos diana específica del ensayo para un polinucleótido diana de ADN que comprende uno o más cebadores directos específicos del ensayo, uno o más cebadores inversos específicos del ensayo, y una o más sondas específicas del ensayo; o una mezcla de detección de polinucleótidos diana específica del ensayo para un polinucleótido diana de ARN que comprende uno o más cebadores directos específicos del ensayo, uno o más cebadores inversos específicos del ensayo, y una o más sondas específicas del ensayo; o una mezcla de detección combinada para una diana de ADN y ARN; y
 - 20 (c) una mezcla maestra que comprende una o más ADN polimerasas, nucleósidos trifosfato, y opcionalmente una o más transcriptasas inversas.
- 25 Uno o más recipientes adicionales se pueden cargar con:
 - (a) una muestra de prueba;
 - (b) un control positivo interno (CPI) de ADN, un control positivo interno (CPI) de ARN, o un control positivo interno de ADN y ARN, en donde el CPI de ADN y el CPI de ARN comparten una o dos regiones de unión del cebador directo, regiones de unión de la sonda, o regiones de unión del cebador inverso iguales o similares, y en donde una o dos de las regiones de unión del cebador directo, regiones de unión de la sonda, o regiones de unión del cebador inverso del CPI de ADN y el CPI de ARN son diferentes;
 - 30 (c) una mezcla de detección de control positivo interno que comprende uno o más cebadores directos de control positivo interno, uno o más cebadores inversos de control positivo interno, y una o más sondas de control positivo interno; y
 - 35 (d) una mezcla maestra que comprende una o más ADN polimerasas, nucleósidos trifosfato, y opcionalmente una o más transcriptasas inversas.

Uno o más de los polinucleótidos de control positivo diana pueden comprender una región de unión del cebador directo, una región de unión de la sonda y una región de unión del cebador inverso, en donde cada región de unión del cebador, región de unión de la sonda y región de unión del cebador inverso tienen homología con una región de unión del cebador directo, una región de unión de la sonda y una región de unión del cebador inverso correspondientes en un polinucleótido diana, y en donde uno o más de los polinucleótidos de control positivo diana agrupados pueden tener 10 o más bases de ácido nucleico menos que una región del polinucleótido diana que comprende la región de unión del cebador directo, la región de unión de la sonda, la región de unión del cebador inverso y cualquier región intermedia para la cual los polinucleótidos de control positivo diana sirven como control.

- 45 Uno o más recipientes adicionales se pueden cargar con:
 - (a) una muestra que se va a someter a prueba para detectar contaminación;
 - (b) una mezcla de detección para una secuencia distintiva; y
 - (c) una mezcla maestra que comprende una o más ADN polimerasas, nucleósidos trifosfato, y opcionalmente una o más transcriptasas inversas.
- 50 Uno o más recipientes adicionales se pueden cargar con:

(a) una muestra que se va a someter a prueba para detectar contaminación o una muestra de prueba;

(b) una mezcla de detección PanB que comprende uno o más cebadores directos, uno o más cebadores inversos, y una o más sondas que pueden amplificar y detectar uno o más polinucleótidos procarióticos conservados; y

5 (c) una mezcla maestra que comprende una o más ADN polimerasas, nucleósidos trifosfato, y opcionalmente una o más transcriptasas inversas.

Las condiciones de termociclación de la reacción en cadena de la polimerasa universal pueden ser de 40-65°C durante 10-30 minutos; después, aproximadamente 45 ciclos de 94-95°C durante 5-15 segundos, y 60°C durante 20-45 segundos. La reacción en cadena de la polimerasa puede ser una reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

10

Otra realización más proporciona una mezcla de reactivos de amplificación de ácido nucleico. Los reactivos pueden comprender:

(a) una mezcla maestra que comprende una o más ADN polimerasas, nucleósidos trifosfato y, opcionalmente, una o más transcriptasas inversas;

15 (b) una mezcla de detección de polinucleótidos diana específica del ensayo que comprende uno o más cebadores directos específicos del ensayo, uno o más cebadores inversos específicos del ensayo, y una o más sondas específicas del ensayo; y

(c) una mezcla de detección de control de muestra interno que comprende uno o más cebadores directos, uno o más cebadores inversos, y una o más sondas que pueden amplificar y detectar uno o más polinucleótidos eucarióticos conservados;

20

en donde cada uno de (a), (b) y (c) son cada uno mezclas individuales; o en donde uno o más de (a), (b) y (c) se combinan entre sí en una o más mezclas; o en donde (a), (b) y (c) se combinan entre sí en una única mezcla.

Las una o más ADN polimerasas pueden ser ADN polimerasas de PCR de transcriptasa inversa. La mezcla puede comprender adicionalmente un control positivo diana agrupado que comprende dos o más polinucleótidos de control positivo diana para dos o más polinucleótidos diana y uno o más polinucleótidos de secuencia distintiva, en donde el control positivo agrupado es una mezcla individual o se combina con uno o más de (a), (b) o (c). El control positivo diana agrupado puede comprender 10, 20, 30 o más polinucleótidos de control positivo diana para 10, 20, 30 o más polinucleótidos diana. La mezcla puede comprender adicionalmente una mezcla de detección de control de calidad que comprende uno o más de:

25

(a) un par de polinucleótidos de control positivo interno que comprende un polinucleótido de control positivo interno (CPI) de ADN y un polinucleótido de control positivo interno (CPI) de ARN, en donde el CPI de ADN y el CPI de ARN comparten una o dos regiones de unión del cebador directo, regiones de unión de la sonda, o regiones de unión del cebador inverso iguales o similares, y en donde una o dos de las regiones de unión del cebador directo, regiones de unión de la sonda, o regiones de unión del cebador inverso del CPI de ADN y el CPI de ARN son diferentes;

30

35

(b) una secuencia distintiva; y

(c) una mezcla de detección PanB que comprende uno o más cebadores directos, uno o más cebadores inversos y una o más sondas que pueden amplificar y detectar uno o más polinucleótidos procarióticos conservados.

La mezcla de detección de polinucleótidos diana específica del ensayo puede comprender adicionalmente uno o más cebadores directos de control positivo interno, uno o más cebadores inversos de control positivo interno, y una o más sondas de control positivo interno. La mezcla maestra, el control positivo diana agrupado y la mezcla de detección de control de muestra interno pueden ser componentes universales que se pueden utilizar con cualquier mezcla de detección de polinucleótidos diana específica del ensayo. La mezcla de detección de polinucleótidos diana específica del ensayo puede comprender cebadores inversos específicos del ensayo, cebadores directos específicos del ensayo y una o más sondas específicas del ensayo para dos o más polinucleótidos diana diferentes. Los dos o más polinucleótidos diana diferentes pueden comprender polinucleótidos de ARN y polinucleótidos de ADN. La mezcla maestra, el control positivo diana agrupado y la mezcla de detección de control de muestra interno se pueden utilizar para amplificar tanto las dianas de polinucleótidos de ADN como las dianas de polinucleótidos de ARN en el mismo dispositivo de múltiples pocillos.

40

45

50

Otra realización adicional descrita en la presente memoria proporciona una composición de ácido nucleico para su uso en la amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa. La composición comprende:

un polinucleótido de ADN de control positivo interno (CPI) y un polinucleótido de ARN de control positivo interno (CPI), en donde los polinucleótidos de ADN y ARN comprenden cada uno una región de unión del

cebador directo, una región de unión del cebador inverso y una región de unión de la sonda, en donde los polinucleótidos de ADN y ARN comparten uno o dos elementos de secuencia iguales o similares seleccionados del grupo que consiste en:

una región de unión del cebador directo

5 una región de unión del cebador inverso, y

una región de unión de la sonda;

y en donde los polinucleótidos de ADN y ARN tienen uno o dos elementos de secuencia diferentes seleccionados del grupo que consiste en:

una región de unión del cebador directo

10 una región de unión del cebador inverso, y

una región de unión de la sonda.

La composición de ácido nucleico puede comprender adicionalmente:

un cebador directo capaz de soportar la amplificación tanto del polinucleótido de ADN como de un transcrito inverso del polinucleótido de ARN,

15 un cebador inverso capaz de soportar la amplificación del polinucleótido de ADN, pero no del transcrito inverso del polinucleótido de ARN,

una sonda capaz de soportar la detección de productos de amplificación tanto del polinucleótido de ADN como del transcrito inverso del polinucleótido de ARN.

La composición de ácido nucleico puede comprender adicionalmente:

20 un cebador directo capaz de soportar la amplificación del polinucleótido de ADN, pero no de un transcrito inverso del polinucleótido de ARN,

un cebador inverso capaz de soportar la amplificación tanto del polinucleótido de ADN como del transcrito inverso del polinucleótido de ARN,

25 una sonda capaz de soportar la detección de productos de amplificación tanto del polinucleótido de ADN como del transcrito inverso del polinucleótido de ARN.

La composición de ácido nucleico puede comprender adicionalmente:

un cebador directo capaz de soportar la amplificación tanto del polinucleótido de ADN como del transcrito inverso del polinucleótido de ARN,

30 un cebador inverso capaz de soportar la amplificación tanto del polinucleótido de ADN como del transcrito inverso del polinucleótido de ARN,

una sonda capaz de soportar la detección de productos de amplificación del polinucleótido de ADN, pero no del transcrito inverso del polinucleótido de ARN.

La composición de ácido nucleico puede comprender adicionalmente:

35 un cebador directo capaz de soportar la amplificación tanto del polinucleótido de ADN como de un transcrito inverso del polinucleótido de ARN,

un cebador inverso capaz de soportar la amplificación del transcrito inverso del polinucleótido de ARN, pero no del polinucleótido de ADN,

una sonda capaz de soportar la detección de productos de amplificación tanto del polinucleótido de ADN como del transcrito inverso del polinucleótido de ARN.

40 La composición de ácido nucleico puede comprender adicionalmente:

un cebador directo capaz de soportar la amplificación de un transcrito inverso del polinucleótido de ARN, pero no del polinucleótido de ADN,

un cebador inverso capaz de soportar la amplificación tanto del polinucleótido de ADN como del transcrito inverso del polinucleótido de ARN,

una sonda capaz de soportar la detección de productos de amplificación tanto del polinucleótido de ADN como del transcrito inverso del polinucleótido de ARN.

La composición de ácido nucleico puede comprender adicionalmente:

- 5 un cebador directo capaz de soportar la amplificación tanto del polinucleótido de ADN como de un transcrito inverso del polinucleótido de ARN,
- un cebador inverso capaz de soportar la amplificación tanto del polinucleótido de ADN como del transcrito inverso del polinucleótido de ARN,
- una sonda capaz de soportar la detección de productos de amplificación del transcrito inverso del polinucleótido de ARN, pero no del polinucleótido de ADN.

- 10 Otra realización más descrita en la presente memoria proporciona una molécula de ácido ribonucleico de control de la reacción en cadena de polimerasa que comprende una región de unión del cebador directo, una región de unión de la sonda y una región de unión del cebador inverso, en donde cada una de la región de unión del cebador, la región de unión de la sonda y la región de unión del cebador inverso tiene homología con una región de unión del cebador directo, una región de unión de la sonda y una región de unión del cebador inverso correspondientes en un polinucleótido diana, y en donde la molécula de ácido ribonucleico de control de la reacción en cadena de la polimerasa puede tener 10 o más bases de ácido nucleico menos que una región del polinucleótido diana que comprende la región de unión del cebador directo, la región de unión de la sonda, la región de unión del cebador inverso y cualquier región intermedia para la cual la molécula de ácido ribonucleico de control de la reacción en cadena de la polimerasa sirve como control. La molécula de ácido ribonucleico de control de la reacción en cadena de la polimerasa puede tener 2 o más bases de ácido nucleico menos entre la región de unión del cebador directo y la región de unión de la sonda que se produce en el polinucleótido diana y en donde la molécula de ácido ribonucleico de control de la reacción en cadena de la polimerasa puede tener 2 o más bases de ácido nucleico menos entre la región de unión de la sonda y la región de unión del cebador inverso que se produce en el polinucleótido diana. La molécula de ácido ribonucleico de control de la reacción en cadena de la polimerasa puede tener entre 5 y 15 bases de ácido nucleico 5' con respecto al sitio de unión del cebador directo y entre aproximadamente 5 y 15 bases de ácido nucleico 3' con respecto al sitio de unión del cebador inverso que tienen homología con el polinucleótido diana.

- 30 Otra realización descrita en la presente memoria proporciona una composición de control positivo diana agrupada que comprende dos o más polinucleótidos de control positivo diana para dos o más polinucleótidos diana y uno o más polinucleótidos de secuencia distintiva. La composición puede comprender 5, 10, 15, 20, 50 o más polinucleótidos de control positivo diana para 5, 10, 15, 20, 50 o más polinucleótidos diana. Los dos o más polinucleótidos de control positivo diana para dos o más polinucleótidos diana pueden comprender polinucleótidos de control positivo diana tanto de ADN como de ARN. Los uno o más de los polinucleótidos de control positivo diana pueden ser moléculas de ácido ribonucleico de control que comprenden una región de unión del cebador directo, una región de unión de la sonda y una región de unión del cebador inverso, en donde cada una de la región de unión del cebador, la región de unión de la sonda y la región de unión del cebador inverso tiene homología con una región de unión del cebador directo, una región de unión de la sonda y una región de unión del cebador inverso correspondientes en un polinucleótido diana, y en donde la molécula de ácido ribonucleico de control de la reacción en cadena de la polimerasa puede tener 10 o más bases de ácido nucleico menos que una región del polinucleótido diana que comprende la región de unión del cebador directo, la región de unión de la sonda, la región de unión del cebador inverso y cualquier región intermedia para la que la molécula de ácido ribonucleico de control de la reacción en cadena de la polimerasa sirve como control. La concentración molar de los uno o más polinucleótidos de secuencia distintiva puede ser mayor que la concentración molar de uno o más de los polinucleótidos de control positivo diana.

- 45 Otra realización más descrita en la presente memoria proporciona un método de prueba para determinar la contaminación de una muestra de PCR. El método comprende cargar uno o más recipientes con:

- (a) una muestra que se va a someter a prueba para detectar contaminación;
- (b) una mezcla de detección para una secuencia distintiva; y
- (c) una mezcla maestra que comprende una o más ADN polimerasas, nucleósidos trifosfato, y opcionalmente una o más transcriptasas inversas. Los uno o más recipientes están sujetos a condiciones de reacción en cadena de la polimerasa.

- 55 Otra realización más descrita en la presente memoria proporciona un método para realizar una reacción en cadena de la polimerasa que amplifica tanto un polinucleótido diana de ADN como un polinucleótido diana de ARN en el mismo dispositivo de múltiples pocillos. El método comprende cargar dos o más recipientes en el mismo dispositivo de múltiples pocillos con:

- (a) una muestra de prueba;

(b) una mezcla de detección de control de muestra interno que comprende uno o más cebadores directos, uno o más cebadores inversos, y una o más sondas que pueden amplificar y detectar uno o más polinucleótidos eucarióticos conservados;

5 (c) una mezcla de detección de polinucleótidos diana específica del ensayo para un polinucleótido diana de ADN que comprende uno o más cebadores directos específicos del ensayo, uno o más cebadores inversos específicos del ensayo y una o más sondas específicas del ensayo y una mezcla de detección de polinucleótidos diana específica del ensayo para un polinucleótido diana un ARN que comprende uno o más cebadores directos específicos del ensayo, uno o más cebadores inversos específicos del ensayo, y una o más sondas específicas del ensayo; o una mezcla de detección combinada para polinucleótidos diana de ADN y ARN; y

(d) una mezcla maestra que comprende una o más ADN polimerasas, nucleósidos trifosfato y una o más transcriptasas inversas.

15 Los dos o más recipientes en el mismo dispositivo de múltiples pocillos están sujetos a condiciones de termociclación de la reacción en cadena de polimerasa universales al mismo tiempo en el mismo termociclador. Los dos o más recipientes se pueden cargar con una mezcla de detección de polinucleótidos diana específica del ensayo para un polinucleótido diana de ADN y con una mezcla de detección de polinucleótidos diana específica del ensayo para un polinucleótido diana de ARN. Uno o más recipientes adicionales en el dispositivo de múltiples pocillos se pueden cargar con:

(a) polinucleótidos de control positivo diana agrupados o un único polinucleótido de control positivo diana;

20 (b) una secuencia distintiva;

(c) una mezcla de detección de polinucleótidos diana específica del ensayo para un polinucleótido diana de ADN que comprende uno o más cebadores directos específicos del ensayo, uno o más cebadores inversos específicos del ensayo, y una o más sondas específicas del ensayo; o una mezcla de detección de polinucleótidos diana específica del ensayo para un polinucleótido diana de ARN que comprende uno o más cebadores directos específicos del ensayo, uno o más cebadores inversos específicos del ensayo, y una o más sondas específicas del ensayo; o una mezcla de detección combinada para la diana de ADN y ARN; y

(d) una mezcla maestra que comprende una o más ADN polimerasas, nucleósidos trifosfato, y opcionalmente una o más transcriptasas inversas.

Uno o más recipientes adicionales en el dispositivo de múltiples pocillos se pueden cargar con:

30 (a) agua o tampón;

(b) una mezcla de detección de polinucleótidos diana específica del ensayo para un polinucleótido diana de ADN que comprende uno o más cebadores directos específicos del ensayo, uno o más cebadores inversos específicos del ensayo, y una o más sondas específicas del ensayo; o una mezcla de detección de polinucleótidos diana específica del ensayo para un polinucleótido diana de ARN que comprende uno o más cebadores directos específicos del ensayo, uno o más cebadores inversos específicos del ensayo, y una o más sondas específicas del ensayo; o una mezcla de detección combinada para la diana de ADN y ARN; y

(c) una mezcla maestra que comprende una o más ADN polimerasas, nucleósidos trifosfato, y opcionalmente una o más transcriptasas inversas.

Uno o más recipientes adicionales en el dispositivo de múltiples pocillos se pueden cargar con:

40 (a) una muestra de prueba;

(b) un control positivo interno (CPI) de ADN, un control positivo interno (CPI) de ARN, o un control positivo interno tanto de ADN como de ARN, en donde el CPI de ADN y el CPI de ARN comparten una o dos regiones de unión del cebador directo iguales o similares, regiones de unión de la sonda, o regiones de unión del cebador inverso, y en donde una o dos de las regiones de unión del cebador directo, regiones de unión de la sonda, o regiones de unión del cebador inverso del CPI de ADN y el CPI de ARN son diferentes;

(c) una mezcla de detección de control positivo interno que comprende uno o más cebadores directos de control positivo interno, uno o más cebadores inversos de control positivo interno, y una o más sondas de control positivo interno; y

50 (d) una mezcla maestra que comprende una o más ADN polimerasas, nucleósidos trifosfato, y opcionalmente una o más transcriptasas inversas.

Los uno o más de los polinucleótidos de control positivo diana pueden comprender una región de unión del cebador directo, una región de unión de la sonda y una región de unión del cebador inverso, en donde cada región de unión

del cebador, región de unión de la sonda y región de unión del cebador inverso tiene homología con una región de unión del cebador directo, una región de unión de la sonda y una región de unión del cebador inverso correspondientes en un polinucleótido diana, y en donde uno o más de los polinucleótidos de control positivo diana agrupados pueden tener 10 o más bases de ácido nucleico menos que una región del un polinucleótido diana que comprende la región de unión del cebador directo, la región de unión de la sonda, la región de unión del cebador inverso y cualquier región intermedia para la cual los polinucleótidos de control positivo diana sirven como control.

Uno o más recipientes adicionales en el dispositivo de múltiples pocillos se pueden cargar con:

(a) una muestra que se someterá a prueba para detectar contaminación;

(b) una mezcla de detección para una secuencia distintiva; y

(c) una mezcla maestra que comprende una o más ADN polimerasas, nucleósidos trifosfato, y opcionalmente una o más transcriptasas inversas.

Uno o más recipientes adicionales en el dispositivo de múltiples pocillos se pueden cargar con:

(a) una muestra que someterá a prueba para detectar contaminación o una muestra de prueba;

(b) una mezcla de detección PanB que comprende uno o más cebadores directos, uno o más cebadores inversos, y una o más sondas que pueden amplificar y detectar uno o más polinucleótidos procarióticos conservados; y

(c) una mezcla maestra que comprende una o más ADN polimerasas, nucleósidos trifosfato, y opcionalmente una o más transcriptasas inversas.

Las condiciones de termociclación de la reacción en cadena de la polimerasa universal pueden ser de 40-65°C durante 10-30 minutos; después, aproximadamente 45 ciclos de 94-95°C durante 5-15 segundos, y 60°C durante 20-45 segundos. La reacción en cadena de la polimerasa puede ser una reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

Las figuras muestran:

La Figura 1A muestra secuencias de ácido nucleico de un ejemplo de un control positivo interno de ARN y un control positivo interno de ADN. La Figura 1B muestra los cebadores y las sondas utilizados en un ensayo de PCR descrito en la presente memoria.

La Figura 2 muestra la estructura de los controles positivos internos de ARN y los controles positivos internos de ADN.

La Figura 3A-B muestra ejemplos de componentes de un kit de ensayo de PCR descrito en la presente memoria.

