



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 286 983**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **00302976 .6**

86 Fecha de presentación : **07.04.2000**

87 Número de publicación de la solicitud: **1045036**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **18.10.2000**

54 Título: **Procedimientos y dispositivos para realizar análisis de una muestra de ácido nucleico.**

30 Prioridad: **13.04.1999 US 291566**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.12.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.12.2007

73 Titular/es: **Biomerieux, Inc.**
595 Anglum Drive, Hazelwood
Missouri 63042-2905, US

72 Inventor/es: **Rogers, Charles H.**

74 Agente: **Carpintero López, Francisco**

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

Procedimientos y dispositivos para realizar análisis de una muestra de ácido nucleico.

5 **Antecedentes de la invención**1. **Campo técnico**

10 El campo de la invención se refiere a procedimientos y dispositivos para realizar ensayos de una muestra analítica o biológica, tal como, por ejemplo, con el propósito de identificar microorganismos o virus en una muestra de ensayo, y/o la susceptibilidad o resistencia de los microorganismos o virus a fármacos. La invención se refiere en particular al campo de los procedimientos y dispositivos para la detección y el análisis de ácidos nucleicos presentes en una muestra de ensayo biológica.

15 **2. Revisión técnica**

El examen de ácidos nucleicos es un área para el análisis de muestras de ensayo que evoluciona continuamente que incluye la investigación de la secuencia genética y expresión. Inicialmente, se aísla una muestra de ensayo de un paciente humano u otra fuente y los ácidos nucleicos objetivo en la muestra se amplifican para aumentar el número de copias para permitir analizar la muestra de ensayo. Las copias de las secuencias objetivo después se hibridan con una o más sondas de oligonucleótidos complementarias en solución o combinadas con un soporte sólido que incorpora sondas complementarias para formar un complejo de hibridación. También se puede hibridar una sonda detectora con las secuencias objetivo en algunas reacciones. Se logra la detección e identificación del producto de hibridación cuando se genera una señal desde el complejo de hibridación formado. Mediante la amplificación de secuencias de ácidos nucleicos se obtiene información sobre la presencia o ausencia de microorganismos de la muestra sin recurrir al cultivo de microorganismos.

Se describe un procedimiento de amplificación en las patentes de EE.UU. 4.683.195 (Mullis) y 4.683.202 (Mullis), en las que una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usa ADN polimerasa, moléculas cebadoras complementarias y ciclos repetidos de reacciones térmicas para replicar exponencialmente moléculas de ácido nucleico objetivo. La patente de EE.UU. 5.792.607 (Backman) describe procedimientos de amplificación denominados reacciones en cadena de la ligasa (LCR). Las patentes de EE.UU. 5.744.311 (Fraiser); 5.648.211 (Fraiser) y 5.631.147 (Lohman), describen sistemas de amplificación isotérmica basados en la amplificación por desplazamiento de cadena (SDA). Véase también, Walker, y col., *Nuc. Acids. Res.* 20, 1691-1696 (1992), y las patentes de EE.UU. 5.437.900 (Burg) y EP373960 (Gingeras), que describen la amplificación isotérmica. Se describen también otros procedimientos de amplificación en las patentes de EE.UU. 5.399.491 (Kacian) y 5.409.818 (Davey).

Se han descrito técnicas de hibridación por ejemplo, en las patentes de EE.UU. 4.563.419 (Ranki) y 4.851.330 (Kohne) y Dunn, y col., *Cell* 12, pp. 23-26 (1978), entre otras muchas publicaciones. En la técnica se conocen diferentes modificaciones de las reacciones de hibridación incluidas la hibridación en solución o las sondas de captura sobre un soporte sólido en una o más etapas de reacción.

Los procedimientos de detección descritos en las patentes de EE.UU. 4.486.539 (Kourlisky); 4.411.955 (Ward); 4.882.269 (Schneider) y 4.213.893 (Carneo), ilustran la preparación de sondas de detección marcadas para detectar secuencias de ácidos nucleicos específicas. Se han conjugado marcadores detectables, directa o indirectamente mediante brazos conectores en la base, el azúcar o el resto fosfato de uno o más oligonucleótidos específicos. Los marcadores conocidos en la técnica incluyen fluorocromos, radioisótopos, colorantes, enzimas tales como la fosfatasa alcalina y moléculas luminiscentes y quimioluminiscentes. Las sondas detectoras se pueden unir a los productos de reacción de ácidos nucleicos amplificados o amplicones. La cantidad de señal detectada de las sondas detectoras marcadas después de hibridación a los amplicones refleja la presencia o ausencia de amplicones y por lo tanto de uno o más ácidos nucleicos objetivo seleccionados en la muestra de ensayo original.

En general, la amplificación de cantidades iniciales conocidas de un control interno en una muestra, después la hibridación con sondas detectoras que tienen una secuencia o sentido opuesto para formar un complejo con los amplicones de control interno y finalmente la detección de la señal generada, proporcionan un procedimiento para permitir la determinación cualitativa y cuantitativa de ácidos nucleicos objetivo en una muestra de ensayo.

Se describen procedimientos cuantitativos para determinar la cantidad de objetivo presente en la muestra de ensayo en las patentes de EE.UU. 5.213.961 (Bunn); 5.476.774 (Wang); 5.705.365 (Ryder) y 5.457.027 (Nadeau).