La Figura 4 muestra un ejemplo de un polinucleótido de secuencia distintiva.

La Figura 5A-B muestra amplicones diana hipotéticos para *hmbs1* de *Bos taurus*. Los sitios de unión al cebador están subrayados. El sitio de unión a la sonda de cadena positiva está doblemente subrayado. A. Secuencia de tipo salvaje para *hmbs1* de *Bos taurus*; la longitud del amplicón es de 166 bases (SEQ ID NO: 21). B. Amplicón diana modificado con secuencias intermedias eliminadas. La longitud total del minímero es de 78 bases. La longitud del amplicón del minímero es de 61 bases (SEQ ID NO: 22).

La Figura 6A muestra las curvas de amplificación de un control de ARN de minímero sintético para BVDV.

La Figura 6B muestra las curvas de amplificación de un oligómero de ADN completo para BVDV (tamaño de amplicón de 206 bases).

Según se utilizan en la presente memoria, las formas singulares "un", "una", "uno" y "el" y "la" incluyen referentes en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

La PCR en tiempo real permite la amplificación específica y la detección de secuencias de ADN o ARN elegidas como diana. Esta técnica se basa en una mezcla de detección de cebador/sonda que se dirige específicamente a una secuencia de ADN o ARN. En presencia de ácido nucleico diana, cada ronda de amplificación por PCR da como resultado una señal cada vez mayor, por ejemplo, una señal fluorescente, que se puede detectar opcionalmente en tiempo real. Se deben abordar dos problemas al elegir la PCR en tiempo real (u otras metodologías de PCR) para el diagnóstico. En primer lugar, la posible presencia de inhibidores de PCR en muestras clínicas puede disminuir la eficacia de una reacción que conduce a falsos negativos. Para controlar dicha actividad, se pueden emplear controles positivos internos. Tales controles a menudo consisten en ADN o ARN exógeno que se agregan a muestras clínicas sin procesar antes de la purificación. Durante un evento de prueba, la generación de señal desde

el control positivo interno indica una extracción y purificación de ácidos nucleicos adecuadas, así como una amplificación adecuada. En segundo lugar, aunque muchos protocolos de PCR en tiempo real (u otros protocolos de PCR) finalizan rápidamente, sigue existiendo el inconveniente de que muchas pruebas a menudo requieren un protocolo de ciclación único, lo que significa que las pruebas deben "esperar en línea" mientras se ejecuta otra prueba. El uso de diferentes protocolos de termociclación para diferentes pruebas requiere adicionalmente que el operario cambie entre diferentes programas de ciclación, lo que lleva tiempo y es una fuente potencial de error del operario. Las pruebas de diagnóstico descritas en la presente memoria pueden utilizar un control positivo interno y/o una mezcla de detección de control de muestra interno y utilizar un protocolo de ciclación universal. Los resultados de tres de tales pruebas: BTV, MAP y BVDV se describen en los ejemplos de trabajo. Los protocolos y componentes normalizados en los sistemas de ensayo proporcionarán a los laboratorios una plataforma más eficaz y flexible para las metodologías de PCR, incluidas las metodologías de PCR en tiempo real.

Cebadores y sondas

Un cebador es un polinucleótido que es capaz de hibridar con un ácido nucleico diana o de control y sirve como un sitio de iniciación para la polimerización de nucleótidos (ARN o ADN) en condiciones adecuadas (p.ej., en presencia de cuatro nucleósidos trifosfato diferentes y una enzima termoestable para la polimerización, tal como una ADN polimerasa o una transcriptasa inversa) en un tampón y a una temperatura adecuada. No es necesario que un cebador tenga la secuencia exacta de un polinucleótido diana o de control, pero debe ser suficientemente complementaria para hibridar con un polinucleótido. Un sitio de unión del cebador es la región del polinucleótido diana o el polinucleótido de control al que se hibrida un cebador.

Un cebador se reasocia con otro ácido nucleico si el cebador, o una porción del mismo, hibrida con una secuencia de nucleótidos dentro del ácido nucleico. Un cebador puede hibridar completa o exclusivamente con esa secuencia de nucleótidos, pero no es necesario que un cebador hibride completamente o exclusivamente con esa secuencia de nucleótidos.

Los cebadores se seleccionan de manera que la mayoría de los amplicones detectados después de la amplificación sean de longitud completa. Es decir, resultan del cebado en los sitios esperados en cada extremo del polinucleótido diana o el polinucleótido de control, en oposición a los amplicones resultantes del cebado dentro del polinucleótido diana o el polinucleótido de control, que produce amplicones más cortos de lo esperado. Los cebadores se seleccionan de modo que al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de los amplicones sean de longitud completa.

Un par de cebadores es un conjunto de cebadores que incluye un cebador directo 5' que hibrida con el complemento del extremo 5' de la secuencia de nucleótidos que se va a amplificar y un cebador inverso 3' que hibrida con el extremo 3' de la secuencia de nucleótidos que se va a amplificar.

La razón molar de cebadores con respecto a polinucleótidos diana o polinucleótidos de control puede ser de aproximadamente 500:1 a aproximadamente 8.000:1. Otras razones molares incluyen aproximadamente 1.000:1, aproximadamente 1.100:1, aproximadamente 1.200:1, aproximadamente 1.300:1, aproximadamente 1.400:1, aproximadamente 1.500:1, aproximadamente 1.600:1, aproximadamente 1.700:1, aproximadamente 1.800:1, aproximadamente 1.900:1, aproximadamente 2.000:1, aproximadamente 2.500:1, aproximadamente 3.000:1, aproximadamente 3.500:1, aproximadamente 4.000:1, aproximadamente 4.500:1, aproximadamente 5.000:1, aproximadamente 5.500:1, aproximadamente 6.000:1, aproximadamente 6.500:1, aproximadamente 7.000:1, y aproximadamente 7.500:1.

Una sonda es un ácido nucleico capaz de unirse a un polinucleótido diana o de control de secuencia complementaria a través de uno o más tipos de enlaces químicos, p.ej., a través de la formación de enlaces de hidrógeno, de modo que se forma una estructura dúplex. Una sonda se une o hibrida con un sitio de unión a la sonda. La sonda puede estar marcada con una etiqueta detectable para permitir la detección de la sonda, particularmente después de que la sonda haya hibridado con su polinucleótido diana o su polinucleótido de control complementarios. Alternativamente, una sonda puede estar sin marcar, pero puede ser detectable por la unión específica con un ligando que está marcado, ya sea directa o indirectamente. Además, una sonda marcada se puede detectar después de ser hidrolizada por una enzima que tiene una actividad exonucleasa.

Una secuencia de cebador o sonda puede ser 100% complementaria a la secuencia diana o secuencia de control a la que hibrida o puede ser menos de 100% complementaria. En ciertas realizaciones, una secuencia de cebador o sonda tiene al menos 65% de identidad con el complemento de la secuencia de ácido nucleico diana o la secuencia de ácido nucleico de control a lo largo de una secuencia de al menos aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleótidos, más típicamente a lo largo de una secuencia en el intervalo de 10-30 nucleótidos, y a menudo a lo largo de una secuencia de al menos 14-25 nucleótidos, y más a menudo tiene al menos 75% de homología, al menos 85% de homología, al menos 90% de homología, al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de homología.

El diseño de cebadores y sondas que hibridan con un polinucleótido diana o un polinucleótido de control específicos está dentro del conocimiento práctico de la técnica. Los cebadores específicos para un polinucleótido diana o un

polinucleótido de control deben ser únicos para identificar un organismo específico, un grupo de organismos o un gen específico (p.ej., un gen o polinucleótido de un marcador de toxina o enfermedad específico). Los cebadores de PCR directos e inversos deberían ser capaces de hibridar con alta eficacia y especificidad con los polinucleótidos diana o los polinucleótidos de control en la muestra de prueba con reactividad cruzada con polinucleótidos no diana o no de control. Se puede buscar en los cebadores la reactividad cruzada con otros organismos o genes, por ejemplo, en una base de datos tal como la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica. La secuencia de polinucleótidos diana que se va a amplificar se debe conservar en el organismo. Se debe seleccionar un sitio conservado a lo largo de un sitio con una alta frecuencia de polimorfismos. El diseño de cebadores y sondas ha sido discutido en detalle, por ejemplo, por Uhl y Cockerill (2004) en *The fluorescence resonance energy transfer system*, pág. 295-306. Por Persing et al. (ed.), en *Molecular microbiology diagnostic principles and practice*. ASM Press, Washington DC; Hyndman y Mitsuhashi (2003) *PCR primer design*, pág. 81-88, por Bartlett & Stirling (ed.), en *Methods in molecular biology, PCR protocols*, 2ª ed. Humana Press, Totowa, N.J. Adicionalmente, se conocen cebadores y sondas adecuados para PCR para muchos organismos, polinucleótidos y genes.

PCR

La amplificación por medio de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un método de amplificación en el que la ciclación térmica consiste en ciclos de calentamiento y enfriamiento repetidos de la reacción para la fusión del ácido nucleico y la replicación enzimática de los ácidos nucleicos. Los protocolos de ciclación térmica de PCR son bien conocidos en la técnica. Típicamente, la PCR consiste en una serie de 20-40 ciclos. Por ejemplo, el ciclo puede incluir una etapa de desnaturalización, una etapa de reasociación (que permite la reasociación de los cebadores al molde de ADN o ARN de hebra sencilla) y una etapa de extensión/elongación. Cada etapa puede ocurrir a una temperatura particular, durante un período de tiempo particular y en condiciones de reacción particulares. Por ejemplo, la temperatura de la etapa de desnaturalización puede ser de aproximadamente 80, 85, 90, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100°C, la temperatura de la etapa de reasociación puede ser de aproximadamente 40, 50, 55, 60, 62, 65 o 70°C, y la temperatura de la etapa de extensión/elongación puede ser de aproximadamente 40, 50, 55, 60, 65, 70, 72 o 75°C.

Un ensayo de PCR puede ser una reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, que puede ser cuantitativa, y también se puede combinar con una reacción de transcriptasa inversa cuando se realiza una PCR de transcripción inversa. Otros tipos de ensayos de PCR que pueden utilizar los componentes descritos en la presente memoria incluyen, por ejemplo, PCR de inicio en caliente, reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa, reacción en cadena de la polimerasa múltiple, reacciones en cadena de la polimerasa con minicebadores, reacción en cadena de la polimerasa en fase sólida, reacción en cadena de polimerasa de contacto. También se pueden utilizar combinaciones de una o más de estas técnicas.

Polinucleótidos

Los polinucleótidos descritos en la presente memoria (también denominados en la presente memoria ácidos nucleicos, moléculas de ácido nucleico y secuencias de polinucleótidos o ácidos nucleicos, que incluyen, por ejemplo, cebadores, sondas, polinucleótidos de control, polinucleótidos diana, regiones de unión del cebador directo, regiones de unión de la sonda, regiones de unión del cebador inverso, promotores, o secuencia distintiva), pueden ser ácidos nucleicos de hebra sencilla o de doble hebra. Un polinucleótido puede ser ARN, ARNm, ADN, ADNc, ADN genómico o ARN genómico, ARN o ADN sintetizados químicamente, ARN transcrito *in vitro*, plásmidos o combinaciones de los mismos. Los polinucleótidos se pueden purificar sin otros componentes, tales como proteínas, lípidos y otros polinucleótidos. Por ejemplo, el polinucleótido puede estar purificado en 75%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%. Una molécula de ácido nucleico existente entre cientos a millones de otras moléculas de ácido nucleico dentro de, por ejemplo, bibliotecas de ADNc o genómicas, o secciones de gel que contienen un producto de la digestión con enzimas de restricción de ADN genómico no se debe considerar un polinucleótido aislado.

Los polinucleótidos descritos en la presente memoria pueden consistir en menos de aproximadamente 300, 200, 150, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10 o 5 (o cualquier intervalo entre aproximadamente 5 y aproximadamente 300) nucleótidos contiguos. Los polinucleótidos descritos en la presente memoria pueden consistir en más de aproximadamente 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o 300 (o cualquier intervalo entre aproximadamente 5 y 300) nucleótidos contiguos. Los polinucleótidos descritos en la presente memoria pueden comprender otras secuencias de nucleótidos, tales como secuencias que codifican conectores, secuencias señal, secuencias de transferencia de parada de TMR, dominios transmembrana o ligandos útiles en la purificación de proteínas tales como glutatión-S-transferasa, etiqueta de histidina y proteína A *Estafilocócica*.

Los polinucleótidos descritos en la presente se pueden aislar. Un polinucleótido aislado es un polinucleótido de origen natural que no es inmediatamente contiguo a una o ambas secuencias genómicas flanqueantes 5' y 3' con las que está asociado de forma natural. Los polinucleótidos aislados también incluyen moléculas de ácido nucleico no naturales.

Los polinucleótidos descritos en la presente pueden estar marcados. En la técnica se conocen marcas adecuadas y métodos para el marcaje de polinucleótidos, sondas y cebadores, e incluyen, por ejemplo, marcas radiactivas incorporadas por traslación de muescas o por quinasas, marcas de biotina, marcas fluorescentes, marcas

quimioluminiscentes, marcas bioluminiscentes, marcas de quelantes metálicos y marcas de enzimas.

Ensayo de mezcla de detección de polinucleótidos diana específicos (DMx)

Una mezcla de detección contiene cebadores y sondas específicos del ensayo para la amplificación y detección de polinucleótidos diana. "Específico del ensayo" significa que los cebadores y las sondas de la mezcla de detección están diseñados para amplificar una o más dianas polinucleotídicas conocidas (p.ej., una porción de un genoma de ARN o ADN de un microorganismo particular o un gen o polinucleótido particulares). En una realización, una diana de polinucleótido es un polinucleótido natural. Una diana de polinucleótido es un polinucleótido que está potencialmente presente en una muestra de prueba y para el cual el usuario del ensayo desea saber si el polinucleótido está presente en la muestra de prueba. Los cebadores y sondas específicos del ensayo para polinucleótidos diana detectan polinucleótidos diana y polinucleótidos diana de control positivo y no detectan otros polinucleótidos de control. Un polinucleótido diana no es un polinucleótido de control. La mezcla de detección de polinucleótidos diana específica del ensayo de ADN contiene uno o más cebadores (directo e inverso) y una o más sondas para dianas específicas de polinucleótidos de ADN y, opcionalmente, uno o más cebadores (directo e inverso) y una o más sondas para uno o más controles de muestra internos (CMI). Los cebadores y las sondas están presentes en un tampón. Una mezcla de detección de polinucleótidos diana específica del ensayo de ARN contiene uno o más cebadores (directo e inverso) y una o más sondas para dianas específicas de polinucleótidos de ARN y, opcionalmente, uno o más cebadores (directo e inverso) y una o más sondas para los uno o más CMI. Estos cebadores y sondas están opcionalmente presentes en un tampón seguro para ARN que tiene uno o más inhibidores de ARNasa. Una mezcla de detección de polinucleótidos diana específica del ensayo de ADN y ARN combinada contiene uno o más cebadores (directo e inverso) y una o más sondas para una o más dianas de polinucleótidos de ADN específicas, uno o más cebadores (directo e inverso) y una o más sondas para una o más dianas de polinucleótidos de ARN específicas, y opcionalmente, uno o más cebadores (directo e inverso) y una o más sondas para uno o más CPI, y opcionalmente, un tampón seguro frente a ARNasa.

Son adecuados varios tipos de sondas para su uso en los ensayos descritos en la presente memoria que incluyen, por ejemplo, sondas de nucleasa 5', sondas de hibridación FRET y sondas de balizas moleculares. Las sondas de nucleasa 5' (sondas de hidrólisis, sondas TaqMan®) son oligonucleótidos con un colorante fluorescente 5' y un colorante de extinción 3', o viceversa. Para generar una señal de detección, se deben eliminar los efectos del colorante de extinción sobre el colorante fluorescente. Esto se logra mediante (1) la unión de la sonda a la hebra de ácido nucleico complementaria y (2) la polimerasa (p.ej., polimerasa Taq) que escinde el extremo 5' de la sonda de nucleasa 5'.

Las sondas de hibridación FRET son un conjunto de dos sondas que se reasocian una al lado de la otra en una configuración de cabeza a cola sobre la molécula de ácido nucleico amplificada. La sonda aguas arriba tiene un colorante fluorescente en el extremo 3' y la sonda aguas abajo tiene un colorante de extinción en el extremo 5'. Cuando ambas sondas hibridan con la molécula de ácido nucleico amplificada, el colorante aceptor absorbe el colorante de fluorescencia. El colorante aceptor se excita y emite luz a una tercera longitud de onda, que se detecta. Cuando las sondas no se unen a la molécula de ácido nucleico amplificada, no se produce FRET. La sonda aguas abajo se puede fosforilar en el extremo 3' para evitar que se utilice como cebador por la polimerasa durante la amplificación.

Las sondas de balizas moleculares son sondas que tienen un colorante fluorescente en el extremo 5' y un colorante de extinción en el extremo 3' de la sonda. Una región en cada extremo de la sonda es complementaria consigo misma, de modo que a bajas temperaturas los extremos se reasocian creando una estructura en horquilla. Cuando los extremos de la sonda se reasocian entre sí, se extingue la fluorescencia del colorante informador. La región central de la sonda es complementaria al ácido nucleico diana o al ácido nucleico de control. A temperaturas más elevadas durante el ensayo de PCR, la sonda se une al ácido nucleico amplificado de manera que el colorante informador fluorescente se separa del colorante de extinción. A continuación, se puede detectar una señal de luz del colorante informador. Cuando no hay ácidos nucleicos amplificados disponibles para la hibridación, la sonda se reasociará consigo misma provocando la extinción de la señal fluorescente. Se pueden utilizar múltiples sondas de balizas moleculares con diferentes colorantes informadores para la detección de diferentes tipos de ácidos nucleicos amplificados.

Una marca es cualquier átomo o molécula que se utiliza para proporcionar una señal detectable y/o cuantificable. Se puede anclar una marca, directa o indirectamente, a un polinucleótido u otra molécula adecuada. Las marcas adecuadas que se pueden anclar a las sondas incluyen, pero no se limitan a, radioisótopos, fluoróforos, cromóforos, marcas de masa, partículas densas a los electrones, partículas magnéticas, marcas de espín, moléculas que emiten quimioluminiscencia, moléculas electroquímicamente activas, enzimas, cofactores y sustratos de enzimas. Un colorante fluorescente es cualquier colorante que emite radiación electromagnética de longitud de onda más larga mediante un mecanismo fluorescente tras la irradiación por una fuente de radiación electromagnética, tal como una lámpara, un fotodiodo o un láser.

Mezcla maestra

Una mezcla maestra comprende una o más polimerasas (p.ej., ADN polimerasa, transcriptasa inversa y moléculas

con actividad ADN polimerasa y transcriptasa inversa) y nucleótidos y también puede contener un tampón de PCR. Una mezcla maestra puede ser específica para secuencias de polinucleótidos tanto de ADN como de ARN. Una mezcla maestra puede ser un componente universal de los kits de ensayo descritos en la presente memoria. Es decir, se puede utilizar una mezcla maestra con cada mezcla de detección de polinucleótidos diana específica del ensayo.

La mezcla maestra puede contener un colorante de referencia fluorescente pasivo. El colorante fluorescente pasivo no participa en la reacción de PCR ni en la detección del producto de reacción. Su espectro de emisión se distingue del espectro de emisión de todas las demás marcas fluorescentes utilizadas en la reacción de PCR. Por ejemplo, tal colorante pasivo de un Colorante de Referencia ROX. El uso de un colorante de referencia fluorescente pasivo permite la normalización para compensar las variaciones en la fluorescencia entre los pocillos.

Mezcla maestra de ADN

Una mezcla maestra de ADN contiene una o más ADN polimerasas (es decir, ADN polimerasa dependiente de ADN), mezcla de dNTP y uno o más tampones de PCR. Una mezcla maestra de ADN contiene una o más ADN polimerasas termoestables adecuadas para reacciones de PCR, por ejemplo, ADN polimerasa *Taq*, que puede ser una enzima nativa purificada de *Thermus aquaticus* y/o una forma genéticamente modificada o químicamente modificada de la enzima, p.ej., AMPLITAQ o FAST START, o una enzima inactivada transitoriamente por un ligando, aptámero o anticuerpo, p.ej., APTATAQ. Se pueden utilizar otras enzimas polimerasas adecuadas, incluidas, p.ej. las de *Thermus thermophilus*. Los intervalos de concentración de una o más polimerasas pueden variar de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 5,0 unidades por 100 µl de mezcla de reacción.

Una mezcla de dNTP comprende desoxirribonucleótidos trifosfato de dATP, dCTP, dGTP y dTTP. Opcionalmente, una mezcla de dNTP puede comprender dUTP, además de dTTP, o en lugar de dTTP. En una realización, dGTP puede ser sustituido por 7-desaza-2'-desoxi GTP y 7-desaza-2'-desoxi ATP puede ser sustituido por dATP. Además, 2'-desoxi ITP puede ser sustituido por cualquier dNTP. Los cuatro dinucleótidos pueden estar presentes en una mezcla de reacción de PCR a una concentración de aproximadamente 20 a aproximadamente 200 µM y a un pH de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 8,0, por ejemplo aproximadamente 7,0.

Uno o más tampones intermedios pueden formar parte de la mezcla maestra de ADN. Las una o más polimerasas, la mezcla de dNTP y los tampones pueden estar presentes en forma de 2 o 3 componentes individuales diferentes para mezclarlos en el momento del ensayo o pueden estar presentes en una mezcla. El tampón puede ser un tampón biológico adecuado tal como Tris-HCl o Tricina, que proporciona un pH en el intervalo de aproximadamente 7,4 a aproximadamente 8,8. La concentración de tampón puede ser de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 mM para Tris-HCl y de aproximadamente 250 a aproximadamente 350 mM para Tricina.

El tampón también puede comprender una fuente de magnesio tal como $MgCl_2$ o estar libre de Mg^{2+} . El tampón puede contener de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 7,0 mM Mg^{2+} . Un tampón también puede contener, por ejemplo, KCl de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 mM para facilitar la reasociación del cebador. También pueden estar presentes en el tampón β-mercaptoetanol a aproximadamente 10, 20, 30, 40 o 50 mM, y gelatina o albúmina de suero bovino (BSA) a un intervalo de concentración de 0,01-0,1%. También pueden estar presentes en un tampón detergentes no iónicos tales como TWEEN® (polisorbato) 20, Triton X-100 o Laureth 12 a un intervalo de concentración de aproximadamente 0,03 a aproximadamente 0,1% para estabilizar las enzimas.

Mezcla maestra de ARN

Una mezcla maestra de ARN contiene una o más transcriptasas inversas (es decir, ADN polimerasa dependiente de ARN) (p.ej., transcriptasa inversa del virus de la mieloblastosis aviar; transcriptasa inversa MMLV) y una o más ADN polimerasas termoestables para la posterior amplificación de ADNc. Ambas actividades de transcriptasa inversa y ADN polimerasa pueden estar presentes en una sola enzima, p.ej., HawkZO5. La mezcla maestra de ARN también comprende una mezcla de dNTP como se describió anteriormente. La mezcla maestra de ARN también puede comprender uno o más tampones. Las una o más transcriptasas inversas, polimerasas, mezcla de dNTP y tampones pueden estar presentes en 2, 3 o 4 componentes individuales diferentes para mezclarse en el momento del ensayo o pueden estar presentes en una mezcla. Los uno o más tampones pueden ser los mismos que para la mezcla maestra de ADN o pueden ser diferentes. El tampón debe soportar ambas actividades, la transcriptasa inversa y la DNA polimerasa, y debe ser compatible con todos los demás componentes del sistema. La mezcla maestra de ARN también puede comprender, por ejemplo, Mg^{2+} , Mn^{2+} , KCl, ARNasa H, inhibidores de ARNasa y/o agua libre de ARNasa.

Mezcla maestra combinada de ADN y ARN

En una realización descrita en la presente memoria, se puede utilizar una sola mezcla maestra para ensayos en los que debe detectarse ARN o ADN, o tanto ARN como ADN. La mezcla maestra combinada de ADN y ARN comprende una o más ADN polimerasas termoestables, dNTP, uno o más tampones, y una o más transcriptasas inversas termoestables. Ambas actividades de transcriptasa inversa y ADN polimerasa pueden estar presentes en una única enzima, p.ej., Hawk ZO5. Adicionalmente, la mezcla maestra combinada de ADN y ARN puede comprender cualquiera de los componentes adicionales comentados para la mezcla maestra de ARN y la mezcla

maestra de ADN. El uso de una mezcla maestra combinada de ADN y ARN simplifica la manipulación y el flujo de trabajo y reduce la cantidad de disoluciones suministradas en un kit. Una ventaja de tal simplificación es una reducción en la probabilidad de error del usuario.

Control positivo agrupado (CPA)

5 Un control positivo agrupado contiene controles de polinucleótidos diana para todos los ensayos diana de ADN y/o ARN. Un control positivo diana agrupado puede ser un componente universal de los kits de ensayo descritos en la presente memoria. Es decir, se puede usar un control positivo diana agrupado con cada mezcla de detección específica del ensayo.

10 En una realización descrita en la presente memoria, el control positivo diana agrupado contiene un polinucleótido de control positivo diana para cada diana de polinucleótido que posiblemente podría analizarse utilizando un kit descrito en la presente memoria.

En otra realización descrita en la presente memoria, el CPA contiene opcionalmente un trazador de contaminación de secuencia distintiva.

15 En una realización adicional, la secuencia distintiva se combina con un único polinucleótido de control positivo (CP) diana, o con 2, 3, 4, 5, 6, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200 o más polinucleótidos de control positivo diana.

20 Un control positivo diana agrupado puede por lo tanto comprender 2, 3, 4, 5, 6, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200 o más polinucleótidos de control positivo diana. Un polinucleótido de control positivo diana es un único polinucleótido de control positivo diana. Un polinucleótido de control positivo diana comprende una porción de una secuencia diana de polinucleótido (p.ej., un organismo, gen o polinucleótido que se va a detectar en una muestra de prueba) que se amplificará con cebadores específicos de manera que los amplicones amplificados sean detectables con una o más sondas.

25 En una realización, un polinucleótido de control positivo diana es una porción de un ácido nucleico natural (p.ej., una porción de un genoma de un virus, bacteria o eucariota). Un polinucleótido de control positivo diana comprende una región de unión del cebador directo, una región de unión de la sonda y una región de unión del cebador inverso. Un polinucleótido de control positivo diana puede tener una longitud de aproximadamente 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300 o más ácidos nucleicos. Un polinucleótido de control positivo diana puede tener una longitud de aproximadamente 300, 250, 200, 175, 150, 125, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 o menos ácidos nucleicos.

30 Por ejemplo, un polinucleótido de control positivo diana para BVDV se amplificará cuando se utilice una mezcla de detección de polinucleótidos diana específica del ensayo que comprende uno o más cebadores directos y uno o más cebadores inversos específicos para BVDV y una o más sondas específicas para BVDV. El polinucleótido de control positivo diana de BVDV está presente solo o en un control positivo diana agrupado (que comprende de aproximadamente 2 a aproximadamente 200 o más nucleótidos de control positivos diana diferentes). El polinucleótido de control positivo diana de BVDV es el único polinucleótido de control positivo diana que se amplificará cuando se utilice una mezcla de detección de BVDV. El polinucleótido de control positivo diana de BVDV no se amplificará cuando se utilice una mezcla de detección para otros organismos, genes o polinucleótidos.

Los polinucleótidos de control positivo diana agrupados se pueden diseñar mediante las técnicas descritas anteriormente para cebadores y sondas. Adicionalmente, tales polinucleótidos son conocidos en la técnica para muchos organismos o genes.

40 Los ejemplos de dianas a partir de las cuales se pueden diseñar polinucleótidos de control positivo diana incluyen, por ejemplo, *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP) *Actinobacillus seminis*, *Anaplasma* spp., *Anaplasma phagocytophilum*, Encefalomiелitis Aviar (AE), Influenza Aviar (AI), Virus de la Leucosis Aviar, Pneumovirus Aviar (APV), Reovirus Aviar (REO), *Anaplasma platys*, *Babesia* spp., *Babesia canis canis*, *Babesia canis rossi*, *Babesia canis vogeli*, *Babesia conradae*, *Babesia felis*, *Babesia gibsoni*, *Bartonella* spp., *Bartonella henselae*, *Blastomyces dermatitidis*, Virus de la lengua azul, *Bordetella bronchiseptica*, *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii*, Virus del Herpes Bovino 1, Virus de la Leucemia Bovina (BLV), Virus de la Diarrea Viral Bovina (BVDV), *Brucella abortus*, *Brucella canis*, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, BVDV, retrovirus caprino, *Calicivirus* spp., *Campylobacter* spp., *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Candidatus Mycoplasma haematoparvum*, *Candidatus Mycoplasma haemominutum*, *Candidatus Mycoplasma turicensis*, Adenovirus canino 1, Adenovirus canino 2, Coronavirus canino spp., Virus del moquillo canino (CDV), *Mycoplasma hemotrópico canino*, Influenza canina (H3N8), Parvovirus canino, Parvovirus canino 2 (CPV-2), coronavirus entérico canino (CECoV), Gusano del corazón, Herpesvirus canino 1, Herpesvirus caninos spp., Virus de la parainfluenza canina, Coronavirus respiratorio canino (CRCoV), Retrovirus caprino (CAE), virus de la encefalitis artrítica caprina (CAEV), *Chlamydia* spp., *Chlamydophila abortus*, *Chlamydophila felis*, *Circovirus* spp., virus de la fiebre porcina clásica (CSFV), *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile*, Toxina A de *Clostridium difficile*, Toxina B de *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, enterotoxina de *Clostridium perfringens* (CPE y CPEA), *Coccidioides* spp., Pleuroneumonía Bovina Contagiosa (CBPP), *Coronavirus* spp., *Cryptococcus* spp., *Cryptosporidium* spp., *Cytauxzoon felis*, *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia ewingii*, *Ehrlichia* spp., *Encephalitozoon cuniculi*, Virus de la leucosis bovina enzoótica, fiebre efímera (3 días de

- enfermedad) (virus *Ephemerovirus*), enfermedad hemorrágica epizootica (EHD), virus del herpes equino spp., virus del herpes equino 1, virus del herpes equino 4, anemia infecciosa equina, virus de la gripe equina A, arteritis equina viral (EVA), *Fasciola hepatica*, Calicivirus spp. felino, Herpesvirus spp. felino, Herpesvirus tipo 1 felino, Coronavirus felino (FCoV), Micoplasma hemotrópico felino, Gusano del corazón felino, Herpesvirus spp. felino, Calicivirus spp. felino, virus de la panleucopenia felina, Parvovirus spp. felino, Virus de la inmunodeficiencia felina (FIV) Tipos A, B, C, D, E y F, Virus de la Leucemia Felina, Fiebre Aftosa (FMD), *Giardia* spp., Virus de la gripe H1N1, Virus Hantaan, hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C, *Hepatozoon* spp., *Hepatozoon americanum*, *Hepatozoon canis*, *Histoplasma capsulatum*, *Hypoderma* spp., Bursitis infecciosa (virus de la enfermedad infecciosa de la bolsa (IBDV)), Encefalitis japonesa, Virus de la arteritis equina, Coronavirus equino, Herpesvirus equino tipo 1 y 4, Anemia infecciosa equina, Virus de la influenza equina, Mieloencefalitis equina protozoaria, Rotavirus equino, Enfermedad de Johne (*Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*), Prueba de Knott de Microfilaria, Virus Kunjin, *Lawsonia intracellularis*, *Leishmania* spp., *Leptospira* spp., *Fasciola hepatica*, Virus Maedi-visna (MVV), miositis masticatoria, Melioidosis (*Burkholderia pseudomallei*), *Mycobacterium* spp., *Mycoplasma meleagridis*, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycoplasma* spp., *Mycoplasma agalactiae*, *Mycoplasma cynos*, *Mycoplasma felis*, *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma haemofelis*, *Mycoplasma haemocanis*, *Mycoplasma hyponeumoniae*, *Mycoplasma ovis*, *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma synoviae*, *Neorickettsia risticii*, *Neospora* spp., *Neospora caninum*, enfermedad de Newcastle, Virus Nipah, Paramixovirus de ofidios, Parvovirus porcino, síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS), Pestivirus spp., Virus Pseudorrabia, Fiebre Q (*Coxiella burnetii*), Calicivirus spp. de conejo, *Rhodococcus equi*, Fiebre maculosa de las Montañas Rocosas (*Rickettsia rickettsia*), Virus del río Ross, Rotavirus *Sarcocystis neurona*, Virus de Schmollenberg (SBV), Diarreas neonatales "Scour", Rotavirus spp., *Salmonella* spp., *Salmonella enteritidis* (SE), Virus Simbu, *Streptococcus equi* subsp. *equi* (Distemper equino), *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*, Virus de la Influenza Porcina (SIV), *Taylorella equigenitalis*, *Toxoplasma gondii*, *Trichinella* spp., *Tritrichomonas foetus*, Virus del Nilo occidental, parásitos, helmintos, anquilostomiasis, lombriz intestinal, gusano lombriz, tenia, gusano del corazón, gusano pulmonar. Las dianas a partir de las cuales se pueden diseñar polinucleótidos de control positivo diana incluyen adicionalmente ácidos nucleicos relacionados con enfermedades de un vertebrado, mamífero, animal aviar o ser humano, tales como alelos genéticos, marcadores de ácidos nucleicos, genes y transcritos de ARN asociados con afecciones médicas o resistencia a las mismas. Cualquier combinación de polinucleótidos de control diana se puede agrupar a partir de esta lista o de dianas conocidas en la técnica.
- El número de polinucleótidos de control positivo diana agrupados o polinucleótidos de control positivo diana en el ensayo debería estar cerca del límite inferior de detección para el ensayo, aunque se encuentra en un número suficientemente alto para proporcionar resultados positivos consistentes. El número de polinucleótidos de control positivo diana puede ser de aproximadamente 1, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 500, 1.000, 2.500, 5.000, 10.000 (o cualquier intervalo entre aproximadamente 1 y 10.000) o más. El número de polinucleótidos de control positivo diana puede ser de aproximadamente 10.000, 5.000, 2.500, 1.000, 500, 200, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10, 5 (o cualquier intervalo entre aproximadamente 10.000 y 1) o menos. Los ejemplos de intervalos del número de polinucleótidos de control positivo diana incluyen de aproximadamente 10 a aproximadamente 50; de aproximadamente 50 a aproximadamente 500; de aproximadamente 10 a aproximadamente 100; y de aproximadamente 10 a aproximadamente 1.000.
- Los cebadores directos, los cebadores inversos y las sondas para una mezcla de detección de polinucleótidos diana específica del ensayo también se pueden diseñar individualmente para cada una de estas dianas.
- La secuencia distintiva es un trazador de contaminación con un único control positivo (CP) o con un CPA. El polipéptido de secuencia distintiva es un polinucleótido aleatorio, artificial o natural. El polinucleótido de secuencia distintiva no se amplifica de manera cruzada con ninguno de los otros polinucleótidos o controles en el sistema de ensayo. En la Figura 4 se muestra un ejemplo de una secuencia distintiva. El polinucleótido de secuencia distintiva puede estar presente a una concentración molar igual o superior que uno o más de los polinucleótidos de control positivo diana en el CPA. Por ejemplo, la concentración molar del polinucleótido de secuencia distintiva puede ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 50, 75, o 100 veces o superior que la concentración molar de uno o más de los polinucleótidos de control positivo diana. Se puede utilizar una concentración molar más alta para asegurar que la amplificación y detección del polinucleótido de secuencia distintiva es más sensible que la detección de los polinucleótidos de control positivo diana. Por lo tanto, la probabilidad de detección de una contaminación con CPA se maximiza.
- El polinucleótido de secuencia distintiva se puede utilizar de varias maneras. Primero, cuando se sospecha que existe contaminación cruzada con CPA o un solo CP (es decir, si se sospecha que el CPA se ha introducido en otras soluciones de almacenamiento o en el entorno de trabajo general), se puede establecer una prueba para determinar si la secuencia distintiva está presente y es amplificable. En un segundo uso, se podría hacer una multiplexación de secuencia distintiva con cada ensayo, permitiendo así la detección de cualquier contaminación potencial con CP o CPA concurrentemente con la detección de un polinucleótido diana específico. En este caso, se requeriría un color de sonda fluorescente adicional y un canal de color adicional en la máquina de PRC.
- Una mezcla de detección de secuencia distintiva comprende cebadores (directo e inverso) y una o más sondas que se pueden utilizar para amplificar y detectar la secuencia distintiva. Opcionalmente, la mezcla de detección de secuencia distintiva se puede combinar con una mezcla de detección de polinucleótido diana específica del ensayo.

Una realización descrita en la presente memoria proporciona una composición de control positivo diana agrupado que comprende dos o más polinucleótidos de control positivo diana para dos o más polinucleótidos diana y uno o más polinucleótidos de secuencia distintiva. La composición puede comprender 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200 o más polinucleótidos de control positivo diana para 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200 o más polinucleótidos diana. Los dos o más polinucleótidos de control positivo diana para dos o más polinucleótidos diana pueden comprender polinucleótidos de control positivo diana tanto de ADN como de ARN. Los uno o más polinucleótidos de control positivo diana pueden ser mínimos (véase a continuación).

También se describe en la presente memoria un método para analizar la contaminación de una muestra de PCR que comprende cargar uno o más recipientes con: (a) una muestra que se va a analizar para determinar la contaminación; (b) una mezcla de detección para una secuencia distintiva; y (c) una mezcla maestra que comprende una o más polimerasas, nucleósidos trifosfato, y opcionalmente una o más transcriptasas inversas; y someter los uno o más recipientes a condiciones de reacción en cadena de la polimerasa.

Mezcla de detección de control de muestra interno (Control de integridad de la muestra) (CIM)

Una mezcla de detección de CIM amplifica y detecta regiones conservadas de ARN o ADN eucariótico, por ejemplo, ADN 18S. Los cebadores y la sonda de CIM se pueden diseñar para que se unan a uno o más polinucleótidos eucarióticos conservados de animales de interés, p.ej., bóvidos, seres humanos, aves, équidos, félidos, cánidos o muridos o combinaciones de los mismos. Este control se utiliza para confirmar la integridad del ADN genómico del paciente o del sujeto, así como la extracción satisfactoria de la muestra del paciente o el sujeto. Este control se puede ejecutar en un tubo/pocillo separado o se puede multiplexar y ejecutar con cada ensayo de polinucleótido diana específico del ensayo.

Los ejemplos de cebadores y sondas de CIM incluyen cebadores y sondas para ADN 18S eucariótico tales como:

E18S-41f GATTAAGCCATGCATGTCTAAGTACG 59.2 (SEQ ID NO: 15)

E18S-123r CAAAGGAACCATAACTGATTTAATGAGC 60.4 (SEQ ID NO: 16) Sonda TaqMan

E18S-67p CACGGCCGGTACAGTGAAACTGCG 70.1 (SEQ ID NO: 17).

Se pueden utilizar otros cebadores y sondas que son específicos para el ADN 18S eucariótico. Además, se puede utilizar cualquier otro cebador directo, cebador inverso y sonda específica para polinucleótidos eucarióticos conservados (ADN y ARN correspondiente), que son bien conocidos en la técnica, en los métodos descritos en la presente memoria. Véase Parra et al., *Bioinformatics*, 23:1061 (2007), que muestra 458 polinucleótidos eucarióticos centrales conservados que se pueden utilizar en los métodos descritos en la presente memoria. Véase también, Koonin et al., *Genome Biol.* 5:R7 (2004), que muestra grupos ortólogos eucarióticos (KOG) que se pueden utilizar como polinucleótidos eucarióticos conservados en los métodos descritos en la presente memoria. Tanto las secuencias que codifican proteínas como las secuencias no codificantes se pueden utilizar como polinucleótidos eucarióticos conservados. Un polinucleótido eucariótico conservado es una secuencia de polinucleótidos en la que se producen secuencias (ARN y ADN) similares (más de 95, 96, 97, 98, 99% de homología) o idénticas (100% de homología) en al menos 2, 3, 4, 5, 6 o más especies. Un polinucleótido eucariótico conservado puede ser, p.ej., un polinucleótido eucariótico ultraconservado (secuencias que comparten una identidad de 100% entre seres humanos, ratones y ratas). Véase, p.ej., Bejerano et al., *Science*, 304(5675): 1321 (2004); Reneker et al. "Long identical multispecies elements in plant and animal genomes" *PNAS* 109 (19): 1183 (2012).

Un experto en la técnica puede diseñar cebadores y sondas que sean específicos para polinucleótidos eucarióticos conservados. Los ejemplos de polinucleótidos eucarióticos conservados incluyen genes constitutivos (p.ej., GADPH, ACTB, UBC) y elementos repetitivos. Una mezcla de detección de control de muestra interno comprende uno o más cebadores (directo e inverso) y una o más sondas que se pueden utilizar para amplificar y detectar regiones conservadas de polinucleótidos eucarióticos conservados, tales como, por ejemplo, ADN 18S. Opcionalmente, la mezcla de detección de control de muestra interno se puede combinar con una mezcla de detección de polinucleótido diana específica del ensayo.

Mezclas de detección de control de calidad

Los ensayos y kits descritos en la presente memoria pueden incluir adicionalmente mezclas de detección adicionales para controles tales como un control positivo interno, un control de contaminación de control positivo (p.ej., secuencia distintiva), un control de contaminación ambiental (p.ej., PanB) o combinaciones de los mismos. Las mezclas de detección de control de calidad son componentes universales de los kits de ensayo descritos en la presente memoria. Es decir, una mezcla de detección de control de calidad es compatible con los otros componentes universales del sistema de prueba de PCR, por ejemplo, las una o más mezclas maestras. Se pueden combinar una o más de las mezclas de detección de control de calidad con cualquier mezcla de detección de polinucleótido diana específica del ensayo.