En el mercado se encuentran disponibles kits de detección y usan algunas de las técnicas de amplificación, hibridación, detección de marcador y cuantificación a las que se ha hecho referencia antes. Por ejemplo, se describe un ensayo de VIH que detecta el ácido nucleico amplificado en la patente de EE.UU. 5.559.662 (Respass) y Gratzl, y col., *J. Virol. Methods* 66, pp. 269-292 (1997). Los kits que logran dicha amplificación de los ácidos nucleicos del VIH incluyen el Chiron QUANTIPLEX Branched DNA y Organon Teknika NASBA-QT.

Se describe un kit de ensayo para *M. tuberculosis* en la patente de EE.UU. 5.643.723 (Persing) y se describen ácidos nucleicos para ensayos de micobacterias en las patentes de EE.UU. 5.589.585 (Mabilat); 5.702.317 (Mabilat) y 5.849.901 (Mabilat).

- 5 El análisis de secuencias de ácidos nucleicos se puede dividir en dos categorías diferentes: formatos de detección limitada o detección baja, y formatos de detección múltiple o detección alta. La diferencia es el número de señales o respuestas de datos específicos que se pueden obtener de los formatos.

10 El documento EP 0875584 describe un instrumento que usa un formato de detección baja. Se puede medir un solo tipo de marcador fluorescente unido a una sonda de detección para determinar la presencia de ácidos nucleicos complementarios en la muestra de ensayo. Usando esta técnica de forma secuencial, se ha mostrado que el instrumento puede medir al menos dos objetivos específicos en una muestra de ensayo. Alternativamente, se pueden medir múltiples marcadores simultáneamente en un ensayo de cribado (por ejemplo, marcadores fluorescentes o luminiscentes con diferentes propiedades de emisión). Sin embargo, por razones prácticas, el número de analitos objetivo que se pueden
15 medir en un ensayo de cribado sigue siendo menos de diez. Se considera que estas técnicas están incluidas en la categoría de formatos de detección baja.

20 El diseño o selección de un panel de ensayos en un formato de detección baja vendrá determinado en parte por la necesidad del cliente, por la incidencia de la enfermedad en un sitio particular, por la prevalencia de la coinfección de microorganismos y/o virus y condiciones ambientales, por nombrar unos pocos. Aunque los formatos de resolución baja o detección baja tales como los kits de detección de ácidos nucleicos indicados antes son útiles para detectar la presencia de una serie conservada o limitada de secuencias objetivo, estos ensayos han sido menos eficaces para obtener niveles más altos de datos o detalles sobre los ácidos nucleicos objetivo que son necesarios para el análisis de una variante particular, su susceptibilidad a fármacos o la presencia de una mutación.

25 La segunda categoría de procedimientos analíticos es un formato de detección múltiple o detección alta. Estos procedimientos pueden proporcionar información más detallada sobre los amplicones objetivo. Un ejemplo de esto es la técnica de transferencia de mancha inversa, en la que se hibridan ácidos nucleicos con múltiples sondas complementarias inmovilizadas sobre una matriz. Después de la tinción, las múltiples secciones que se tiñen indican la presencia
30 de objetivo(s) complementarios. Otra técnica proporciona una matriz dirigible en el espacio y dirigido a la luz sobre la que se depositan numerosos oligonucleótidos.

35 Los avances recientes en el análisis genético a gran escala utilizan oligonucleótidos montados en forma de matrices de detección múltiple por técnicas de microfabricación. Se describen síntesis y procedimientos de estas matrices en las patentes de EE.UU. 5.700.637 (Southern); 5.445.934 (Fodor); 5.807.522 (Brown); 5.202.231 (Drmanac) y 5.837.832 (Chee). Las matrices permiten reacciones de hibridación en las que sondas marcadas o amplicones marcados exploran los oligonucleótidos inmovilizados para la identificación de variantes o mutaciones tales como una o múltiples sustituciones de bases. En un ejemplo de una aplicación Fodor, Stephen y col., "Light-Directed, Spatially Addressable Parallel Chemical Synthesis", *Science*, Vol. 251 pp.767-773 (1991), describen matrices de detección múltiple para
40 detectar virus de inmunodeficiencia humana.

Aunque se han usado formatos tanto de baja como de alta detección en los ensayos analíticos y de diagnóstico, tienen diferentes capacidades. Los formatos de detección baja tienen la ventaja de la simplicidad, coste relativamente bajo y capacidad para responder cuestiones específicas relacionadas con la muestra, por ejemplo, si esta muestra
45 contiene ácidos nucleicos típicos de una región del virus del VIH. Los formatos de detección alta son más caros pero pueden proporcionar incluso más datos o información para el análisis, por ejemplo, si esta muestra de ácido nucleico del VIH tiene mutaciones de la secuencia natural, y si las tiene, cuáles son. Debido a su coste, los formatos de detección múltiple o detección alta no se han considerado medios rentables para los ensayos de cribado rutinarios. Así pues, los ensayos comerciales típicamente se han proporcionado como formatos de detección limitada o baja, principalmente
50 para confirmar una hipótesis médica como se ilustra en la figura 1.

En la figura 1, el procedimiento de ensayo se inicia con la hipótesis de que el paciente padece tuberculosis. Se obtiene una muestra respiratoria de un esputo del paciente en la etapa 10. La muestra se procesa en la etapa 12 para preparar el organismo para el cultivo. Después la muestra se divide y una parte se usa para cultivar los organismos.
55 En la etapa 14, una segunda parte de la muestra se somete a un ensayo de frotis ácidorresistente. Si el resultado del ensayo de frotis ácidorresistente es negativo, el médico debe esperar los resultados del cultivo como se indica en 16. Si es positivo, el especialista clínico procesa la muestra otra vez, y se somete a un ensayo específico de especie de TB amplificado realizado en 18. En la etapa 22, un ensayo de Avium intracelular amplificado puede ser un tercer ensayo realizado en la muestra de ensayo para identificar la muestra. Si el resultado en la etapa 22 es negativo, la muestra de
60 ensayo o una segunda muestra nueva se puede someter a una posterior reacción de ensayo o cultivos para determinar si hay patógenos presentes en la muestra.