Control Positivo Interno (CPI)

Un control positivo interno consiste en uno o más pares de polinucleótidos no diana sintéticos de ADN y ARN que se pueden utilizar como un control de extracción y/o de amplificación. Un control positivo interno puede ser un componente universal de los kits de ensayo descritos en la presente memoria. Es decir, se puede utilizar un control positivo interno con cada mezcla de detección de polinucleótidos diana específica del ensayo. Un polinucleótido de CPI puede ser de hebra sencilla, o parcialmente de doble hebra, o completamente de doble hebra.

Un par de CPI de ADN y ARN comparten uno o dos de tres elementos de secuencia: (1) una región de unión del cebador directo; (2) una región de unión de la sonda; y (3) una región de unión a cebador inverso. Véanse las Figuras 1A, 2. Es decir, un CPI de ADN puede comprender una región de cebador directo que es igual o similar al CPI de ARN (p.ej., cebador directo 1, pero una sonda y una región de cebador inverso diferentes tales como una región de sonda 1 y una región de cebador inverso 3 para el CPI de ADN, mientras que el CPI de ARN tiene región de sonda 2 y una región de cebador inverso 3). El CPI de ADN y el CPI de ARN tienen uno o dos elementos de secuencia que son diferentes entre sí. Téngase en cuenta que el CPI de ARN está compuesto de ácidos ribonucleicos, mientras que el CPI de ADN está compuesto por ácidos desoxirribonucleicos. Por lo tanto, cuando una región es la "misma" entre un CPI de ADN y un CPI de ARN, el CPI de ADN contiene una timina en una posición, pero el ARN contiene un uracilo en esa posición. Las regiones se consideran las "mismas" incluso a pesar de que el CPI de ARN tiene un uracilo en una posición y el CPI de ADN contiene una timina en la posición correspondiente. Véase, p.ej., la Figura 1A, donde el sitio de unión del cebador inverso y los sitios de unión de la sonda son los "mismos".

Lo mismo significa 100% de homología en donde una timina en el ADN se considera complementaria al uracilo en el ARN. Similar significa que las regiones de CPI de ADN y de ARN tienen aproximadamente 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% o más homología entre las regiones, donde la timina en el ADN es considerada 100% homóloga al uracilo en el ARN. Diferentes regiones de unión del cebador o regiones de unión de la sonda comprenden menos de aproximadamente 60, 50, 40, 30, 20 o 10% de homología entre dos regiones.

Las una o dos regiones de unión del cebador directo, regiones de unión del cebador inverso y regiones de unión de la sonda diferentes combinadas con una o dos regiones de unión del cebador directo, regiones de unión del cebador inverso y regiones de unión de la sonda iguales o similares entre el CPI de ADN y el CPI de ARN permiten la diferenciación de la amplificación del CPI de ARN o del CPI de ADN.

El porcentaje de identidad de secuencia tiene un significado reconocido en la técnica y existen numerosos métodos para medir la identidad entre dos secuencias de polipéptidos o de polinucleótidos. Véanse, p.ej., Lesk, Ed., Computational Molecular Biology, Oxford University Press, Nueva York, (1988); Smith, Ed., Biocomputing: Informatics And Genome Projects, Academic Press, Nueva York, (1993); Griffin & Griffin, Eds., Computer Analysis Of Sequence Data, Parte I, Humana Press, Nueva Jersey, (1994); von Heinje, Sequence Analysis In Molecular Biology, Academic Press, (1987); y Gribkov & Devereux, Eds., Sequence Analysis Primer, M Stockton Press, Nueva York, (1991). Los métodos para alinear polinucleótidos o polipéptidos están codificados en programas informáticos, incluyendo el paquete de programas GCG (Devereux et al., Nuc. Acids Res. 12: 387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul et al., J. Molec. Biol. 215:403 (1990)), y el programa Bestfit (Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711) que utiliza el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (Adv. App. Math., 2:482-489 (1981)). Por ejemplo, se puede usar el programa informático ALIGN que emplea el algoritmo FASTA, con una búsqueda de hueco afín con una penalización de abertura de hueco de -12 y una penalización de extensión de hueco de -2.

Cuando se utiliza cualquiera de los programas de alineamiento de secuencias para determinar si una secuencia particular es, por ejemplo, idéntica en aproximadamente 95% a una secuencia de referencia, los parámetros se establecen de manera que el porcentaje de identidad se calcule sobre la longitud completa del polinucleótido de referencia y que se permitan huecos en la identidad de hasta 5% del número total de nucleótidos en el polinucleótido de referencia.

Un experto en la técnica puede diseñar una "barra de herramientas de secuencia" de regiones de unión del cebador directo, regiones de unión de la sonda y regiones de unión del cebador inverso. Véase la Figura 2. El intercambio de regiones de unión del cebador y de la sonda iguales o similares entre CPI de ADN y CPI de ARN aumenta la eficacia de elaboración.

La secuencia de la región de unión del cebador directo, la región de unión del cebador inverso y la región de unión de la sonda se puede determinar mediante cualquier método conocido por los expertos en la técnica para determinar una secuencia aleatoria de cuatro posibilidades (A, T, G y C). Los ejemplos de tales métodos incluyen, pero no se limitan a, el uso de un soporte lógico informático diseñado para producir secuencias de nucleótidos aleatorias.

La secuencia de control positivo interno no debe tener identidad de nucleótidos significativa con ninguna secuencia de nucleótidos natural conocida, lo que significa que las secuencias de pares de bases del sitio de unión del cebador directo y el sitio de unión del cebador inverso se diseñan de modo que no hibriden con secuencias de nucleótidos que se producen naturalmente en una región amplificable por PCR del genoma de un solo organismo. Por lo tanto,

los cebadores directo e inverso no deberían, al combinarse, ser típicamente capaces de amplificar una secuencia de origen natural a las temperaturas de hibridación y los tiempos de extensión de la polimerasa utilizados típicamente en la PCR, tal como la PCR en tiempo real.

Los cebadores y las sondas utilizados con el polinucleótido de control positivo interno se pueden diseñar con características específicas para ciertos tipos de ensayos de PCR y se pueden diseñar utilizando un soporte lógico informático tal como Primer Express. Los ejemplos de estas características incluyen, pero no se limitan a, el tamaño del amplicón y la temperatura de fusión del cebador. Los cebadores y las sondas están diseñados para que sean compatibles durante la amplificación sin la formación de dímeros de cebadores.

Un CPI de ARN se puede fabricar de dos maneras. Primero, se puede elaborar un CPI de ARN utilizando la síntesis química. Alternativamente, se puede elaborar un CPI de ARN preparando primero un molde de ADN que incorpore un promotor (tal como un promotor de T7), transcribiendo después este molde de ADN *in vitro* con ARN polimerasa para preparar el CPI de ARN deseado. El molde de ADN puede ser de doble hebra (ADNdh) en al menos la región promotora. El promotor se produce en el extremo 5' (aguas arriba de la región de cebador directo) del molde de ADN para preparar el CPI de ARN.

Se pueden utilizar varios promotores para la región promotora. La región promotora puede comprender entre aproximadamente 15 y aproximadamente 250 nucleótidos, por ejemplo, entre aproximadamente 17 y aproximadamente 35 nucleótidos, de un promotor natural, una región promotora consenso, o una región promotora artificial. Véase, p.ej., Alberts et al. (1989) en *Molecular Biology of the Cell*, 2ª ed. (Garland Publishing, Inc.). Se pueden utilizar promotores procarióticos, promotores eucarióticos, promotores de fagos o virus. Las regiones promotoras representativas incluyen, por ejemplo, T7, T3 y SP6. Véase, p.ej., Chamberlin y Ryan, *The Enzymes* (ed. P. Boyer, Academic Press, Nueva York) (1982) pág. 87-108. La secuencia promotora puede ser, por ejemplo, secuencia promotora de T7 que comprende al menos los nucleótidos -17 a +6 de una secuencia promotora de T7 de tipo salvaje, unida a aproximadamente 10, 20 o 30 nucleótidos de la secuencia flanqueante aguas arriba, concretamente la secuencia que flanquea el promotor de T7 aguas arriba. La secuencia flanqueante aguas abajo adicional, concretamente la secuencia flanqueante del promotor de T7 aguas abajo, p.ej. los nucleótidos +7 a +10, también se puede utilizar. Por ejemplo, el promotor puede comprender los nucleótidos -50 a +10 de una secuencia promotora de T7. Un promotor de T7 puede comprender 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3' (SEQ ID NO: 10). En algunas realizaciones, un CPI comprende una secuencia espaciadora intermedia entre la región promotora opcional, la región de unión del cebador directo, la región de unión de la sonda, la región de unión del cebador inverso o combinaciones de los mismos. Las longitudes adecuadas de las secuencias espaciadoras intermedias pueden tener aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500 o más bases de ácido nucleico. Las secuencias espaciadoras intermedias también pueden tener aproximadamente 500, 400, 300, 250, 200, 150, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 12, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 o menos bases de ácido nucleico. Las secuencias espaciadoras se pueden diseñar para que no interfieran en la amplificación o para aumentar el grado de amplificación en comparación con la omisión de la secuencia espaciadora. Las secuencias espaciadoras no son homólogas (es decir, no hibridan sustancialmente) con los ácidos nucleicos diana.

La longitud de cada una de las regiones de unión del cebador directo, la región de unión del cebador inverso y la región de unión de la sonda puede ser de aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 o más nucleótidos. Estas regiones también pueden tener aproximadamente 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 50, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5 o menos nucleótidos. La longitud de cada región puede ser de aproximadamente 10 a aproximadamente 50, o de aproximadamente 15 a aproximadamente 30, o de aproximadamente 20 a aproximadamente 30 nucleótidos. La longitud de un CPI completo puede tener aproximadamente 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 215, 220, 230, 240, 250, 300, 400, 500 o más nucleótidos. Un CPI completo también puede tener aproximadamente 500, 400, 300, 250, 240, 230, 220, 215, 210, 200, 190, 180, 170, 160, 150, 140, 130, 120, 110, 100, 95, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30 o menos nucleótidos. La longitud de un CPI completo puede ser de aproximadamente 50 a aproximadamente 100, de aproximadamente 60 a aproximadamente 90, de aproximadamente 70 a aproximadamente 80, de aproximadamente 100 a aproximadamente 200, o de aproximadamente 150 a 250 nucleótidos. La complementariedad de la porción de hibridación de la región de unión del cebador directo al cebador directo, la porción de hibridación de la región de unión de la sonda a la sonda, y la porción de hibridación de la región de unión del cebador inverso al cebador inverso es de al menos aproximadamente 75%, 80 %, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%.

Una mezcla de detección de CPI contiene cebadores (directo e inverso) y sonda específicos para uno o más CPI de ADN o uno o más CPI de ARN, dependiendo de si el ensayo específico es una prueba de ARN (p.ej., una prueba de un retrovirus) o una prueba de ADN (p.ej., una prueba de ADN bacteriano). Por ejemplo, una mezcla de detección puede comprender un cebador directo que se une a la región de unión del cebador directo del CPI, una sonda que se une a la región de unión de la sonda del CPI, un cebador inverso que se une a la región de unión del cebador inverso del CPI. Opcionalmente, una mezcla de detección de CPI contiene cebadores (directo e inverso) y sondas para uno o más CPI de ADN y uno o más CPI de ARN. Los cebadores y sondas de CPI están presentes en un tampón y, opcionalmente, en un tampón seguro frente a ARNasa

Los cebadores y las sondas en un par de mezclas de detección de CPI de ADN y ARN corresponden a un par de CPI de ADN y ARN. Por lo tanto, un par de mezclas de detección de CPI de ADN y ARN comparten uno o dos de los

siguientes tres polinucleótidos: (1) un cebador directo (2) una sonda; y (3) un cebador inverso. Véanse las Figuras 1A y 2. Es decir, una mezcla de detección de CPI de ADN puede comprender un cebador directo que sea igual o similar al CPI de ARN (p.ej., cebador directo 1, pero una sonda y un cebador inverso diferentes tal como la sonda 1 y el cebador inverso 3 para el CPI de ADN, mientras que el CPI de ARN tiene la sonda 2 y el cebador inverso 3). Las mezclas de detección de CPI de ADN y CPI de ARN tienen uno o dos polinucleótidos que son diferentes entre sí.

Una o más mezclas de detección de CPI se pueden combinar con una o más mezclas de detección específicas del ensayo. Por ejemplo, una mezcla de detección combinada puede comprender un cebador directo que se une a la región de unión del cebador directo del CPI, una sonda que se une a la región de unión de la sonda del CPI, un cebador inverso que se une a la región de unión del cebador inverso del CPI, un cebador directo que se une a la región de unión del cebador directo de la diana del polinucleótido de ensayo específico, una sonda que se une a la región de unión de la sonda de la diana del polinucleótido de ensayo específico, un cebador inverso que se une a la región de unión del cebador inverso de la diana del polinucleótido de ensayo específico.

Todos los polinucleótidos descritos anteriormente y a lo largo de esta memoria descriptiva se pueden preparar utilizando cualquier método adecuado, tal como, por ejemplo, los métodos conocidos de fosfotriéster y fosfitotriéster, o realizaciones automatizadas de los mismos. Los polinucleótidos se pueden sintetizar mediante varios enfoques, p.ej. Ozaki et al., *Nucleic Acids Research*, 20:5205-5214 (1992); Agarwal et al., *Nucleic Acids Research*, 18:5419-5423 (1990). Los polinucleótidos descritos en la presente memoria se pueden sintetizar en un sintetizador de ADN automático utilizando químicas convencionales, tales como química de fosforamidita, p.ej. descrita en las siguientes referencias: Beaucage & Iyer, *Tetrahedron*, 48:2223 - 2311 (1992); Molko et al., Patente de Estados Unidos Núm. 4.980.460; Koster et al., Patente de Estados Unidos Núm. 4.725.677; Caruthers et al., Patentes de Estados Unidos Núm. 4.415.732; 4.458.066; y 4.973.679. También se pueden utilizar químicas alternativas, p.ej. dando como resultado grupos de cadena principal no naturales, tales como fosforotioato, fosforamidato, y similares, a condición de que las eficacias de hibridación de los oligonucleótidos resultantes y/o la eficacia de escisión de la exonucleasa empleada no se vean adversamente afectadas.

La región de cebador directo de CPI, la región de sonda y la región de cebador inverso son secuencias sintéticas de ADN y ARN que no se encuentran en la naturaleza (los elementos individuales pueden aparecer en la naturaleza, pero no las combinaciones/disposiciones en que aparecen en los CPI). El CPI de ADN se puede agregar a pruebas solo de ADN, y el CPI de ARN se puede agregar a pruebas solo de ARN. El CPI de ADN y el CPI de ARN se pueden combinar en un tampón seguro para ARN para su uso en pruebas de ADN o de ARN, o para pruebas combinadas de ARN y ADN. El uso de un par de CPI de ADN y ARN que comparten secuencias de cebadores y sondas entre ADN y ARN aumenta la eficacia de fabricación mientras que es capaz de controlar los ensayos tanto de ARN como de ADN, incluyendo la etapa de transcripción inversa y las etapas de extracción/purificación. La combinación de los CPI de ADN y ARN en un único tubo/pocillo reduce la cantidad de componentes del kit, simplifica el flujo de trabajo y el inventario para el usuario, y reduce las posibilidades de error del usuario.

Para ejecutar un ensayo con un CPI, el molde y los cebadores para el control positivo interno se incluyen en la reacción junto con los de la diana de polinucleótido de interés. La amplificación del CPI se puede distinguir (utilizando, por ejemplo, sondas de detección separadas con diferentes colores de colorantes fluorescentes) de la amplificación de la diana de interés. El uso de CPI ventajosamente no requiere una reacción separada y es útil porque puede identificar problemas que son intrínsecos a la reacción de la muestra. Por ejemplo, los CPI pueden detectar una situación en la que las sustancias en la muestra clínica inhiben la reacción de PCR, o una situación en la que los ácidos nucleicos no se extrajeron y/o recuperaron adecuadamente. Por ejemplo, las muestras de esputo y heces a menudo contienen sustancias inhibidoras que pueden no eliminarse mediante el proceso de extracción. Los CPI se pueden agregar a la muestra de prueba antes de la extracción de ácido nucleico (p.ej., al tampón de lisis) o se pueden añadir a la mezcla de reactivo de PCR antes de la amplificación de ácido nucleico.

Cuando los ácidos nucleicos diana y un control positivo interno no se amplifican, se supone la inhibición de la PCR o un fallo en la extracción y se descarta el resultado de la prueba de ensayo. Si la diana se amplifica y el control interno no se amplifica, se concluye que los ácidos nucleicos diana están presentes a una concentración mucho mayor que los ácidos nucleicos de control interno. Este resultado positivo puede considerarse válido, siempre que todos los controles negativos tengan el resultado negativo esperado. Si la diana no se amplifica y se amplifica el control interno y/o el control positivo interno, se concluye que la prueba es válida y negativa para la diana.

Minímeros

Los controles positivos para las reacciones de PCR son esenciales para la confirmación de la actividad adecuada de múltiples componentes de reacción. Por ejemplo, el uso de un control positivo en forma de ARN sintético en una reacción de RT-PCR asegura una actividad adecuada de la transcriptasa inversa, así como el funcionamiento apropiado de los cebadores y las sondas de la reacción de RT-PCR. Entre los beneficios de la utilización de ADN y/o ARN sintéticos como controles positivos se encuentran su pureza y cuantificación confiable. Sin embargo, las técnicas actuales para sintetizar ácidos nucleicos tienen limitaciones de tamaño. Por ejemplo, la longitud de oligómeros de ARN sintéticos está actualmente limitada a aproximadamente 70-90 bases, dependiendo de la metodología. Además, los costes de la síntesis aumentan al aumentar la longitud del oligómero.

Se ha desarrollado un nuevo método para adaptar el tamaño de los amplicones diana. El método se puede utilizar para limitar la longitud de una molécula de ARN o ADN que se va a utilizar como control positivo, a menos de aproximadamente 100, menos de aproximadamente 90, menos de aproximadamente 75 o menos de aproximadamente 60 bases. Esto da como resultado un coste menor y/o una fabricación más fácil. Un control positivo puede ser un control positivo interno o un control positivo diana o un control de muestra interno y puede ser ADN o ARN.

El resumen de la adaptación se muestra en la Figura 5. Brevemente, algunas o todas las secuencias intermedias entre los sitios de unión del cebador y la sonda de la secuencia natural se eliminan, creando un mini amplicón, también denominado "minímero" que conservará todas las propiedades útiles de un control de longitud completa. Un mínimero comprende una región de unión del cebador directo, una región de unión de la sonda y una región de unión del cebador inverso. La longitud de cada una de las regiones de unión del cebador directo, la región de unión del cebador inverso y la región de unión de la sonda puede ser de aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 o más nucleótidos. Estas regiones también pueden tener aproximadamente 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 50, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5 o menos nucleótidos. La longitud de cada región puede ser de aproximadamente 10 a aproximadamente 50, o de aproximadamente 15 a aproximadamente 30, o de aproximadamente 20 a aproximadamente 30 nucleótidos. En una realización, se añade una secuencia adicional de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más bases de longitud a los extremos del mini-amplicón para permitir una ligera degradación de una molécula de ADN o ARN sin un efecto adverso sobre la unión del cebador. Por ejemplo, entre aproximadamente 5 y 15 bases de ácido nucleico 5' con respecto al sitio de unión del cebador directo y entre aproximadamente 5 y 15 bases de ácido nucleico 3' con respecto al sitio de unión del cebador inverso que tienen homología (p.ej., aproximadamente 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99, 100% de homología) con el polinucleótido diana.

La longitud de un mínimero completo puede ser de aproximadamente 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150 o más nucleótidos. Un mínimero completo también puede tener aproximadamente 150, 140, 130, 120, 110, 100, 95, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30 o menos nucleótidos. La longitud de un mínimero completo puede ser de aproximadamente 50 a aproximadamente 100, de aproximadamente 60 a aproximadamente 90, de aproximadamente 70 a aproximadamente 80, de aproximadamente 100 a aproximadamente 150, o de aproximadamente 125 a 150 nucleótidos.

Por lo tanto, una molécula de ácido ribonucleico de control de la reacción en cadena de la polimerasa con mínimero o una molécula de ácido desoxirribonucleico pueden comprender una región de unión del cebador directo, una región de unión de la sonda y una región de unión del cebador inverso. Cada una de la región de unión del cebador, la región de unión de la sonda y la región de unión del cebador inverso tiene homología con una región de unión del cebador directo, una región de unión de la sonda y una región de unión del cebador inverso correspondientes en un polinucleótido diana. El polinucleótido diana puede ser una porción de un polinucleótido de ADN o ARN de origen natural. La homología puede ser aproximadamente 100% o 75, 80, 85, 95, 96, 97, 98, 99 o más. El mínimero tiene menos bases de ácidos nucleicos que una región del polinucleótido diana (que puede ser una porción del polinucleótido de ADN o ARN natural) que comprende la región de unión del cebador directo, la región de unión de la sonda, la región de unión del cebador inverso y cualquier región intermedia para que la molécula de ácido ribonucleico control de la reacción en cadena de la polimerasa sirva como control. Por ejemplo, aproximadamente 5, 8, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500 o más bases de ácido nucleico menos.

El mínimero puede tener menos bases de ácidos nucleicos entre la región de unión del cebador directo y la región de unión de la sonda que en el polinucleótido diana y puede tener menos bases de ácidos nucleicos entre la región de unión del cebador de la sonda y la región de unión al cebador inverso que en el polinucleótido diana. Por ejemplo, aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o más bases de ácido nucleico menos en cada una de esas regiones. Por lo tanto, un mínimero es un polinucleótido no natural.

Control de contaminación de control positivo. El control de contaminación de control positivo es la mezcla de detección para la secuencia distintiva. La contaminación con uno o más polinucleótidos de control positivo se puede rastrear mediante la amplificación de la secuencia distintiva. Este ensayo se puede ejecutar como una prueba individual o se puede multiplexar y ejecutar con cada ensayo de polinucleótido diana específico del ensayo.

Una mezcla de detección de contaminación de control positivo comprende cebadores (directo e inverso) y una o más sondas que se pueden utilizar para amplificar y detectar la secuencia distintiva. Opcionalmente, la mezcla de detección de contaminación de control positivo se puede combinar con una mezcla de detección de polinucleótido diana específica del ensayo.

Mezcla de detección PanB (Prueba ambiental) Este control se utiliza como control positivo cuando se realiza una supervisión rutinaria de la contaminación ambiental ya que esta mezcla de detección puede amplificar y señalar la presencia de secuencias de ADN bacteriano altamente conservadas presentes en muchas bacterias ambientales, tales como el ADN ribosómico 16S. Windsor et al., J Vet Intern Med. 20(2):250-6 (2006). Este control puede detectar el ADN de un procariota cuando está presente un procariota contaminante.

Por ejemplo, este control puede amplificar el ADN ribosómico, ADN 16S procariótico (prueba de contaminación

ambiental o como control interno de muestras fecales).

Los ejemplos de cebadores PanB y una sonda incluyen:

PanB.283f GGATGATCAGCCACACTGGA (SEQ ID NO: 18)

PanB.352r CCAATATTCTCTACTGCTGCC (SEQ ID NO: 19)

5 PanB.305p CCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCA (SEQ ID NO: 20)

Se pueden utilizar otros cebadores y sondas específicos para regiones de ADN ribosómico 16S bacteriano conservadas. Además, los cebadores y las sondas específicos para regiones de ADN ribosómico 23S bacteriano altamente conservadas, genes de ARNt o genes del dominio de unión del transportador ABC pueden ser adecuados como controles para la supervisión de la contaminación ambiental. Isenbarger et al., Orig Life Evol Biosph.38(6):517-33 (2008). Este ensayo se puede ejecutar como una prueba individual o se puede multiplexar y ejecutar con cada ensayo de polinucleótido diana específico del ensayo. Para una muestra fecal de un paciente, la prueba PanB también se puede utilizar como control positivo interno debido a la presencia de ácidos nucleicos bacterianos en las heces.

Una mezcla de detección PanB comprende uno o más cebadores (directo e inverso) y una o más sondas que se pueden utilizar para amplificar y detectar uno o más polinucleótidos procarióticos conservados, tales como el ADNr 16S. Véase Segarh y Huttenhower, PLoS One 6:e247094 (2011), que describe una lista de polinucleótidos procarióticos conservados. Se pueden utilizar tanto secuencias que codifican proteínas como secuencias no codificantes como polinucleótidos procarióticos conservados. Un polinucleótido procariótico conservado es una secuencia de polinucleótidos en la que se producen secuencias (ARN y ADN) similares (más de 95, 96, 97, 98, 99% de homología) o idénticas (100% de homología) en al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más especies procarióticas. Un polinucleótido procariótico conservado también puede ser una secuencia de polinucleótidos en la que se producen secuencias (ARN y ADN) similares (más de 95, 96, 97, 98, 99% de homología) o idénticas (100% de homología) en al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más géneros procarióticos. Un polinucleótido procariótico conservado puede codificar, p.ej., una o más de una agrupación de grupos de proteínas ortólogas (COG) (véase Tatusov et al., BMC Bioinformatics. 11 Sep. 2003;4) o uno más de eggNOG (véase Jensen et al. eggNOG: automated construction and annotation of orthologous groups of genes. Nucleic Acids Res. 2008;36:D250-D254). Un experto en la técnica puede diseñar y preparar cebadores directos, cebadores inversos y sondas específicos para polinucleótidos procarióticos conservados. Opcionalmente, la mezcla de detección Pan B se puede combinar con una mezcla de detección de polinucleótidos diana específica del ensayo.

30 Composiciones

Una realización proporciona una mezcla de reactivos de amplificación de ácido nucleico que comprende:

- (a) una mezcla maestra que comprende una o más ADN polimerasas, nucleósidos trifosfato y, opcionalmente, una o más transcriptasas inversas;
- (b) un control positivo diana agrupado que comprende dos o más polinucleótidos de control positivos diana para dos o más polinucleótidos diana y uno o más polinucleótidos de secuencia distintiva; y
- (c) una mezcla de detección de control de muestra interno que comprende uno o más cebadores directos, uno o más cebadores inversos, y una o más sondas que pueden amplificar y detectar uno o más polinucleótidos eucarióticos conservados;

40 en donde cada uno de (a), (b) y (c) son cada uno mezclas individuales; o en donde uno o más de (a), (b) y (c) se combinan juntos en una o más mezclas; o en donde (a), (b) y (c) se combinan juntos en una única mezcla.

En una realización alternativa, el componente (b) (es decir, el control positivo diana agrupado) se puede eliminar y el componente (b) se puede reemplazar por una mezcla de detección de polinucleótidos diana específica del ensayo que comprende uno o más cebadores directos específicos del ensayo, uno o más cebadores inversos específicos del ensayo, y una o más sondas específicas del ensayo.

45 Con referencia a ambas realizaciones anteriores, las una o más ADN polimerasas pueden ser ADN polimerasas de PCR con transcriptasa inversa combinadas. La mezcla puede comprender adicionalmente una mezcla de detección de polinucleótidos diana específica del ensayo que comprende uno o más cebadores directos específicos del ensayo, uno o más cebadores inversos específicos del ensayo y una o más sondas específicas del ensayo, en donde la mezcla de detección de polinucleótidos diana específica del ensayo es una mezcla individual o se combina con uno o más de (a), (b) o (c). El control positivo diana agrupado comprende 10, 20, 30 o más polinucleótidos de control positivo diana para 10, 20, 30 o más polinucleótidos diana.

Las mezclas anteriores pueden comprender adicionalmente una mezcla de detección de control de calidad que comprende uno o más de:

(a) un par de polinucleótidos de control positivo interno que comprende un polinucleótido de control positivo interno (CPI) de ADN y un polinucleótido de control positivo interno (CPI) de ARN, en donde el CPI de ADN y el CPI de ARN comparten una o dos regiones de unión del cebador directo, regiones de unión de la sonda, o regiones de unión del cebador inverso iguales o similares, y en donde una o dos de las regiones de unión del cebador directo, regiones de unión de la sonda, o regiones de unión del cebador inverso del CPI de ADN y el CPI de ARN son diferentes;

(b) una secuencia distintiva; y

(c) una mezcla de detección PanB que comprende uno o más cebadores directos, uno o más cebadores inversos y una o más sondas que puede amplificar y detectar uno o más polinucleótidos procarióticos conservados.

La mezcla de detección de polinucleótidos diana específica del ensayo puede comprender adicionalmente uno o más cebadores directos de control positivo interno, uno o más cebadores inversos de control positivo interno, y una o más sondas de control positivo interno. La mezcla maestra, el control positivo diana agrupado y la mezcla de detección de control de muestra interno pueden ser componentes universales que se pueden usar con cualquier mezcla de detección de polinucleótidos diana específica del ensayo. La mezcla de detección de polinucleótidos diana específica del ensayo puede comprender cebadores inversos específicos del ensayo, cebadores directos específicos del ensayo y una o más sondas específicas del ensayo para dos o más polinucleótidos diana diferentes. Los dos o más polinucleótidos diana diferentes pueden comprender polinucleótidos de ARN y polinucleótidos de ADN. La mezcla maestra, el control positivo diana agrupado y la mezcla de detección de control de muestra interno se pueden utilizar para amplificar tanto las dianas de polinucleótidos de ADN como las dianas de polinucleótidos de ARN en el mismo dispositivo de múltiples pocillos.

Así, mediante los métodos descritos en la presente memoria, los polinucleótidos tanto de ARN como de ADN se pueden amplificar utilizando una sola mezcla maestra empleando una enzima que tiene actividad polimerasa dependiente de ADN y actividades de ADN polimerasa dependientes de ARN (p.ej., HawkZO5) o una mezcla de una o más ADN polimerasas y una o más transcriptasas inversas. Además, los polinucleótidos tanto de ARN como de ADN se pueden amplificar con un solo programa de termociclación. Por lo tanto, los polinucleótidos tanto de ARN como de ADN se pueden amplificar simultáneamente en un solo termociclador. Los polinucleótidos tanto de ARN como de ADN se pueden amplificar en recipientes de reacción iguales o separados situados en un solo dispositivo de múltiples pocillos, tal como una placa de microtitulación, o un dispositivo que tiene una multitud de micropocillos o nanopocillos.

Sistema modular

Los componentes del sistema de plataforma de PCR descritos en la presente memoria se pueden proporcionar al usuario en forma de módulos individuales, en lugar de kits completos, o en lugar de kits que contienen varios componentes (Figura 3A-B). Por ejemplo, un módulo de Mezcla Maestra puede comprender la mezcla maestra, pero no una mezcla de detección ni un control positivo diana o una mezcla de detección de CMI. Un módulo de Mezcla de Detección puede comprender una mezcla de al menos dos cebadores y al menos una sonda, pero no una mezcla maestra ni un solo control positivo diana o mezcla de detección de CMI. Un módulo de Mezcla de Detección puede comprender una combinación de sonda y cebadores específicos de la diana y cebadores y sondas específicos de control. El módulo de CP o CPA comprende una mezcla de al menos un polinucleótido molde de control positivo diana y un polinucleótido de secuencia distintiva, pero no una mezcla de detección de CMI, ni una mezcla de detección, ni una mezcla maestra. Un módulo de CPI opcional puede comprender una mezcla de CPI de ADN y ARN, pero no una mezcla de detección, ni una mezcla maestra o un CPA. Una ventaja de un sistema modular es que el usuario puede adquirir e inventariar cada componente en las cantidades necesarias para sus fines específicos. Esto es ventajoso, p.ej., para un laboratorio que realiza una multitud de pruebas específicas de la diana diferentes, especialmente si se llevan a cabo diferentes pruebas a diferentes frecuencias y/o en diferentes números o volúmenes. El enfoque del sistema modular descrito en la presente memoria conduce a una manipulación e inventario simplificados, y a una reducción del despilfarro, tal como el despilfarro por caducidad de la vida útil del reactivo.

En una realización, un usuario adquiere y utiliza una o más mezclas de detección específicas, mezcla maestra de ARN y/o ADN, control positivo diana agrupado (opcionalmente con una secuencia distintiva), CPI (opcionalmente con mezcla de detección CPI) y opcionalmente mezclas de control de calidad. Véase la Figura 3A. En otras realizaciones, un usuario adquiere y utiliza una mezcla maestra de ARN y/o una mezcla maestra de ADN, una mezcla de detección específica del ensayo, cebadores y sondas específicos de CMI, CPA y opcionalmente reactivos de control de calidad. Véase la Figura 3B.

Cualquier componente descrito en la presente memoria (p.ej., cebadores, sondas, mezclas de detección, CMI, tampones, mezclas maestras, CPA, mezcla de detección de polinucleótidos diana específica del ensayo, muestras de prueba, CPI, mezcla de detección de CPI, controles de contaminación positiva, secuencias distintivas, mezcla de detección para secuencias distintivas, mezcla de detección PanB, etc.) pueden estar presentes por separado en un pocillo o mezcla o dispositivo de almacenamiento o en cualquier combinación de dos o más componentes.

Métodos

Los ensayos descritos en la presente memoria se pueden utilizar con cualquier tipo de muestra, por ejemplo, sangre, suero, plasma, orina, heces, saliva, esputo, semen, producto aspirado de pulmón, líquido cefalorraquídeo, exudado faríngeo, exudado traqueal, exudado nasal, exudado vaginal, exudado rectal, exudado de cloaca de volatería, muestra de biopsia, tejido, muesca en la oreja, punción en la oreja, células, lágrimas, secreciones nasales, leche, muestra ambiental, tejido o células tumorales, muestras de líquido linfático, muestras de líquido amniótico, muestras de plantas, muestras de biopsia por aspiración con aguja, muestras de producto lisado celular, muestras de producto lisado celular bruto, muestras forenses, muestras arqueológicas, muestras de infección, muestras de infección nosocomial, muestras de suelo, muestras de agua, muestras de alimentos y combinaciones de las mismas. Se pueden obtener muestras, por ejemplo, de cualquier tipo de animal, por ejemplo, de mamífero, ser humano, perro, gato, caballo, ovino, bovino, porcino, roedor, cabra, pájaro, pez o combinaciones de los mismos.

Una vez que se obtiene la muestra, los ácidos nucleicos se pueden extraer manualmente, por ejemplo, utilizando métodos o kits de extracción en fenol-cloroformo tales como High Pure (Roche), QIAamp (Qiagen), IsoQuick (Orca Research) e IsoCode Stix (Schleicher & Schuell). La extracción de ácido nucleico también se puede lograr con métodos de lisis rápida, es decir, NukEx (Gerbion), que se basa en la liberación enzimática de ácidos nucleicos de tejidos u organismos. También se pueden utilizar técnicas de extracción automática (MAGNA Pure (Roche Applied Science), BioRobot (Qiagen), ABI Prism (Applied Biosystems), NucliSens Extractor (bioMérieux). Los CPI de ADN y/o ARN se pueden agregar antes de la extracción de ácido nucleico. Alternativamente, se pueden agregar después de la extracción de ácido nucleico.

Las condiciones universales de termociclación para todas las pruebas de diagnóstico permiten al usuario realizar ensayos de dianas de polinucleótidos de ARN y ADN uno al lado del otro en la misma placa de reacción. Las condiciones de ciclación universales incluyen un tiempo de incubación y una temperatura suficientes para soportar la etapa de transcripción inversa en el caso de un ensayo de ARN (RT-PCR).

1. Un ensayo de PCR puede comprender una o más de las siguientes reacciones. Cada reacción puede ser en su propio recipiente (p.ej., un pocillo en una placa de ensayo de múltiples pocillos). Los ejemplos de mezclas de reacción incluyen, por ejemplo: uno o más pocillos de prueba pueden contener, por ejemplo, una muestra de prueba, una mezcla de detección de CMI, una o más mezclas de detección específica de polinucleótidos diana específicos para polinucleótidos diana que se van a analizar en la muestra de prueba (tanto aquí como en todas las demás realizaciones, la mezcla de detección de CMI se puede combinar con una o más mezclas de detección de polinucleótidos diana específicas del ensayo, y mezcla maestra.

2. Uno o más pocillos de control positivo que contienen control positivo diana agrupado o control positivo diana único, secuencia distintiva, una o más mezclas de detección de polinucleótidos diana específicas para el ensayo para dianas específicas, y mezcla maestra.

3. Uno o más pocillos de control negativo que contienen agua o tampón, una o más mezclas de detección de polinucleótidos diana específicas para el ensayo para las dianas de ensayo de polinucleótidos específicos, y mezcla maestra.

4. Uno o más pocillos de CPI que contienen la muestra de prueba, un CPI de ADN, un CPI de ARN o un CPI tanto de ADN como de ARN, mezcla de detección para el CPI de ARN o ADN o CPI tanto para ARN como ADN (dependiendo de si la diana del ensayo específico es ARN o ADN o ambos) y mezcla maestra.

5. Uno o más pocillos de secuencia distintiva que contienen hisopos ambientales u otra muestra que se vaya a analizar para detectar contaminación, mezcla de detección para la secuencia distintiva y mezcla maestra.

6. Uno o más pocillos de mezcla de detección PanB cuando se utilizan como control para la supervisión ambiental contienen hisopos ambientales u otra muestra, mezcla de detección PanB y mezcla maestra. (Cuando se utiliza PanB como control de integridad de muestra (control positivo interno) para muestras fecales: la muestra de prueba, la mezcla de detección PanB y la mezcla maestra).

Cada uno de estos recipientes de ensayo se somete a termociclación de PCR universal, opcionalmente, al mismo tiempo y en el mismo aparato termociclador de PCR o por separado. La termociclación de PCR universal es una termociclación que amplificará cada polinucleótido diana y de control independientemente de la composición del polinucleótido o de si los polinucleótidos diana o de control son ARN o ADN. Un ejemplo de condiciones universales de termociclación de PCR consiste en aproximadamente 40-65°C durante aproximadamente 10-30 minutos; después aproximadamente 45 ciclos de aproximadamente 94-95°C durante aproximadamente 5-15 segundos, y aproximadamente 60°C durante aproximadamente 20-45 segundos. Las sondas se detectan durante o después de la termociclación. En una realización descrita en la presente memoria, las reacciones numeradas como 1-3 anteriores se completan todas individualmente o juntas en un dispositivo de múltiples pocillos al mismo tiempo y en el mismo aparato termociclador de PCR. Las reacciones 4 a 6 anteriores se añaden opcionalmente de forma individual o conjunta en un dispositivo de múltiples pocillos con las reacciones 1 a 3 anteriores, o se pueden ejecutar en un dispositivo de múltiples pocillos separado y/o en una ronda de termociclador separada.

Por lo tanto, se describen en la presente memoria métodos para realizar una reacción en cadena de la polimerasa. Los métodos que comprenden cargar uno o más recipientes con ciertas combinaciones de reactivos de prueba para determinar si un polinucleótido de prueba está presente en una muestra de prueba y ciertas combinaciones de reactivos de control para asegurar que el ensayo procede correctamente y sin contaminación. Los recipientes pueden ser cualquier tipo de tubo o pocillo adecuados. En una realización, el recipiente es un pocillo, un micropocillo o un nanopocillo en una placa de microtitulación o un dispositivo de múltiples pocillos con una pluralidad de pocillos. Los pocillos se pueden utilizar para analizar una o más muestras de prueba a una o más diluciones para detectar la presencia de uno o más polinucleótidos de prueba. Un único recipiente puede comprender una muestra de prueba y reactivos para analizar la presencia de un polinucleótido de prueba o puede comprender una muestra de prueba y reactivos para analizar la presencia de 2, 3, 4, 5, 10, 20 o más polinucleótidos de prueba diferentes. Los pocillos se pueden utilizar para una variedad de reacciones de control. En una realización descrita en la presente memoria, una sola placa de pocillos de microtitulación o dispositivo de múltiples pocillos contiene una variedad de pocillos de prueba y de control. Los pocillos en una placa de señal pueden ser dos o más pocillos de prueba para determinar la presencia de polinucleótidos de prueba de ADN y polinucleótidos de prueba de ARN.

En una realización descrita en la presente memoria, uno o más recipientes (p.ej., uno o más pocillos de una placa de microtitulación o dispositivo de múltiples pocillos) comprenden:

(a) una muestra de prueba;

(b) una mezcla de detección de control de muestra interno que comprende uno o más cebadores directos, uno o más cebadores inversos, y una o más sondas que pueden amplificar y detectar uno o más polinucleótidos eucarióticos conservados, tales como ADN 18S eucariótico;

(c) una mezcla de detección de polinucleótidos diana específica del ensayo para un polinucleótido diana de ADN, una mezcla de detección de polinucleótidos diana específica del ensayo para un polinucleótido diana de ARN; o una mezcla de detección para un polinucleótido diana de ADN y ARN;

(d) una mezcla de detección de control positivo interno; y

(e) una mezcla maestra que comprende una o más polimerasas, nucleósidos trifosfato, y opcionalmente una o más transcriptasas inversas;

Todos los recipientes están sujetos a condiciones de termociclación de reacción en cadena de la polimerasa universales al mismo tiempo en el mismo termociclador.

Los recipientes adicionales pueden comprender:

(a) polinucleótidos de control positivo diana agrupados o un único polinucleótido de control positivo diana;

(b) una secuencia distintiva;

(c) una mezcla de detección para un polinucleótido diana de ADN, una mezcla de detección para un polinucleótido diana de ARN; o una mezcla de detección para un polinucleótido diana de ADN y ARN; y

(d) una mezcla maestra que comprende una o más polimerasas, nucleósidos trifosfato, y opcionalmente una o más transcriptasas inversas.

Los recipientes adicionales pueden comprender:

(a) agua o tampón;

(b) una mezcla de detección para un polinucleótido diana de ADN, una mezcla de detección para un polinucleótido diana de ARN; o una mezcla de detección para un polinucleótido diana de ADN y ARN; y

(c) una mezcla maestra que comprende una o más polimerasas, nucleósidos trifosfato, y opcionalmente una o más transcriptasas inversas.

Los recipientes opcionales adicionales pueden comprender:

(a) una muestra de prueba;

(b) un polinucleótido de control positivo interno (CPI) de ADN, un polinucleótido de control positivo interno (CPI) de ARN, o un polinucleótido de control positivo tanto de ADN como de ARN, en donde el CPI de ADN y el CPI de ARN comparten una o dos regiones de unión del cebador directo, regiones de unión de la sonda, o regiones de unión del cebador inverso iguales o similares y en donde una o dos de las regiones de unión del cebador directo, regiones de unión de la sonda, o regiones de unión del cebador inverso son diferentes;

(c) una mezcla de detección de control positivo interno; y

(d) una mezcla maestra que comprende una o más polimerasas, nucleósidos trifosfato, y opcionalmente una o más transcriptasas inversas.