La figura 1 es un ejemplo típico de un ensayo de bajo coste conocido en la técnica anterior, y el "frotis ácidorresistente" (etapa 14) se usa para rechazar el 90% de las muestras de ensayo que se sospecha que incluyen micobacterias
65 que son negativas. Los ensayos posteriores se pueden justificar para usar en el 10% de las muestras que son positivas, pero aunque los costes de los ensayos sean bajos, no se puede justificar el gasto de trabajo y manipulación de las muestras si deben usarse para todas las muestras de ensayo.

Siguen siendo necesarios instrumentos y procedimientos automáticos que no solo incluyan si no que vayan más allá del cribado de detección limitado para el análisis de ácidos nucleicos. La disponibilidad de dicho instrumento proporcionará información y datos valiosos, por ejemplo, en la identificación de trastornos genéticos que pueden producir efectos fisiológicos que mimetizan o se superpongan a otros trastornos genéticos. También es necesario un sistema de instrumentos que pueda proporcionar estaciones de ensayo integradas y datos para determinar la resistencia de los microorganismos a un fármaco disponible, para decidir la terapia adecuada. Además, dicho sistema debe apuntar a una manipulación mínima por parte del investigador o personal clínico, en especial en las etapas que implican la preparación, amplificación y detección de la muestra. Debe ser preferiblemente aplicable como una herramienta para mejorar el seguimiento, recogida de datos, secuenciación y genotipo de ácidos nucleicos limitando a la vez el riesgo de contaminación entre cada ensayo o etapa. El sistema también debe ser preciso, muy sensible y disponible para el cliente con costes razonables.

Resumen de la invención

La presente invención proporciona un procedimiento y sistema de instrumentos para controlar automáticamente la elección de cuándo usar un formato de detección múltiple o detección alta para el análisis adicional de ácidos nucleicos. Estos procedimientos incluyen las etapas de detectar los amplicones objetivo producidos por al menos una reacción de amplificación en un formato de detección limitada o detección baja y después usar un algoritmo de control en un sistema integrado que incorpora datos o señales del formato de baja detección para determinar si los amplicones objetivo se analizan con el uso y coste de un formato de detección alta. El sistema usa los datos de salida de una primera reacción de ensayo como datos de entrada para el algoritmo de control y la selección de un formato de detección alta.

Un objetivo adicional de la invención es proporcionar uno o más datos de señales de una o más primeras reacciones de ensayo para el análisis cualitativo y/o cuantitativo. En una primera reacción de ensayo, un ácido nucleico objetivo amplificado de una muestra de ensayo junto con una secuencia de control interno amplificada que preferiblemente tiene una concentración conocida, se someten a reacciones de hibridación y detección para generar datos de señales. Las señales obtenidas se suministran a un módulo de control, se procesan y se comparan con las señales del nivel umbral específicas para la muestra objetivo/de ensayo o los amplicones de control interno. La combinación de señales se aplica a un algoritmo que determina si los amplicones objetivo se transfieren automáticamente a otra estación del instrumento para un análisis adicional. Si es pertinente, una segunda reacción de ensayo que usa uno o más formatos de detección alta seleccionados genera más datos analíticos para el o los amplicones objetivo, tal como la identificación de una variante, una mutación en la secuencia de ácido nucleico, susceptibilidad o resistencia a fármacos del microorganismo o el virus. El análisis de las segundas reacciones de ensayo incluye la hibridación de los amplicones en al menos un formato de detección alta.

En una realización preferida, la presente invención proporciona un instrumento para el análisis de ácidos nucleicos, que está compuesto de una estación de procesamiento de la muestra que preferiblemente incluye la capacidad de amplificación de ácidos nucleicos, las estaciones o módulos de la primera y segunda reacción y las estaciones de detección adecuados, y cada estación dirigida por un módulo de control. También se proporciona un conducto de fluidos o preferiblemente medios de transferencia de fluidos que opcionalmente conectan los amplicones de la primera estación de reacción de ensayo con la segunda estación o módulo de reacción de ensayo. Cada estación puede estar comunicada con otra regulada por el módulo de control. El módulo de control integra datos obtenidos de la primera estación de reacción y la correspondiente estación de detección en un bucle de retroalimentación para terminar el procedimiento o iniciar una segunda reacción en la segunda estación de reacción de ensayo seguido de detección y análisis de señales.

En otra realización de la presente invención, el sistema es un sistema de instrumentos automático modular que unifica los procedimientos de procesamiento, amplificación, hibridación y detección de la muestra, y además el sistema puede analizar si deben realizarse ensayos de recogida de datos adicionales en una muestra de ensayo y después realizar dichos ensayos de recogida de datos adicionales.

Un objetivo de la presente invención es usar tecnologías de bajo coste, es decir, formatos de detección limitada en un sistema automático, para “cribar” una secuencia de ácido nucleico objetivo en una muestra para determinar la necesidad de análisis posteriores. La etapa de cribado debe tener una sensibilidad alta pero una especificidad amplia para detectar como “positivas” al menos todas las muestras que se pueden analizar más con los formatos de detección alta del sistema.