Los recipientes opcionales adicionales pueden comprender:

- 5 (a) una muestra que se va a analizar para determinar la contaminación (p.ej., un reactivo o una mezcla de reactivos que se sospecha que están contaminados);
- (b) una mezcla de detección para una secuencia distintiva; y
- (c) una mezcla maestra que comprende una o más polimerasas, nucleósidos trifosfato, y opcionalmente una o más transcriptasas inversas.

Los recipientes opcionales adicionales pueden comprender:

- 10 (a) una muestra que se va a analizar para detectar contaminación o una muestra de prueba;
- (b) una mezcla de detección PanB que comprende uno o más cebadores directos, uno o más cebadores inversos, y una o más sondas que pueden amplificar y detectar uno o más polinucleótidos procarióticos conservados, tales como ADN_r 16S; y
- 15 (c) una mezcla maestra que comprende una o más polimerasas, nucleósidos trifosfato, y opcionalmente una o más transcriptasas inversas.

Una realización descrita en la presente memoria proporciona un método para realizar una reacción en cadena de la polimerasa que amplifica tanto un polinucleótido diana de ADN como un polinucleótido diana de ARN en el mismo dispositivo de múltiples pocillos que comprende cargar dos o más recipientes en el mismo dispositivo de múltiples pocillos con:

- 20 (a) una muestra de prueba;
- (b) una mezcla de detección de control de muestra interno que comprende uno o más cebadores directos, uno o más cebadores inversos, y una o más sondas que pueden amplificar y detectar uno o más polinucleótidos eucarióticos conservados;
- 25 (c) una mezcla de detección de polinucleótidos diana específica del ensayo para un polinucleótido diana de ADN que comprende uno o más cebadores directos específicos del ensayo, uno o más cebadores inversos específicos del ensayo y una o más sondas específicas del ensayo y una mezcla de detección de polinucleótidos diana específica del ensayo para un polinucleótido diana de ARN que comprende uno o más cebadores directos específicos del ensayo, uno o más cebadores inversos específicos del ensayo, y una o más sondas específicas del ensayo; o una mezcla de detección combinada para polinucleótidos diana de ADN y ARN; y
- 30 (d) una mezcla maestra que comprende una o más ADN polimerasas, nucleósidos trifosfato y una o más transcriptasas inversas.

El dispositivo multipocillo se somete a condiciones de termociclación de reacción en cadena de la polimerasa universales al mismo tiempo en el mismo termociclador.

- 35 Un pocillo puede contener, por ejemplo, una muestra de prueba; una mezcla de detección de control de muestra interno que comprende uno o más cebadores directos, uno o más cebadores inversos, y una o más sondas que pueden amplificar y detectar uno o más polinucleótidos eucarióticos conservados; una mezcla de detección de polinucleótidos diana específica para un polinucleótido diana de ADN que comprende uno o más cebadores directos específicos del ensayo, uno o más cebadores inversos específicos del ensayo, y una mezcla maestra que
- 40 comprende una o más ADN polimerasas y nucleósidos trifosfato. Un segundo pocillo en el mismo dispositivo de múltiples pocillos puede contener, por ejemplo, una muestra de prueba; una mezcla de detección de control de muestra interno que comprende uno o más cebadores directos, uno o más cebadores inversos, y una o más sondas que pueden amplificar y detectar uno o más polinucleótidos eucarióticos conservados; una o más sondas específicas del ensayo y una mezcla de detección de polinucleótidos diana específica del ensayo para un polinucleótido diana
- 45 de ARN que comprende uno o más cebadores directos específicos del ensayo, uno o más cebadores inversos específicos del ensayo y una o más sondas específicas del ensayo; y una mezcla maestra que comprende una o más transcriptasas inversas.

- Alternativamente, un pocillo puede contener una muestra de prueba; una mezcla de detección de control de muestra interno que comprende uno o más cebadores directos, uno o más cebadores inversos, y una o más sondas que
- 50 pueden amplificar y detectar uno o más polinucleótidos eucarióticos conservados; una mezcla de detección de polinucleótidos diana específica del ensayo para un polinucleótido diana de ADN que comprende uno o más cebadores directos específicos del ensayo, uno o más cebadores inversos específicos del ensayo y una o más sondas específicas del ensayo y una mezcla de detección de polinucleótidos diana específica del ensayo para un

polinucleótido diana de ARN que comprende uno o más cebadores directos específicos del ensayo, uno o más cebadores inversos específicos del ensayo, y una o más sondas específicas del ensayo; y una mezcla maestra que comprende una o más ADN polimerasas, nucleósidos trifosfato y una o más transcriptasas inversas.

- 5 Los pocillos adicionales que contienen reactivos como se discutió anteriormente también se pueden cargar en el mismo dispositivo de múltiples pocillos. Las condiciones de termociclación de la reacción en cadena de la polimerasa universal pueden ser, por ejemplo, 40-60°C durante 10-30 minutos; después, aproximadamente 45 ciclos de 94-95°C durante 5-10 segundos, y 60°C durante 20-30 segundos.

Kits

- 10 Los kits descritos en la presente memoria son ventajosos porque contienen varios componentes universales que se pueden utilizar con uno o más componentes específicos del ensayo. Véase la Figura 3A-B. En un ejemplo, la mezcla de detección es específica del ensayo. Es decir, la mezcla de detección de polinucleótidos diana específica del ensayo comprende uno o más cebadores (directo e inverso) y una o más sondas para la detección de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200 o más moléculas de ácido nucleico específicas. La mezcla de detección también puede contener opcionalmente una mezcla de detección para un CMI.
- 15 El componente de la mezcla de detección específica del ensayo se combina con los componentes universales. Los componentes universales incluyen (1) una mezcla maestra de ARN, una mezcla maestra de ADN o una combinación de una mezcla maestra de ADN y una mezcla maestra de ARN (en recipientes separados o combinados en una mezcla maestra); (2) un control positivo diana con secuencia distintiva (el control positivo diana puede estar agrupado o ser un solo control) y la mezcla de detección para el control positivo diana y la secuencia distintiva; y (3)
- 20 mezcla de detección para un CMI (que se puede combinar con la mezcla de detección de control positivo diana). Opcionalmente, se pueden agregar una o más mezclas de detección de control de calidad a los componentes universales.

- 25 Por lo tanto, el usuario final puede adquirir un kit de componentes universales y a continuación adquirir los componentes de detección específicos del ensayo (p.ej., mezclas de detección) según sea necesario. En una realización descrita en la presente memoria, se empaquetan una o más mezclas de detección específicas con los componentes universales.

- 30 La invención descrita en la presente memoria de forma ilustrativa se puede llevar a la práctica adecuadamente en ausencia de cualquier elemento o elementos, limitación o limitaciones que no se describa específicamente en la presente memoria. Los términos y expresiones que se han empleado se utilizan como términos de descripción y no de limitación, y no hay intención de que en el uso de dichos términos y expresiones se excluyan los equivalentes de las características mostradas y descritas o partes de las mismas, pero se reconoce que son posibles diversas modificaciones dentro del alcance de la invención reivindicada. Por lo tanto, se debe entender que aunque la presente invención se ha descrito específicamente por medio de realizaciones, los expertos en la técnica pueden recurrir a las características, modificaciones y variaciones opcionales de los conceptos descritos en la presente
- 35 memoria dentro del alcance de esta invención tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Además, cuando las características o aspectos de la invención se describen en términos de grupos de Markush u otras agrupaciones de alternativas, los expertos en la técnica reconocerán que la invención también se describe en términos de cualquier miembro individual o subgrupo de miembros del grupo de Markush u otro grupo.

- 40 El término "aproximadamente" cuando se utiliza con un valor numérico significa que el valor numérico puede variar en 5%. Por ejemplo, "aproximadamente 100" significa de 95 a 105.

Lo siguiente se proporciona con fines meramente ilustrativos y no se pretende que limite el alcance de la invención como se define en las reivindicaciones.

Ejemplos

Ejemplo 1 Virus de la lengua azul, *Mycobacterium avium* ss. *paratuberculosis*, y Virus de la diarrea viral bovina

- 45 Preparación de la reacción: Las mezclas de reacción se prepararon en una sala limpia de clase 100, y contenían partes iguales de mezcla maestra de ADN y mezcla de detección específica de la diana para un volumen total de 5 µL x cantidad de muestras que se iban a analizar. Las mezclas de reacción se pipetearon en una placa de microtitulación de 96 pocillos y se transportaron a un espacio de trabajo separado para la adición de la muestra. Las muestras consistieron en oligonucleótidos sintéticos o ácidos nucleicos purificados a partir de muestras clínicas
- 50 (véase a continuación). Se añadió una muestra (5 µL) a los pocillos apropiados, la placa se cubrió con una cubierta de placa óptica y se colocó en Life Technologies ViiA™ 7 o Roche LightCycler® 480. Al completar el programa de ciclación, se utilizó el soporte lógico del aparato para calcular el valor umbral para cada diana y determinar los puntos de cruce (Pc) de la muestra. Para la prueba de sensibilidad analítica, los oligonucleótidos sintéticos que coincidían con la secuencia diana se resuspendieron y se diluyeron en tampón de almacenamiento. Para la prueba
- 55 de especificidad analítica, se realizaron búsquedas de BLAST de nucleótidos patrón utilizando cada secuencia diana de prueba como consulta. Se identificaron ortólogos y se preparó ADN genómico a partir del organismo identificado,

o se ordenaron los oligonucleótidos de ADN sintético que coincidían con la secuencia ortóloga tal como se describió anteriormente.

Las muestras clínicas se purificaron utilizando un kit de extracción de ácido nucleico total comercial. Las muestras se enriquecieron con CPI de ADN o ARN sintético antes de la extracción. El verdadero estado de la muestra se confirmó mediante ELISA o secuenciación de ADN.

El ensayo de PCR BTV (Virus de la lengua azul) tiene la capacidad de detectar al menos 8 serotipos del Virus de la lengua azul (Tabla 1). La diana consistió en 10^4 copias por reacción de ADN sintético que coincidía completamente con la secuencia del subtipo.

Tabla 1. Prueba de especificidad del virus de la lengua azul

Controles positivos sintéticos	BTV 1	BTV 2	BTV 3	BTV 4	BTV 5	BTV 6	BTV 7	BTV 8
Valor 1	22,9	24,81	23,52	24,39	24,24	25,76	24,8	24,72
Valor 2	22,84	24,81	23,63	24,34	24,63	25,31	24,74	25,07
Valor 3	22,7	24,85	23,73	24,61	24,38	25,76	24,85	24,89
Promedio	22,81	24,82	23,63	24,45	24,42	25,61	24,80	24,89
Desv. típica	0,10	0,02	0,11	0,14	0,20	0,26	0,06	0,18

Las curvas patrón y de amplificación para el Virus de la lengua azul mostraron que la detección del ADN diana del serotipo 1 siguió siendo lineal a lo largo de un cambio de 108 veces en la concentración de la diana inicial. La eficacia para la reacción fue de 103,2% calculada por el soporte lógico del aparato. Una serie de diluciones 1:10 de ADN sintético que representaba la diana de BTV dio como resultado curvas de amplificación satisfactorias para BTV de serotipo 1. La prueba fue capaz de detectar con precisión un mínimo de 10 copias por reacción. Se incorporó un CPI de ARN sintético a muestras de sangre bovina completa y fue detectable en la preparación de ácido nucleico total.

Para *Mycobacterium avium* ss. *paratuberculosis* se demostró que el ensayo detectaba una copia de ADN sintético que representaba la secuencia diana. La etapa de ciclación de transcripción inversa no afectó negativamente a los resultados.

Para el Virus de la diarrea viral bovina, se analizaron 15 muestras positivas para BVDV confirmadas utilizando los reactivos de ensayo. Se purificó el ácido nucleico total de las muestras de suero y se sometieron a prueba siguiendo el protocolo RealPCR. El protocolo consiste en 40-60°C durante 10-30 minutos; después 45 ciclos de 94-95°C durante 5-10 segundos, y 60°C durante 20-30 segundos.

El grupo de muestra consistió en 5 tipos diferentes de BVDV. Las 15 muestras volvieron a tener curvas de amplificación con forma sigmoidea y el soporte lógico del aparato las denominó positivas.

Estos resultados confirman la especificidad y la sensibilidad de la plataforma de PCR en tiempo real de diagnóstico RealPCR. Los ensayos tienen una sensibilidad mínima de 10 copias de ácido nucleico diana por muestra de 5 µL. Los resultados demuestran la capacidad de utilizar un solo protocolo de ciclación para ejecutar dianas de ADN o ARN, lo que simplifica enormemente la experiencia del usuario.

Ejemplo 2

Este ejemplo demuestra la viabilidad de utilizar un control positivo interno (CPI) de ARN/ADN combinado para su uso en la PCR en tiempo real (qPCR). En las pruebas de qPCR, el CPI se utiliza para determinar i) la extracción de ácidos nucleicos eficaz de una muestra dada y ii) la amplificación y detección satisfactorias de un segmento específico de ADN (diana).

Se sintetizaron oligonucleótidos de hebra sencilla de CPI tanto de ARN como de ADN de acuerdo con las secuencias de la Figura 1A por medio de Integrated DNA Technologies (Coralville, Iowa). Los oligonucleótidos Ultramer™ liofilizados se resuspendieron y diluyeron en tampón seguro para ARN (RSB) que contenía Tris 10 mM, pH 7,0, azida sódica al 0,05%, Tween® (polisorbato) 20 al 0,05%, EDTA 0,1 mM y ARN poli-A de 50 ng/µl. Las diluciones de los ultrámeros se almacenaron a -20°C hasta que fueron necesarias.

Se utilizó un formato de prueba basado en una sonda de hidrólisis para detectar la presencia de ADN. Para los controles positivos internos, se diseñaron oligonucleótidos de ADN y ARN para compartir secuencias correspondientes al cebador inverso y a los sitios de unión de la sonda de hidrólisis (TaqMan®). Sin embargo, los CPI de ADN y ARN diferían en el sitio de unión del cebador directo, como se muestra en la Figura 1A, 1B. Para la detección del CPI de ARN o de ADN, la sonda compartida, el cebador inverso compartido y el cebador directo específico se mezclaron para crear la mezcla de detección de ARN o ADN (Figura 1B). Las concentraciones de cebador para las mezclas de detección de CPI fueron 100 nM mientras que las sondas fueron 80 nM. Para las pruebas de micoplasma, los cebadores y sondas *Mycoplasma gallisepticum* se basaron en una prueba previamente publicada para este organismo como se muestra en la Tabla 1 (Raviv y Kleven, Avian Diseases, 53:103 (2009)). La longitud de los cebadores se aumentó y las ubicaciones se ajustaron ligeramente para permitir la reasociación a 60°C. Para permitir la multiplexación, la sonda de micoplasma contenía una combinación de fluoróforo-extintor FAM-TAMRA, mientras que el CPI utilizó una combinación HEX-TAMRA. Todas las reacciones se realizaron en una máquina de PCR en tiempo real Life Technologies ViiA 7 utilizando un programa de termociclación de: 60°C durante 5 minutos, 65°C durante 5 minutos, 95°C durante 30 segundos; 45 ciclos de: 95°C durante 5 segundos, 60°C durante 20 segundos; mantenimiento a 40°C. Las lecturas fluorescentes se tomaron en los canales FAM y HEX. Las reacciones de PCR en tiempo real se realizaron con AptaTaq® Genotyping Master de Roche. AptaTaq es una ADN polimerasa de inicio en caliente que contiene actividad exonucleasa 5' a 3'.

Este experimento demuestra la capacidad de una mezcla de detección dada para detectar la presencia de un CPI de ADN o un CPI de ARN, cuando el CPI de ADN y el CPI de ARN contienen sitios de unión del cebador directo y de la sonda idénticos, pero difieren en los sitios de unión del cebador inverso. Los exudados traqueales se empaparon en 200 microlitros de PBS y se utilizaron como muestra para la extracción de ácido nucleico total utilizando un Qiagen QIAamp DNA Mini Kit (código de producto Qiagen 51304).

Inmediatamente antes de la lisis de la muestra, el tampón de lisis se enriqueció con una mezcla de CPI de ARN y de ADN, CPI de ARN solo o CPI de ADN solo. A continuación, se purificó el ácido nucleico total de cada muestra enriquecida resultante y se sometió a prueba con mezcla de detección de *M. gallisepticum* y mezcla de detección de CPI de ARN o mezcla de detección de CPI de ADN en una reacción de PCR múltiple en tiempo real (Tabla 2). Las pruebas se realizaron por triplicado. Cuando la reacción contenía la mezcla de detección específica de micoplasma así como la mezcla de detección de CPI de ARN, se detectó ADN de micoplasma en todas las muestras como se esperaba. Sin embargo, la mezcla de detección de CPI de ARN no pudo detectar la presencia del CPI de ARN o del CPI de ADN. Esto indica que la mezcla de detección de CPI de ARN no permite la amplificación del CPI de ADN. La falta de amplificación de la CPI de ARN con la mezcla de detección de CPI de ARN se debió a que la mezcla maestra AptaTaq carecía de actividad de transcriptasa inversa y, por lo tanto, era incapaz de generar ADNc a partir de ARN. Por lo tanto, la variación de secuencia entre los CPI de ADN y ARN es suficiente para evitar la amplificación de CPI de ADN con la mezcla de detección de CPI de ARN.

Mezcla de detección de diana de ADN	Diana	Oligo CPI enriquecido		
	MG	ADN/ARN	ARN	ADN
DMx de <i>M. gallisepticum</i> y DMx de CPI de ARN	+	-	-	-
DMx de <i>M. gallisepticum</i> y DMx de CPI de ADN	+	+	-	+

Tabla 2. Esquema del diseño experimental para una mezcla de detección de diana de ADN. Los resultados se indican con "+" o "-" para indicar la detección del CPI diana o enriquecido. El ADN de *Mycoplasma* estaba en cada muestra y, por lo tanto, se esperaba que se detectara en todos los pocillos.

Quando las reacciones múltiples contenían la mezcla de detección de micoplasma al igual que la mezcla de detección de CPI de ADN, nuevamente todas las reacciones de prueba indicaron la presencia de micoplasma como se esperaba. Por el contrario, no se detectó CPI de ARN, lo que demuestra la falta de especificidad de la mezcla de detección de ADN para CPI de ARN. Sin embargo, cuando se incorporó la mezcla de CPI de ARN/ADN o el CPI de ADN solo a la muestra, la mezcla de detección de CPI de ADN pudo amplificar y señalar la presencia de CPI de ADN. En conjunto, estos resultados muestran la capacidad de amplificar y detectar selectivamente el CPI de ADN o el CPI de ARN a partir de una mezcla que contiene tanto CPI de ADN como CPI de ARN.

Mezcla de detección de diana de ARN	Diana	Oligo CPI enriquecido		
	BVDV	ADN/ARN	ARN	ADN
DMx de BVDV y DMx de CPI de ARN	+	+	+	-
DMx de BVDV y DMx de CPI de ADN	+	+	-	+

Tabla 3. Esquema del diseño experimental para una mezcla de detección de diana de ARN. Los resultados se indican con "+" o "-" para indicar la detección de la diana o de CPI enriquecido. El ARN de BVDV estaba en cada muestra y, por lo tanto, se esperaba que se detectara en todos los pocillos.

El CPI de ARN/ADN mezclado también se aplicó usando una prueba para una diana de ARN. Para esto, se tomó una muestra de sangre completa bovina de un animal positivo para el Virus de la diarrea viral bovina (BVDV) conocido. El ARN total de la muestra se purificó utilizando un kit QIAamp Viral RNA (Qiagen, núm. 52904). Esta muestra se enriqueció con una mezcla de CPI de ARN y ADN, CPI de ARN solo o CPI de ADN solo. Cada muestra enriquecida resultante se analizó a continuación con la mezcla de detección de BVDV y la mezcla de detección de CPI de ARN o la mezcla de detección de CPI de ADN en una reacción de PCR múltiple en tiempo real (Tabla 3). Las pruebas se realizaron por triplicado. En todos los casos, la mezcla de detección de BVDV fue capaz de amplificar y señalar la presencia de ARN de BVDV. Cuando se añadió la mezcla de detección de CPI de ARN, las señales se detectaron a partir de la sonda de CPI solo cuando el CPI de ARN era el material enriquecido (tanto las condiciones que contenían CPI de ARN/ADN mezclado como ARN de CPI solo). No se detectó señal cuando la muestra solo estaba enriquecida con CPI de ADN. Esto indica que la mezcla de detección de CPI de ARN es específica para el CPI de ARN, y no amplifica y/o señala la presencia del CPI de ADN. Alternativamente, cuando las reacciones múltiples contenían la MDx de CPI de ADN, solamente las condiciones que contenían la incorporación de CPI de ADN producían una señal procedente de la sonda de CPI. No se generó señal cuando se utilizó la mezcla de detección de CPI de ADN y una incorporación de CPI de ARN. Esto indica que la mezcla de detección de CPI de ADN es específica para el CPI de ADN.