En otro aspecto, se proporciona un sistema de instrumentos integral para la determinación completa de secuencias de ácidos nucleicos usando diferentes tecnologías de reacción, es decir, hibridación y/o detección. En una realización preferida se lleva a cabo un ensayo de cribado que usa una reacción de hibridación en solución homogénea y se usa una hibridación en matriz para el análisis de detección múltiple. En otro objetivo se puede proporcionar un análisis de cribado sin un protocolo de amplificación previo con el fin de proporcionar datos de señales al módulo de control con el propósito de definir la necesidad de realizar uno o más ensayos de hibridación basados en matriz.

Los sistemas de la invención se pueden usar, por ejemplo, en microbiología, virología, investigaciones de alimentos, ensayo de aguas, diagnósticos de enfermedades humanas y animales, y uso en investigaciones analíticas. Los materiales de muestra de ensayo o biológicos adecuados incluyen células o tejidos animales, humanos o vegetales,

sangre, orina, heces, mucosa nasal y uretral. Además la invención se puede usar en aplicaciones industriales tales como el procesamiento de alimentos, control de contaminación o investigación farmacéutica.

La presente invención supera las numerosas limitaciones inherentes a los objetivos de otras metodologías, y por lo tanto proporciona medios rentables para identificar de forma precisa y más completa ácidos nucleicos en una muestra biológica o de ensayo. Más en particular, en un aspecto de la invención se proporcionan datos críticos e información con el propósito de detectar una enfermedad, identificar la resistencia a fármacos y terapia.

Específicamente, una realización de la presente invención proporciona un sistema integrado de instrumentos para el análisis automático de ácidos nucleicos, que comprende:

a) una estación de procesamiento de la muestra para proporcionar una o más secuencias de ácidos nucleicos objetivo de una muestra de ensayo;

b) una primera estación de reacción de ensayo para llevar a cabo una primera reacción de hibridación en una o más secuencias de dichos ácidos nucleicos objetivo o sus secuencias complementarias, en el que dicha primera estación de reacción comprende un primer dispositivo de formato de detección limitada o baja que tiene medios para analizar al menos una y menos de 50, preferiblemente de 1 a 10, secuencias distintas de ácidos nucleicos;

c) una segunda estación de reacción para llevar a cabo una segunda reacción de hibridación en una o más de dichas secuencias de ácidos nucleicos o sus secuencias complementarias, en el que dicha segunda estación de reacción comprende un segundo dispositivo de formato de detección múltiple o alta que tiene medios para analizar más de cien secuencias distintas de ácidos nucleicos, que incluye más de 100 sondas de oligonucleótidos, cada una con una secuencia distinta, unida o inmovilizada sobre una matriz adecuada;

d) al menos un detector para determinar señales de detección de hibridación positivas para dichas secuencias de ácidos nucleicos o sus secuencias complementarias en dichas primera y segunda reacciones de hibridación; y

e) un módulo de control para el funcionamiento integrado de dichos instrumentos, en el que dicho módulo determina la necesidad de llevar a cabo la segunda reacción de hibridación basándose en los resultados de dicho detector, y del análisis de las señales de detección de dichas primera y segunda reacciones de hibridación.

En realizaciones adicionales, la presente invención proporciona el uso de dicho instrumento en procedimientos como los siguientes:

- Un procedimiento para llevar a cabo el análisis de ácidos nucleicos usando un instrumento como se describe en la reivindicación 1, que comprende las etapas de:

a) llevar a cabo una primera reacción de hibridación con formato de detección limitada o baja como se describe en la reivindicación 1 con un ácido nucleico objetivo o su secuencia complementaria, de una muestra de ensayo;

b) generar una señal a partir de dicha primera reacción de hibridación;

c) suministrar dicha señal a un módulo de control;

d) procesar dicha señal en dicho módulo de control para determinar si dicha señal es mayor que un nivel umbral;

e) en el caso de que dicha señal sea mayor que dicho nivel umbral, transferir dicho ácido nucleico objetivo o su secuencia complementaria a un dispositivo para

f) llevar a cabo una segunda reacción de hibridación con formato de detección múltiple o alta como se describe en la reivindicación 1; y

g) generar una señal a partir de dicha segunda reacción; y

h) procesar dicha señal en dicho módulo de control para analizar dicho ácido nucleico objetivo.

- Un procedimiento para llevar a cabo un análisis de ácidos nucleicos usando un instrumento como se describe en la reivindicación 1, que comprende las etapas de:

amplificar todas las secuencias de ácidos nucleicos objetivo en una muestra de ensayo y las secuencias de control interno que son necesarias para el análisis con formato de detección limitada o baja y múltiple o alta, como se describe en la reivindicación 1;

llevar a cabo un análisis con formato de detección limitada o baja como se describe en la reivindicación 1, de una o más secuencias de ácidos nucleicos amplificadas;

medir las señales de control interno y señales objetivo de dicho análisis de detección limitada;

suministrar dichas señales de control interno y dichas señales objetivo a un módulo de control;

implementar un algoritmo de control en dicho módulo de control, en el que dicho algoritmo:

- 5 i) compara dichas señales de control interno con un primer valor umbral, y dicha comparación determina si se rechaza dicho ensayo; y si dicha comparación indica que no se rechaza dicho ensayo,
 - ii) compara dichas señales objetivo con un segundo umbral; y
- 10 transferir dichas una o más secuencias de ácidos nucleicos amplificadas previamente a un dispositivo con formato de detección múltiple o alta como se describe en la reivindicación 1, y llevar a cabo dicho ensayo de detección múltiple en dicho dispositivo.
 - Un procedimiento de diagnóstico para recoger datos de una muestra de ensayo que contiene una o más secuencias
- 15 de ácidos nucleicos en un instrumento automático, que comprende:
 - a) liberar las secuencias de ácidos nucleicos de una muestra de ensayo;
 - b) amplificar dichas secuencias de ácidos nucleicos para producir amplicones;
- 20 c) proporcionar dichos amplicones a un primer formato de detección limitada o baja como se ha descrito en la reivindicación 1, que comprende secuencias de ácidos nucleicos complementarias de uno o más de dichos amplicones para una reacción de hibridación;
- 25 d) detectar la presencia de dichos amplicones hibridados por dicho primer formato de detección limitada o baja; y
- e) determinar por el algoritmo de control un resultado positivo o negativo en la etapa c, en el que dichos amplicones de la etapa b se analizan más en un segundo formato de detección múltiple o alta como se describe en la reivindicación 1, para recoger datos si se ha obtenido un resultado positivo.

30 Breve descripción de los dibujos

A continuación se describirán realizaciones preferidas y alternativas representativas de la invención junto con las figuras adjuntas, en las que los mismos números de referencia se refieren a los mismos elementos en las diferentes vistas y en los que:

la fig. 1 es una ilustración de un procedimiento de la técnica anterior para llevar a cabo una pluralidad de ensayos en una muestra humana, en forma de diagrama de flujo, que se inicia por la hipótesis provisional del agente infeccioso en la muestra;

la fig. 2 es una ilustración de un procedimiento de acuerdo con la presente invención, mediante el cual sólo se lleva a cabo un formato de detección alta si un algoritmo de control que procesa la señal de un formato de detección baja indica que está justificado un formato de detección alta;

la fig. 3 ilustra una variación del procedimiento de la figura 2;

la fig. 4 ilustra una segunda realización del procedimiento de la figura 2, en el que el algoritmo de control proporciona tanto una decisión de si hay que proseguir con el segundo nivel de ensayo como una valoración cuantitativa del nivel de ácidos nucleicos en la muestra;

la fig. 5 ilustra una tercera realización del procedimiento, en el que se realizan tres formatos de detección baja en paralelo, y las señales que representan los resultados se suministran a un módulo de control para implementar un algoritmo de control. Se suministran parámetros de tres ensayos diferentes que dan como resultado una entrada para la selección de un solo formato de detección alta;

la fig. 6 es un diagrama de bloques de un instrumento analítico preferido para usar para llevar a cabo los procedimientos de las figuras 2-5; y

la fig. 7 es un diagrama de bloques de un diseño alternativo de un instrumento analítico para llevar a cabo el procedimiento de las figuras 2-5.

Descripción detallada de la invención

Los formatos de detección limitada o baja incluyen los procedimientos de hibridación y detección mencionados antes. Estos se pueden llevar a cabo en solución o usando sondas de captura unidas a una matriz. Las matrices en la que se han inmovilizado sondas incluyen polímeros basados en poliestireno, nitrocelulosa, láminas de diferentes composiciones, perlas, pocillos de microvaloración, tubos, partículas de vidrio, partículas magnéticas, fibras naturales y sintéticas. Tal como se usa en el presente documento, un formato de detección baja incluye menos de 50 y preferible-

ES 2 286 983 T3

mente al menos de 1 a 10 sondas de oligonucleótidos que tienen secuencias distintas. Cada sonda contiene en parte una secuencia total o parcialmente complementaria de los amplicones de la muestra de ensayo y opcionalmente del control interno. Un formato de detección alta, tal como se usa en el presente documento, incluye más de 100 y preferiblemente más de 400 y lo más preferiblemente más de 1000 sondas de oligonucleótidos, cada una con una secuencia distinta, unidas o inmovilizadas sobre una matriz adecuada. Las sondas se pueden aplicar a la matriz con una densidad espacial alta, por ejemplo 400 sondas/cm² a 1000 sondas/cm². Cada sonda contiene en parte una secuencia total o parcialmente complementaria de una potencial secuencia de amplicón objetivo.

En una realización preferida el formato de detección baja es diferente del formato de detección alta. Por ejemplo, el formato de detección baja incluiría un dispositivo para llevar a cabo una reacción de hibridación en solución homogénea, mientras que el formato de detección alta incluiría un dispositivo para llevar a cabo una reacción de hibridación en matriz. Alternativamente, se podría usar una reacción de hibridación en matriz para el formato de detección baja para cribar un número pequeño de amplicones objetivo y amplicones de control interno.

Ahora en relación con la figura 2, se muestra en el diagrama de flujo una realización preferida que proporciona un procedimiento y un dispositivo para dirigir automáticamente la continuación del análisis y controlar la selección de un formato de detección alta. El procedimiento implica la etapa de detectar amplicones producidos por una reacción de amplificación de los ácidos nucleicos objetivo en una muestra de ensayo usando un formato de detección baja (se muestra de forma general en la etapa 30) y usando un algoritmo de control 40 para determinar el uso de uno o más formatos de detección alta. La realización preferida puede incorporar una sola etapa de amplificación para el análisis completo de ácidos nucleicos en la muestra de ensayo. Por consiguiente, la muestra se somete a un número inicial de primeras reacciones de hibridación con el propósito de llevar a cabo un análisis de cribado que tiene una especificidad amplia y se determina la elección de la tecnología rentable para usar para el análisis mediante el uso del algoritmo de control automático 40 con la introducción de datos adecuados. Los datos de salida de un formato de detección baja son los datos de entrada de un formato de detección alta seleccionado (etapa 50).