En total, estos resultados muestran que la presencia de CPI de ARN o de ADN puede detectarse selectivamente, dependiendo de la mezcla de detección utilizada, y que ni la mezcla de detección de ARN ni la de ADN presentarán reacción cruzada con el CPI opuesto. Además, el CPI de ARN añadido a una prueba de ADN no interfiere en la detección del CPI de ADN o ARN diana. Adicionalmente, el CPI de ADN añadido a una prueba de ARN no interfiere en la detección del ARN o el CPI de ARN diana.

Estos ejemplos muestran la viabilidad de la utilización de una combinación de CPI de ARN y ADN sintéticos para su uso como controles en reacciones de PCR en tiempo real, empleando un sistema de PCR en tiempo real basado en sondas de hidrólisis y polinucleótidos de CPI sintéticos diseñados de forma única, que comparten secuencias de cebador inverso y sonda pero difieren en la secuencia del cebador directo. En este sistema, es posible amplificar y señalar selectivamente la presencia del CPI de ADN.

Ejemplo 3: Control positivo interno

Se fabricaron tres pares de CPI de ADN y ARN sintéticos (ADN-A y ARN-A, ADN-B y ARN-B, ADN-C y ARN-C: Figura 2) con combinaciones aleatorias para las secuencias de las regiones anterior, sonda e inversa. También se generaron las mezclas de detección correspondientes (DMx-A a F) para la detección de cada CPI de ADN o ARN. La DMx-A está diseñada para la amplificación y detección de ADN-A, la DMx-B está diseñada para la amplificación y detección de ARN-A, la DMx-C está diseñada para la amplificación y detección de ADN-B, la DMx-D está diseñada para amplificación y detección de ARN-B, la DMx-E está diseñada para la amplificación y detección de ADN-C y la DMx-F está diseñada para la amplificación y detección de ARN-C.

Cada uno de los tres CPI de ADN se probó con cada una de las seis mezclas de detección (Tabla 4). Las construcciones de ADN solamente se detectaron mediante la mezcla de detección que se había diseñado para amplificar la secuencia sintética respectiva (Tabla 4A). Para los CPI de ARN, solamente se evaluaron las mezclas de detección de ARN. Dos de los tres emparejamientos de mezcla de detección/CPI dieron positivo. El CPI ARN-B inesperadamente dio negativo en la prueba con DMx-E; sin embargo, el suministrador observó que había problemas de fabricación con ARN-B y esta podría ser la razón del resultado negativo (Tabla 4B).

Los parámetros de termociclación utilizados tanto para los CPI de ARN como para los CPI de ADN fueron: 60°C durante 5 minutos, 65°C durante 5 minutos, 95°C durante 30 segundos; 45 ciclos de: 95°C durante 5 segundos, 60°C durante 20 segundos; mantenimiento a 40°C. Esto demuestra que un único protocolo de termociclación

apoyará las reacciones de PCR y RT-PCR.

Estos resultados muestran que la presencia de cada uno de los CPI puede detectarse mediante su mezcla de detección correspondiente. Aunque algunos de los CPI de ADN y ARN tienen sitios de unión de la sonda y/o del cebador compartidos, cada CPI solamente se detectará mediante su mezcla de detección correspondiente. Las mezclas de detección no amplifican y/o detectarán de forma cruzada los CPI para cuya amplificación no se diseñaron.

Tabla 4A

	CPI de ADN		
	ADN-A	ADN-B	ADN-C
Diseño de DMx			
DMx- A	+	-	-
DMx- B	-	+	-
DMx-C	-	-	+
DMx- D	-	-	-
DMx-E	-	-	-
DMx-F	-	-	-

Tabla 4B

	CPI de ARN		
	ARN-A	ARN-B	ARN-C
Diseño de DMx			
DMx- D	+	-	-
DMx-E	-	-	-
DMx- F	-	-	+

Ejemplo 4: Control Positivo Agrupado (CPA) y Secuencia distintiva

Se preparó un control positivo diana agrupado que estaba compuesto por 11 dianas de control positivo para ADN (véase la Tabla 5) y la secuencia distintiva. Las dianas de la prueba fueron cada una de las 1.000 copias/reacción, mientras que la secuencia distintiva se había añadido a 4000 copias/reacción. La solución se sometió a prueba con mezclas de detección individuales para cada diana.

Los parámetros de termociclación fueron: 60°C durante 5 minutos, 65°C durante 5 minutos, 95°C durante 30 segundos; 45 ciclos de: 95°C durante 5 segundos, 60°C durante 20 segundos; mantenimiento a 40°C.

Este experimento demuestra que cada control en la agrupación es amplificable con una sensibilidad similar y que los controles no interfieren entre sí. La secuencia distintiva es detectable en un número de ciclo inferior al de los controles positivos de la diana agrupados, como se esperaba debido al número de copias más alto del molde de entrada.

Tabla 5

Diana/Mezcla de detección	Valor Pc
<i>M. gallisepticum</i> (MG)	28,75
<i>M. synoviae</i> (MS)	28,9
<i>M. meleagridis</i>	29,14
<i>Mycobacterium paratuberculosis</i> (MAP)	29,55
<i>Mycoplasma bovis</i>	29,65
<i>Leptospira</i> spp	28,7
<i>Clostridium perfringens</i> - Enterotoxina A	29,23
<i>Clostridium perfringens</i>	28,92
<i>Lawsonia</i>	28,35
Influenza A	29,02
Coxiella B	28,32
Secuencia distintiva	25,73

Ejemplo 5: CPA y series de dilución de secuencia distintiva

- 5 La contaminación de las reacciones de PCR con CPA puede dar lugar a resultados falsos positivos. La detección de cualquier evento de contaminación de este tipo es por lo tanto deseable. Con el fin de simular la detectabilidad de una contaminación con CPA que contiene una secuencia distintiva, la agrupación descrita en el Ejemplo 4 anterior se diluyó seriadamente 1:2 a una dilución de 1:2048. Cada dilución se probó para tres de los controles específicos de enfermedad representados en la agrupación, así como para la secuencia distintiva.
- 10 Los parámetros de termociclación fueron: 60°C durante 5 minutos, 65°C durante 5 minutos, 95°C durante 30 segundos; 45 ciclos de: 95°C durante 15 segundos, 60°C durante 30 segundos; mantenimiento a 40°C.
- 15 Si bien la secuencia distintiva fue detectable a una dilución de 1:512, cada uno de los tres controles específicos de la enfermedad fue detectable a 1:64 o 1:128. Esto se corresponde bien con el número de copias cuádruple de la secuencia distintiva en comparación con cada control en la agrupación. Por lo tanto, el diseño de la agrupación asegura que la detección de cualquier evento de contaminación sea detectable con alta sensibilidad y robustez. Los resultados demuestran que la secuencia distintiva se puede utilizar como un trazador sensible para detectar una contaminación con CPA.

Tabla 6

	MAP	MG	MS	Secuencia distintiva
Dilución	Pc Promedio			
CPA	27,6	27,6	27,0	24,8
1:2	28,9	28,5	27,5	25,6
1:4	30,1	29,2	27,7	26,5

	MAP	MG	MS	Secuencia distintiva
Dilución	Pc Promedio			
1:8	31,1	29,7	27,9	27,2
1:16	32,1	30,2	28,8	28,1
1:32	32,5	30,5	28,5	28,6
1:64	34,9	31,7	29,1	29,2
1:128	34,3	32,0	-	29,4
1:256	-	-	-	30,0
1:512	-	-	-	31,0
1:1024	-	-	-	-
1:2048	-	-	-	-

Ejemplo 6: Diseño de minímero

La Figura 5A representa un ejemplo hipotético de un diseño de RT-PCR en tiempo real que se dirige al gen de la hidroximetilbilano sintasa (hmbs1) de *Bos taurus*. Los sitios de unión del cebador directo e inverso están subrayados una vez, mientras que la sonda de la hebra positiva está doblemente subrayada. El cebador inverso abarca una unión exón-exón, y por lo tanto, se pronostica que este amplicón amplificará ARNm selectivamente. El amplicón de origen natural mide 166 bases de longitud y, por lo tanto, no se puede sintetizar fácilmente como un oligómero de ARN. La Figura 5B representa una versión del minímero del diseño de hmbs1, en el que las secuencias que intervienen en los sitios de unión del cebador y la sonda se acortan en gran medida, dando como resultado un amplicón de 61 bases. Con la adición de ocho bases en el extremo 5' y nueve bases en el extremo 3', se espera que las técnicas comerciales actuales sintetizen fácilmente una longitud total de 78 bases, lo que permite la producción de una molécula de ARN sintético que puede servir como control positivo diana para HMBS1 en una prueba de RT-PCR en tiempo real (por ejemplo, como una diana de anfitrión endógena (CMI)).

Ejemplo 7: Amplificación del minímero

Se diseñó una prueba de diagnóstico de RT-PCR en tiempo real para amplificar y detectar la presencia de ARN genómico de BVDV. El amplicón diana de origen natural tiene una longitud de 206 bases. Para crear un control positivo para esta prueba, se diseñó y sintetizó un amplicón de ARN del minímero como control para la actividad adecuada de los reactivos de detección de cebador y sonda. El amplicón del minímero resultante tiene 65 bases de longitud. Como comparación, se utilizó una molécula de ADN sintético de 236 bases como molde para la misma prueba.

El molde de ARN del minímero y el molde de ADN sintético se amplificaron por PCR en una sola ronda de un termociclador, y en la misma placa de microtitulación. Los parámetros de termociclación fueron: 60°C durante 5 minutos, 65°C durante 5 minutos, 95°C durante 30 segundos; 45 ciclos de: 95°C durante 15 segundos, 60°C durante 30 segundos; mantenimiento a 40°C. Las reacciones de PCR del molde de ADN y de ARN se ensamblaron a partir de la misma mezcla maestra, que contenía HawkZO5, una enzima que incorpora actividades ADN polimerasa tanto dependientes de ADN como dependientes de ARN (es decir, transcriptasa inversa) (Roche Diagnostics Corporation, Indianápolis, IN, USA).

Como se muestra en la Figura 6A, el amplicón de ARN de minímero sintético era un molde eficaz para la transcripción inversa y la posterior amplificación de ADN. Como se muestra en la Figura 6B, el molde de ADN produjo resultados similares al molde de ARN. Estos resultados demuestran la viabilidad y la utilidad de los minímeros de ARN sintéticos como controles positivos en las pruebas de PCR.

Sorprendentemente, el molde de ADN se amplificó eficazmente, a pesar de que tanto la mezcla de detección como el programa de ciclación se diseñaron originalmente para amplificación de ARN, es decir, la mezcla de detección contenía la transcriptasa inversa HawkZO5 y el programa de termociclación incluía etapas diseñadas para respaldar

la transcripción inversa de ARN a ADN.

Por lo tanto, a través de los métodos descritos en la presente memoria, tanto los polinucleótidos de ARN como los de ADN se pueden amplificar utilizando una única mezcla maestra utilizando una enzima que tiene actividad de polimerasa dependiente de ADN y actividades de ADN polimerasa dependiente de ARN (por ejemplo, HawkZO5). Además, tanto los polinucleótidos de ARN como los de ADN se pueden amplificar con un solo programa de termociclación. Por lo tanto, tanto los polinucleótidos de ARN como los de ADN se pueden amplificar simultáneamente en un solo termociclador. Tanto los polinucleótidos de ARN como los de ADN se pueden amplificar en recipientes de reacción iguales o separados situados en un solo dispositivo de múltiples pocillos, tal como una placa de microtitulación, o un dispositivo que tiene una multitud de micropocillos o nanopocillos.

10 Ejemplo 8: Universalidad de los componentes

Los oligonucleótidos de control sintético se fabricaron para las dianas enumeradas en la Tabla 7. (*M. synoviae*, *M. gallisepticum*, GAPDH aviar, BVDV, y la secuencia distintiva). Se preparó un control positivo diana agrupado que estaba compuesto por cada oligonucleótido sintético. Todos los oligonucleótidos se utilizaron a 1.000 copias/reacción excepto para la secuencia distintiva, que se añadió a 4.000 copias/reacción. La solución se sometió a prueba por triplicado con las respectivas mezclas de detección para cada diana. La mezcla de detección de MG/MS es un multiplex para MG, MS y GAPDH. El BVDV y las pruebas de secuencia distintivas son monoplex. El oligonucleótido de BVDV era una versión de mínimo de ARN de una secuencia de ARN diana natural, como se muestra en el Ejemplo 7. Todas las reacciones se llevaron a cabo en una ronda del aparato en la misma placa y utilizando así el mismo programa de termociclación.

20 Los parámetros de termociclación fueron: 60°C durante 5 minutos, 65°C durante 5 minutos, 95°C durante 30 segundos; 45 ciclos de: 95°C durante 15 segundos, 60°C durante 30 segundos; mantenimiento a 40°C.

Las cinco dianas se amplificaron satisfactoriamente o desde la agrupación. Este experimento demuestra que un CPA puede comprender ácidos nucleicos tanto de ARN como de ADN; que las reacciones de PCR y RT-PCR se pueden llevar a cabo con un único protocolo de termociclación; que tanto las reacciones de PCR como las de RT-PCR se pueden llevar a cabo en una única placa y/o en una sola ronda del aparato; que la detección de un CMI se puede multiplexar con la detección de al menos una diana de enfermedad en el mismo recipiente de reacción (pocillo); y que se puede emplear un mínimo como control positivo para una secuencia diana natural más larga.

Tabla 7

Mezcla de detección	Mezcla maestra	Diana	Valor de Pc
DMx MG/MS	ADN	<i>M. synoviae</i> (MS)	27,45
		<i>M. gallisepticum</i> (MG)	27,53
		GAPDH (CIM)	26,38
BVDV	ARN	BVDV	26,84
Secuencia distintiva	ADN	Secuencia distintiva	25,77

30 Lista de secuencias

<110> Laboratorios IDEXX

<120> Controles y kits de amplificación de ácidos nucleicos y métodos de uso de los mismos

35 <130> 12-1200

<150> 61/715596

<151> 18-10-2012

40 <150> 61/790854

<151> 15-03-2013

<160> 22

	<170> PatentIn versión 3.5	
	<210> 1	
	<211> 80	
5	<212> ARN	
	<213> Desconocido	
	<220>	
10	<223> Control positivo interno de ARN	
	<400> 1	
	ggcuccagga uugcucuuca gguaucuccc cucuuugaga agggccacau ccuacuucu	60
	aguuucagcu ggaaaggcuu	80
15	<210> 2	
	<211> 80	
	<212> ADN	
	<213> Desconocido	
20	<220>	
	<223> Control positivo interno de ADN	
	<400> 2	
	agacaagctg gtggcctgaa agaatctccc ctctttgaga agggccacat ccctacttct	60
25	agtttcagct ggaaaggctt	80
	<210> 3	
	<211> 22	
	<212> ADN	
30	<213> Desconocido	
	<220>	
	<223> Cebador directo de control positivo interno de ARN	
35	<400> 3	
	gctccaggat tgctcttcag gt	22
40	<210> 4	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Desconocido	
	<220>	
45	<223> Cebador directo de control positivo interno de ADN	
	<400> 4	
50	gacaagctgg tggcctgaaa g	21
	<210> 5	
	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Desconocido	
55	<220>	
	<223> Sonda de hidrólisis conservada	
	<400> 5	
60	ctcccctctt tgagaagggc cacatc	26

ES 2 685 710 T3

	<210> 6		
	<211> 27		
	<212> ADN		
	<213> Desconocido		
5	<220>		
	<223> Primer inverso conservado		
	<400> 6		
10	agcctttcca gctgaaacta gaagtag	27	
	<210> 7		
	<211> 28		
15	<212> ADN		
	<213> Mycoplasma gallisepticum		
	<400> 7		
20	ctgggttgat tgtgtttct ttactctt	28	
	<210> 8		
	<211> 30		
	<212> ADN		
25	<213> Mycoplasma gallisepticum		
	<400> 8		
30	cttagcgatc ggaatcccaa tcctaaacc	30	
	<210> 9		
	<211> 26		
	<212> ADN		
	<213> Mycoplasma gallisepticum		
35	<400> 9		
	acgttcttgg atcatcattc ttctct	26	
40	<210> 10		
	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Desconocido		
45	<220>		
	<223> Promotor del fago T7		
	<400> 10		
50	taatacgact cactataggg	20	
	<210> 11		
	<211> 140		
	<212> ADN		
55	<213> Desconocido		
	<220>		
	<223> Secuencia distintiva artificial		
60	<400> 11		
	ctccacttca ggtatcactc agtttgaact gcaagacaag ctgaaagaat ctcgagaagg	60	
	gccactttcta gtttcaggct tgggcacagc agatgaaaat aaagaaagaa aggaccaggc	120	
	caaggctaca ggccaaagat	140	

<210> 12
 <211> 24
 <212> ADN
 5 <213> Desconocido

 <220>
 <223> Cebador para la secuencia distintiva artificial

 10 <400> 12

 caagctgaaa gaatctcgag aagg 24

 <210> 13
 15 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Desconocido

 <220>
 20 <223> Cebador para la secuencia distintiva artificial

 <400> 13

 ctggctcttt ctttctttat ttcatc 27
 25
 <210> 14
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Desconocido
 30
 <220>
 <223> Sonda para la secuencia distintiva artificial

 <400> 14
 35
 ccacttctag ttccaggctt gggcacag 28

 <210> 15
 <211> 26
 40 <212> ADN
 <213> Desconocido

 <220>
 <223> Cebador artificial para ADN 18S eucariótico
 45
 <400> 15

 gattaagcca tgcattgtcta agtacg 26
 50
 <210> 16
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Desconocido
 55
 <220>
 <223> Cebador artificial para ADN 18S eucariótico

 <400> 16
 60
 caaaggaacc ataactgatt taatgagc 28

 <210> 17
 <211> 24
 <212> ADN
 65 <213> Desconocido

ES 2 685 710 T3

	<220>		
	<223> Sonda artificial para ADN 18S eucariótico		
	<400> 17		
5	cacggccggt acagtgaac tgcg	24	
	<210> 18		
	<211> 20		
10	<212> ADN		
	<213> Desconocido		
	<220>		
	<223> Cebador artificial para ADN ribosómico 16S bacteriano		
15	<400> 18		
	ggatgatcag ccacactga	20	
20	<210> 19		
	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> Desconocido		
25	<220>		
	<223> Cebador artificial para ADN ribosómico 16S bacteriano		
	<400> 19		
30	ccaatattcc tactgctgc c	21	
	<210> 20		
	<211> 26		
	<212> ADN		
35	<213> Desconocido		
	<220>		
	<223> Sonda artificial para ADN ribosómico 16S bacteriano		
40	<400> 20		
	cccgtaggag tctggaccgt gtctca	26	
	<210> 21		
	<211> 183		
45	<212> ARN		
	<213> Bos Taurus		
	<400> 21		
	gaaugaagug gaccuaguug ucauucgcu gaaggaccug cccacggugc uuccuccugg	60	
	cuucaccauu ggagcugucu gcaagcggga gagcccuau gaugcuguug ucuuacccc	120	
	aaaauuuguu gggaagacuc uagaaaccuu gccagagaag agugugguag gaacuagcuc	180	
50	ccu	183	
	<210> 22		
	<211> 78		
	<212> ARN		
55	<213> Bos Taurus		
	<400> 22		
	gaaugaagug gaccuaguug ucauuccgu gcuuccuccu ggcuucaccu agaagagugu	60	
	gguaggaacu agcucccu	78	
60		38	

REIVINDICACIONES

1. Un kit de amplificación de ácido nucleico que comprende:

(a) una mezcla maestra que comprende una o más ADN polimerasas, nucleósidos trifosfato y, opcionalmente, una o más transcriptasas inversas;

5 (b) un control positivo diana agrupado que comprende dos o más polinucleótidos de control positivos diana bacterianos o virales para dos o más polinucleótidos diana y uno o más polinucleótidos de secuencia distintiva que no se amplifican de manera cruzada con ninguno de los otros polinucleótidos o controles en el kit; y

10 (c) una mezcla de detección de control de muestra interno que comprende uno o más cebadores directos, uno o más cebadores inversos, y una o más sondas que pueden amplificar y detectar uno o más polinucleótidos eucarióticos conservados.

2. El kit de amplificación de ácido nucleico de la reivindicación 1, en donde las una o más ADN polimerasas se combinan con una o más polimerasas de transcriptasa inversa.

15 3. El kit de amplificación de ácido nucleico de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente una mezcla de detección de polinucleótido diana específico del ensayo que comprende uno o más cebadores directos específicos del ensayo, uno o más cebadores inversos específicos del ensayo, y una o más sondas específicas del ensayo.

4. El kit de amplificación de ácido nucleico de la reivindicación 1, en donde el control positivo diana agrupado comprende 10, 20, 30 o más polinucleótidos de control positivo diana para 10, 20, 30 o más polinucleótidos diana.