El procedimiento de la figura 2 permite usar tecnología de bajo coste, es decir un formato de detección baja en la etapa 30, para cribar una muestra. El uso de dicho procedimiento permite que se usen los amplicones objetivo a lo largo de todo el análisis de la muestra. Si el algoritmo de control 40 determina que está justificada la necesidad de un formato de detección alta 50, se inicia un segundo análisis 50. El usuario del sistema también puede proporcionar los datos de entrada de un ensayo o análisis previo antes o en el momento de introducción de la muestra de ensayo en el dispositivo de la presente invención.

En la primera etapa 30 de la metodología anterior (es decir, medición de los amplicones objetivo en un formato de detección baja) los ácidos nucleicos se tratan o se liberan y preferiblemente se amplifican en un ensayo elegido para dar una sensibilidad de "cribado" tan cercana al 100% como sea posible. Es decir, cuando una muestra es realmente positiva en cualquier parámetro en un formato de cribado elegido, la primera reacción de ensayo dará un resultado positivo.

En una realización representativa, la primera etapa 30 comprende dos subetapas separadas. La primera subetapa 32 comprende la etapa de amplificar una secuencia de control interno y todos los ácidos nucleicos que se suponen objetivos en un panel de ensayo representativo, es decir, respiratorio, sangre, etc. para generar amplicones de control interno y amplicones objetivo (es decir, T1, T2, ...Tn). El amplicón de control interno se mide como un medio para garantizar que no se ha producido un resultado negativo por fallo técnico. Tal como se usa en el presente documento, las secuencias de control interno son secuencias de oligonucleótidos que están diseñadas para no ser afectadas por las secuencias de ácidos nucleicos objetivos, no son sustancialmente similares a ninguna secuencia de ácido nucleico en la muestra, y son determinantes de un procedimiento de amplificación positivo. En general, se coamplifica un control interno con el objetivo de proporcionar un control de amplificación positivo. La señal de control interno también se puede usar en el análisis cuantitativo de datos de la muestra de ensayo.

La segunda subetapa 34 comprende la etapa de medir las señales del control interno y los objetivos. El equipamiento usado para medir las señales está integrado en el sistema.

En la segunda etapa del procedimiento 40, es decir, implementación del algoritmo de control, las señales se aplican al algoritmo de control como se ilustra en el cuadro de línea de puntos 40. La señal de control interno se usa para indicar si el procedimiento de amplificación es satisfactorio. El algoritmo de control 40 implementa las dos señales para controlar si el análisis de la muestra continúa a la siguiente etapa 50, o no.

En una realización, mostrada en la figura 2, si la señal de control interno está por debajo de un umbral predeterminado (42), el ensayo se rechaza porque no se produjo la reacción de amplificación o por otras razones no logró alcanzar el nivel umbral adecuado. Si la señal de control interno está por debajo del umbral, el algoritmo determina (44) si el parámetro de cribado para uno o más objetivos es mayor que un umbral. Si no lo es, el resultado del ensayo se considera negativo y se rechaza la hipótesis. Entonces no se incurre en el coste o la necesidad de la segunda etapa 50 del análisis. A la inversa, si el parámetro de cribado está por encima del umbral (44), se permite proseguir a la segunda etapa 50 en el ensayo.

En una realización preferida, la metodología de la figura 2 se lleva a cabo de una forma en la que la salida o resultado de la primera etapa 30 se usa como entrada para decidir si llevar a cabo una segunda etapa 50 en un formato

de detección alta seleccionado. En contraste, los ensayos adicionales o posteriores descritos en la técnica anterior requieren el acceso separado o repetido a la muestra y en muchos casos es necesario tomar muestras adicionales. Los ensayos de la técnica anterior requieren el almacenamiento de la muestra, más el manejo y la repetición de las etapas de procesamiento que se evitan con la presente invención. Además, en la técnica anterior, es necesaria la intervención humana para examinar los resultados del primer ensayo y decidir las posteriores acciones. Preferiblemente se accede a la muestra de ensayo solo una vez al principio del procedimiento de la figura 2.

En una realización preferida de la presente invención, todas las etapas 30, 40 y 50 están integradas en un instrumento analítico automático para llegar al resultado final sin intervención humana durante el procedimiento, incluyendo la ejecución del formato de detección baja (30). El instrumento, de acuerdo con una realización preferida de la invención, lleva a cabo todas las ampliaciones de todos los objetivos que se pueden analizar en el formato de detección alta 50, en la primera etapa 30. Después, el instrumento puede dirigir la muestra que tiene suficientes cantidades de amplicones a una detección alta para una identificación analítica más exhaustiva.

Una realización preferida del formato de detección alta es la tecnología de Affymetrix GENE CHIP, descrita en la patente de EE.UU. 5.837.832 (Chee). Se aíslan los amplicones marcados obtenidos de los ácidos nucleicos de una muestra del paciente, por técnicas bioquímicas estándar, y después se lavan sobre la superficie de un cartucho de alta densidad (GENE CHIP). Las copias de las secuencias de ADN de cadenas individuales o sondas en el cartucho de alta densidad hibridan con los amplicones marcados de forma complementaria. Un escáner de tipo láser detecta señales fluorescentes de posiciones conocidas en las que han hibridado secuencias marcadas.

Ahora se describirá con más detalle una realización preferida representativa de la etapa 30 en la figura 2. En la primera parte del ensayo, se deben procesar los supuestos ácidos nucleicos objetivos. Durante el desarrollo del protocolo de ensayo, deben identificarse las condiciones implicadas en la reacción de amplificación tales como secuencia de la sonda, cebadores, secuencias conservadas, etc. en vista de los parámetros que se van a ensayar en el panel. Además, se debe elegir al menos un locus que tenga las propiedades para que forme parte del algoritmo de control, por ejemplo, y en relación con la figura 3, se describe un ensayo de micobacterias de una muestra de esputo, en las patentes de EE.UU. 5.589.585 (Mabilat); 5.702.317 (Mabilat), y 5.849.901 (Mabilat). Una región conservada o consenso de la secuencia de ARNr 23S se elige como el parámetro de cribado para el formato de detección baja. Se lleva a cabo la amplificación de una región altamente conservada del ARNr 23S que se puede usar para detectar micobacterias en un formato de detección baja. La amplificación también se lleva a cabo en el ADN del gen *rpoB* que está relacionado con la resistencia a la rifampina en *Mycobacterium tuberculosis*, como se indica en la etapa 32A, para usar en un formato de detección alta si el resultado del ensayo de cribado alcanza el umbral adecuado. Puesto que hay muchas más copias de ARNr que de ADN por organismo, la región de ARNr 23S es una indicación más fiable de la presencia de *Mycobacterium*. Como requisito final, los cebadores usados para el ARNr 23S se usan junto con una secuencia de control interno para generar amplicones de control interno de modo que se puedan llevar a cabo la ejecución de la amplificación y el análisis cuantitativo.

En una realización, los amplicones de la primera etapa 30 del ensayo se transferirán a la segunda etapa 50, y la elección del cribado y la tecnología de detección deben ser compatibles con los requisitos del formato de detección alta. Esto se realiza preferiblemente usando una tecnología de detección homogénea para la etapa 32, como se describe en la patente de EE.UU. 5.512.493 (Mathis), o "DNA probes" second ed., G.H. Keller and M.M. Manak, Stockton Press, 1993, section 6. Alternativamente, describen la hibridación basada en transferencia de energía o tecnología de balizas/detector Gionata Leone, y col., "Molecular beacon probes combined with amplification by NASBA enable homogeneous, real-time detection of RNA", *Nucleic Acids Research*, Vol. 26, pp 2150-2155 (1988). Las balizas/detectores permiten la detección homogénea de una secuencia objetivo y están compuestos de una estructura de tallo-bucle en la que la parte de bucle contiene la secuencia complementaria a los amplicones. En presencia del objetivo, el tallo de la estructura de la baliza/detector está "abierto" y el bucle hibrida con el objetivo. La baliza/detector "abierto" produce fluorescencia que normalmente se atenúa en el estado "cerrado". De acuerdo con una realización de la presente invención, se inmoviliza una parte de las balizas/detectores sobre un soporte sólido usando técnicas bien conocidas en la técnica. El soporte sólido puede ser un dispositivo desechable, incluyendo preferiblemente micropartículas o partículas magnéticas. Las balizas/detectores deben construirse de forma que las condiciones de reacción abran la secuencia de la estructura de tallo. Los amplicones se ponen en contacto con las balizas/detectores para permitir así que la estructura de tallo de las balizas/detectores se abra y se produzca la hibridación con la estructura de bucle. Véase la etapa 32B en la figura 3. Si hay amplicones objetivo presentes, la estructura abierta aleja al atenuador de la molécula detectora permitiendo detectar el marcador. La señal resultante se almacena para ser usada por el algoritmo de control 40.

El algoritmo de control para la etapa 40, cuando se usa junto con el(los) umbral(es) elegido(s), puede realizar tres tipos diferentes de procedimientos: (1) detección cualitativa de la presencia del objetivo esperado; (2) detección cuantitativa de uno o más objetivos, para usar junto con los resultados del formato de detección alta, y (3) detección cuantitativa de uno de los varios objetivos, y preselección de una matriz de ensayos específica para el ensayo del formato de detección alta 50.

El primer tipo de procedimiento en la realización preferida, una detección cualitativa de la presencia de una región conservada del objetivo, se ha descrito antes para ensayar los organismos micobacterias en muestras de esputo (véase la figura 3). Por ejemplo, en la figura 3 si la señal de la primera reacción de hibridación o la hibridación de los amplicones del control interno con el primer grupo de detectores o balizas/detectores está por debajo del nivel umbral

(etapa 42) se rechaza el ensayo. Si la señal está por encima del nivel umbral, entonces se analiza en la etapa 44 la señal de la hibridación de la secuencia de ARNr 23S conservada con el segundo grupo de marcadores o balizas/detectores. Si la señal está por debajo del nivel umbral, el algoritmo de control indica que el resultado es negativo, como se indica en 46. A la inversa, si la señal está por encima del nivel umbral, entonces los amplicones, incluidas otras regiones de ARNr 23S amplificadas y rpoB se transfieren a un formato de detección alta, como se indica en 50.

El segundo tipo de procedimiento de control también es posible con el algoritmo de control: la detección cuantitativa de uno o más objetivos, para usar junto con los resultados del análisis de detección múltiple. En algunos casos, la cantidad de ácido nucleico objetivo tiene importancia analítica o de diagnóstico. Como ejemplo, considérese un paciente de VIH que es tratado por SIDA. La medición del ácido nucleico vírico total o carga vírica es un indicador de diagnóstico/terapéutico importante. Por ejemplo, si el nivel de carga vírica es mayor que un umbral, el personal clínico puede aprovechar el análisis de genotipo adicional de los amplicones del VIH. Dicho análisis requeriría un formato de detección alta caro, pero puede no ser necesario si el nivel de ácido nucleico vírico total es bajo, con la terapia adecuada. La principal diferencia entre esta aplicación y el ejemplo cualitativo sencillo de la figura 3 es que la señal cuantitativa no solo se usa en el algoritmo de control, si no que también es un resultado cuando es acompañado y analizado por los datos de niveles conocidos de virus, por ejemplo, en una calibración de múltiples puntos o cuando el nivel de control interno se conoce antes de la amplificación.