20 5. El kit de amplificación de ácido nucleico de la reivindicación 1 que comprende adicionalmente una mezcla de detección de control de calidad que comprende uno o más de:

25 (a) un par de polinucleótidos de control positivo interno que comprende un polinucleótido de control positivo interno (CPI) de ADN y un polinucleótido de control positivo interno (CPI) de ARN, en donde el CPI de ADN y el CPI de ARN comparten una o dos regiones de unión del cebador directo, regiones de unión de la sonda, o regiones de unión del cebador inverso iguales o similares, y en donde una o dos de las regiones de unión del cebador directo, regiones de unión de la sonda, o regiones de unión del cebador inverso del CPI de ADN y el CPI de ARN son diferentes; y

(b) una mezcla de detección PanB que comprende uno o más cebadores directos, uno o más cebadores inversos y una o más sondas que pueden amplificar y detectar uno o más polinucleótidos procarióticos conservados.

30 6. El kit de amplificación de ácidos nucleico de la reivindicación 3, en donde la mezcla de detección de polinucleótidos diana específica del ensayo comprende adicionalmente uno o más cebadores directos de control positivo interno, uno o más cebadores inversos de control positivo interno, y una o más sondas de control positivo interno.

35 7. El kit de amplificación de ácido nucleico de la reivindicación 5, en donde la mezcla maestra, el control positivo diana agrupado y el par de polinucleótidos de control positivo interno son componentes universales que se pueden utilizar con cualquier mezcla de detección de polinucleótido diana específica del ensayo.

8. El kit de amplificación de ácido nucleico de la reivindicación 3, en donde la mezcla de detección de polinucleótidos diana específica del ensayo comprende cebadores inversos específicos del ensayo, cebadores directos específicos del ensayo y una o más sondas específicas del ensayo para dos o más polinucleótidos diana diferentes.

40 9. El kit de amplificación de ácido nucleico de la reivindicación 8, en donde las una o más sondas específicas del ensayo para dos o más polinucleótidos diana diferentes son sondas para dos o más polinucleótidos diana diferentes que son polinucleótidos de ARN y polinucleótidos de ADN.

45 10. El kit de amplificación de ácido nucleico de la reivindicación 1, en donde uno o más de los polinucleótidos de control positivo diana agrupados comprenden una región de unión del cebador directo, una región de unión de la sonda y una región de unión del cebador inverso, en donde cada una de la región de unión del cebador, la región de unión de la sonda, y la región de unión del cebador inverso tiene homología con una región de unión del cebador directo, una región de unión de la sonda y una región de unión del cebador inverso correspondientes en un polinucleótido diana, y en donde los uno o más polinucleótidos de control positivo diana agrupados tiene 10 o más bases de ácido nucleico menos que una región del polinucleótido diana que comprende la región de unión del cebador directo, la región de unión de la sonda, la región de unión del cebador inverso y cualquier región intermedia para la cual los polinucleótidos de control positivo diana sirven como control.

50 11. El kit de amplificación de ácido nucleico de la reivindicación 1, en donde los dos o más polinucleótidos de control positivo diana para dos o más polinucleótidos diana comprenden polinucleótidos de control positivo diana tanto de

ADN como de ARN.

12. El kit de amplificación de ácido nucleico de la reivindicación 1, en donde la concentración molar de los uno o más polinucleótidos de secuencia distintiva es mayor que la concentración molar de los dos o más polinucleótidos de control positivo diana.

- 5 13. El kit de amplificación de ácido nucleico de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente un cebador directo para la secuencia distintiva, un cebador inverso para la secuencia distintiva, y una o más sondas que pueden detectar la secuencia distintiva.

CPI_ARN		GGUCCAGGAU--UGCUCUUCAGGUAUCUCCCCUCUUUGAGAAGGCCACAUCGCCUACUU
CPI_ADN	* ** * *	AGA--CAAGCTGGTGGCCTGAAAGAATCTCCCCTCTTTGAGAAGGCCACATCCCTACTTT
		** * * * *
CPI_ARN		CUAGUUUCAGCUGGAAAGGCUU
CPI_ADN		CTAGT ^{TTC} TTCAGCTGGAAAGGCTTT
		* ** * * * *

Figura 1A: Secuencia de ácido nucleico para CPI de ARN y CPI de ADN. El CPI de ARN tiene SEQ ID NO: 1. El CPI de ADN tiene SEQ ID NO: 2.

Cebador directo de CPI de ARN	5' - GCTCCAGGATTCCTCTTCAGGT-3' (SEQ ID NO:3)
Cebador directo de CPI de ADN	5' - GACAAGCTGGTGGCCCTGAAAG-3' (SEQ ID NO:4)
Sonda de hidrólisis conservada	5' - CTCCCCCTCTTTGAGAGGGCCACATC-3' (SEQ ID NO:5)
Cebador inverso conservado	5' - AGCCCTTTCAGCTGAAACTAGAAAGTAG-3' (SEQ ID NO:6)
<i>M. gallisepticum</i> directo NO:7)	5' - CTGGGTTTGATTGTTGTTCTTCTTACTCTT-3' (SEQ ID NO:7)
<i>M. gallisepticum</i> sonda	5' - CTTAGCGATCGGAATCCCAATCCCTAAACC-3' (SEQ ID NO:8)
<i>M. gallisepticum</i> inverso	5' - ACGTTCCTTGGATCATCATCTTCTTCTT-3' (SEQ ID NO:9)

Figura 1B

FIGURA 2 A

Barra de herramientas de componentes

Secuencia	Directo	Sonda	Inverso
I	1	1	1
II	2	2	2
III	3	3	3

FIGURA 2 B

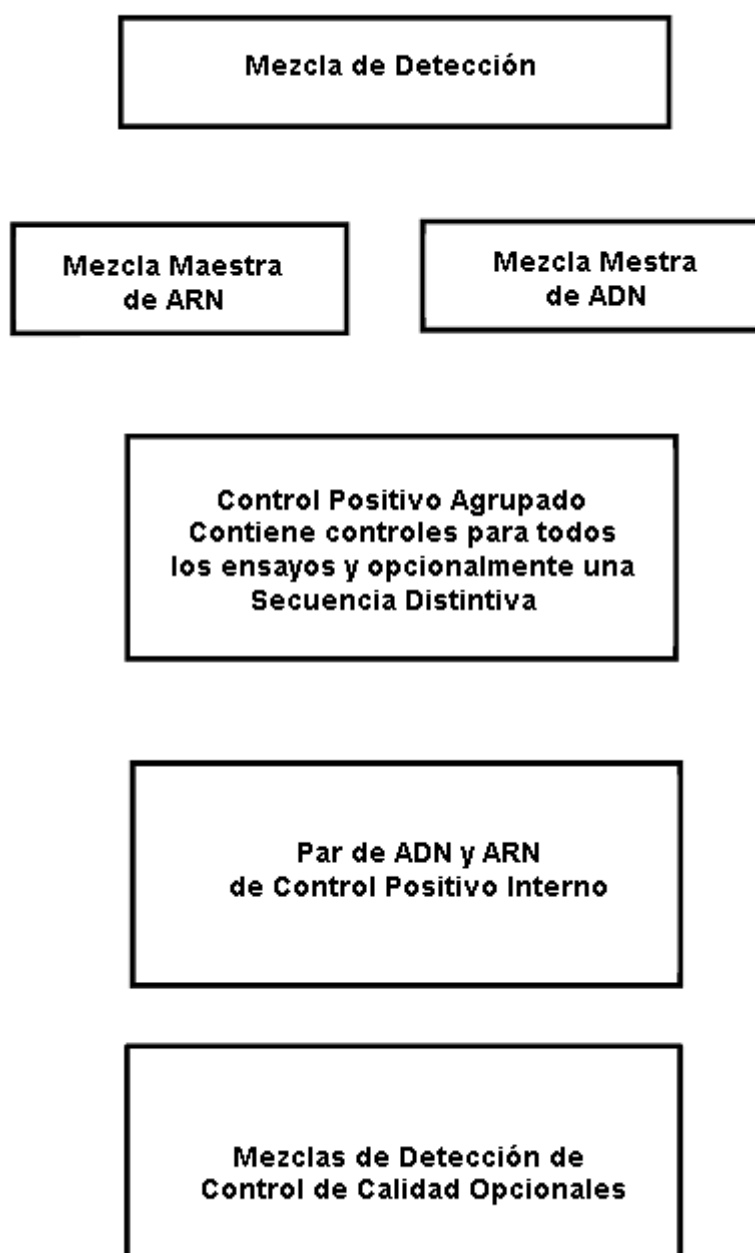
CPI de ADN

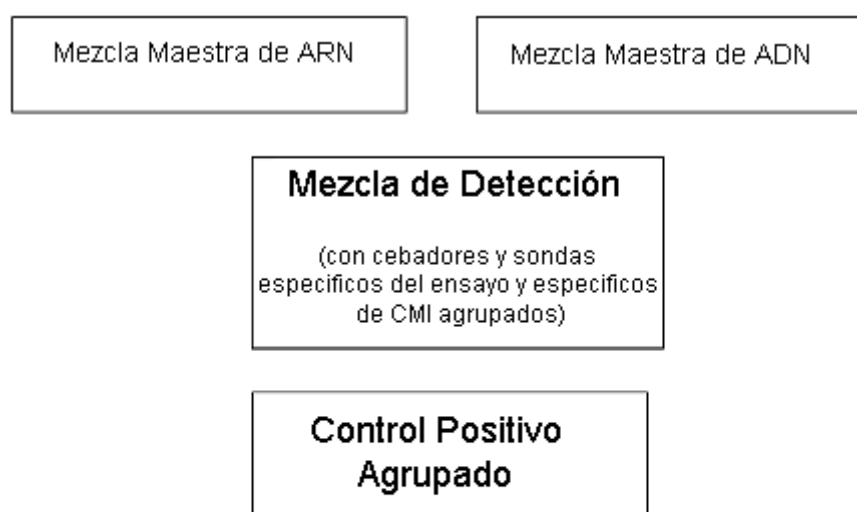
Par 1:	ADN-A	ADN-1		ADN-3		ADN-1
Par 2:	ADN-B	ADN-1		ADN-1		ADN-3
Par 3:	ADN-C	ADN-2		ADN-3		ADN-1

CPI de ARN

Par 1:	ARN-A	ARN-3		ARN-3		ARN-1
Par 2:	ARN-B	ARN-1		ARN-2		ARN-3
Par 3:	ARN-C	ARN-2		ARN-3		ARN-2

Figura 3A





Reactivos de Control de Calidad Opcionales

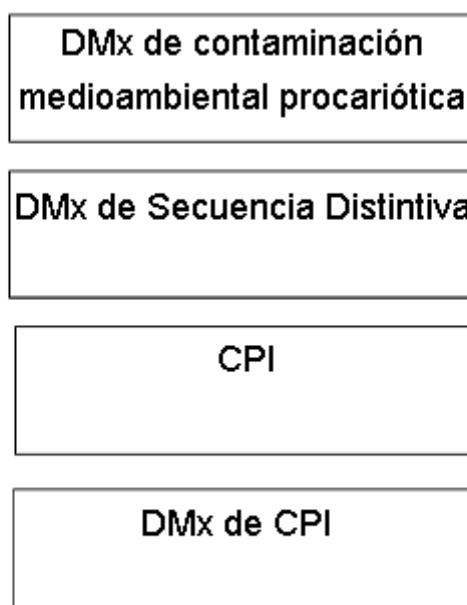


Figura 3B

	Secuencia Distintiva
Secuencia Distintiva (molde)	
	CTCCACTTCAGGTATCACTCAGTTTGAAGCTGCAAGACAAGCTGAAAGAATCTCGAGAAAGGCC
	<u>ACTTCTAGTTTCAGGCTTGGGCACAGCAGATGAAATAAAGAAAGAACGACCAAGG</u>
	CTACAGGCCAAAGAT (SEQ ID NO:11)
Longitud: 140 nt	
Cebadores de Secuencia Significativa:	
IDEXXsig-67f	CAAGCTGAAAGAATCTCGAGAAGG (SEQ ID NO:12)
IDEXXsig-149r	CTGGTCCTTTCTTTTATTTTCATC (SEQ ID NO:13)
Longitud del producto de la PCR: 83 pb	
Sonda de la Secuencia Distintiva:	
IDEXXsig-92p	CCACTTCTAGTTTCAGGCTTGGGCACAG (SEQ ID NO:14)

Figura 4

Figura 5A

HMBS1

GAAUGAAGUGGACCUAGUUGUUCUAUUCGUCUGAAGGACCUGCCACGGUGCUUCCUCCUGG
CUUCACCAUUGGAGCUGUCUGCAAGCGGGAGAGCCCCUAUGAUGCUGUUGUCUUUCACCC
 AAAUUUGUUGGGAAGACUCUCUAGAAAACCUUGCCAGAGAAGAGUGGUGAGGAACUAGCUC
 CCU

Figura 5B

Mínimo de HMBS1

GAAUGAAGUGGACCUAGUUGUUCUAUUCGUCUGCUUCCUCCUCCUCCUAGAGAGUGU
GGUAGGAACUAGCUCCCU

Figura 5A-B: Amplicones diana hipotéticos para ARNm de *Bos taurus*. Los sitios de unión del cebador están subrayados. El sitio de unión de la sonda a la hebra positiva está doblemente subrayado. **A.** Secuencia de tipo salvaje para ARNm de *hmbst1* de *Bos taurus*; la longitud del amplicón es de 166 bases (SEQ ID NO: 21). **B.** Amplicón diana modificado con las secuencias intermedias retiradas. La longitud total del mínimo es de 78 bases. La longitud del amplicón del mínimo es de 61 bases (SEQ ID NO: 22)

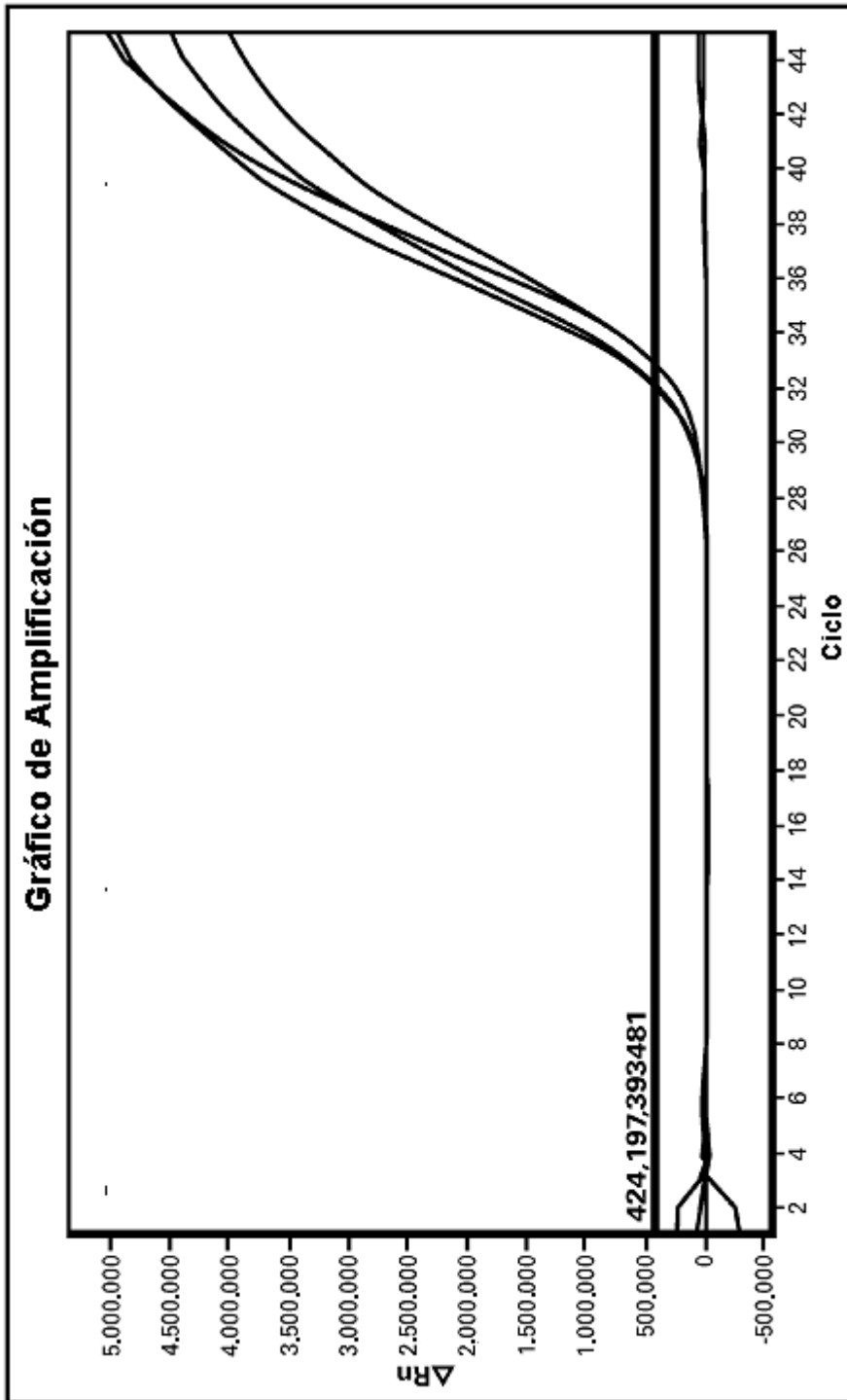


Figura 6A. Curvas de amplificación de control de ARN de minímero sintético para BVDV.

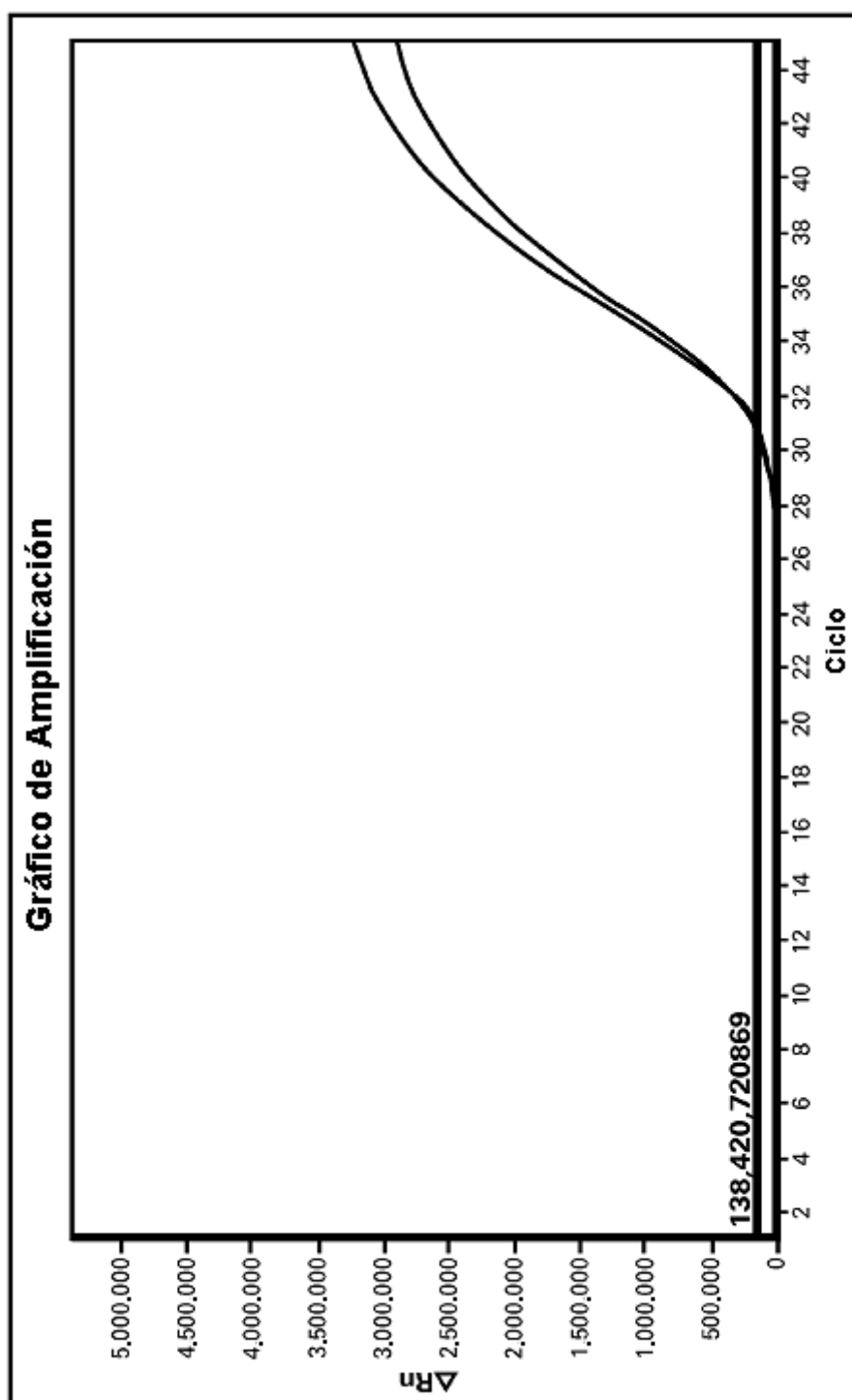


Figura 6B. Curvas de amplificación de un oligómero de ADN completo (tamaño del amplicón 206 bases).