Un ejemplo de este segundo tipo de algoritmo de control se muestra en la figura 4. En este ejemplo, se obtiene una muestra de un paciente con VIH. La etapa 30 (el formato de detección baja) comprende la etapas de amplificar la secuencia de control interno, una secuencia del VIH conservada y una secuencia del VIH polimórfica como se indica en la etapa 32A. El procedimiento continúa con la hibridación de los amplicones de control interno con una baliza/detector y los amplicones de secuencias conservada como se indican en la etapa 32B. Alternativamente, los amplicones primero se capturan en el soporte sólido para formar un complejo y después los detectores se hibridan con el complejo para detectar los amplicones. Después, se miden las señales de la hibridación del complejo de balizas/detectores como se indica en la etapa 34. Las señales resultantes generadas se digitalizan y se envían a un módulo de control o unidad de procesamiento que implementa el algoritmo de control 40.

En el algoritmo de control 40, la etapa 42 es la misma que para la figura 3. Si la señal de la balizas/detectores nº 1 es menor que el segundo umbral (etapa 44), el algoritmo 40 proporciona un informe del ácido nucleico cuyo nivel está por debajo del umbral para llevar a cabo el formato de detección alta como se indica en 46. En el caso de que la señal de la balizas/detectores nº 2 sea mayor que el segundo umbral, los amplicones se transfieren a la segunda estación de reacción (etapa 50).

Alternativamente, en una detección cuantitativa, la amplificación del control interno (no se muestra) que tiene cantidades conocidas de ácido nucleico, antes de la amplificación para obtener por separado datos de calibración se somete al algoritmo de control. El resultado de las señales detectadas en la etapa 44 se puede calcular frente a los datos obtenidos de los amplicones de control interno y presentados como se indica en la etapa 56.

El tercer tipo de procedimiento que se puede implementar es una detección cuantitativa de uno de varios objetivos, y una preselección de un panel de ensayos específico para la segunda reacción de hibridación. Como caso más general de una realización de la figura 2, se pueden usar múltiples balizas/detectores para detectar uno o más objetivos posibles para proporcionar múltiples señales de entrada para que use el algoritmo de control. Por ejemplo, se puede ensayar un panel respiratorio para Mycobacterium, Legionella, Mycoplasma, Influenza o RSV. Mycobacterium es un objetivo complejo debido a la necesidad de detectar la resistencia a fármacos en la tuberculosis, que puede requerir un análisis de detección múltiple dedicado sólo a este objetivo. De la misma forma, Influenza y RSV son virus y cada uno puede requerir un dispositivo diferente de detección múltiple. Por lo tanto, pueden ser adecuados tres formatos diferentes de detección alta para un análisis adicional o segundo de la muestra de ensayo. Eligiendo diferentes secuencias conservadas para cada uno de los tres formatos de detección baja, se pueden diseñar balizas/detectores que permitirán que el algoritmo de control elija cuál de los tres formatos de detección alta hay que seleccionar. Se muestra un ejemplo de este tercer procedimiento en la figura 5.

Ahora en relación con la figura 5, las características básicas comunes a las figuras 2 y 4 también son comunes a la figura 5, en concreto el funcionamiento del formato de detección baja en la etapa 30, que usa las salidas de señales del cribado en un algoritmo de control 40, y que controla o inicia el ensayo de formato de detección alta más exhaustivo en la etapa 50, dependiendo de los resultados del algoritmo de control.

En la realización de la figura 5, se llevan a cabo tres formatos de detección baja en paralelo, indicados en 72, 74 y 76. En este ejemplo, se obtiene una muestra respiratoria en la etapa 70 para una hipótesis de diagnóstico dada. La muestra de ensayo se presenta al instrumento y después se trata para liberar el ácido nucleico. En el primer formato 72, también se amplifica el control interno, junto con todos los ARN de Mycobacterium en la etapa 78. El procedimiento continúa en la etapa 80 con la hibridación del amplicón de control interno a un primer grupo de balizas/detectores y el amplicón del ARN de Mycobacterium a un segundo grupo de balizas/detectores. Finalmente, en la etapa 82 se miden las señales del primer y segundo grupo de balizas/detectores usando equipamiento de fluorescencia conocido u otro tipo de equipamiento de detección. Las señales se convierten a la forma digital y se suministran a un módulo de control, ordenador separado u otra estación de procesamiento que implemente el algoritmo de control 40.

ES 2 286 983 T3

Para el segundo formato 74, en la etapa 84 se amplifican los objetivos RSV e Influenza en la muestra. Los amplicones de RSV e Influenza se hibridan con balizas/detectores designados con los números 3 y 4, respectivamente, en la etapa 86. Después, las señales del tercer y cuarto grupo de balizas/detectores se miden usando equipamiento de fluorescencia conocido u otro tipo de equipamiento de detección en la etapa 88. Las señales se convierten a la forma digital y se suministran al módulo de control que implementa el algoritmo de control 40.

Para el tercer formato 76, en la etapa 90 se amplifican los objetivos *Mycoplasma* y *Legionella* en la muestra. La patente de EE.UU. 5.614.388 describe procedimientos para analizar la *Legionella*. Los amplicones se hibridan con las balizas/detectores designados con los números 5 y 6, respectivamente, en la etapa 92. Después, las señales del quinto y sexto grupo de balizas/detectores se miden usando equipamiento de fluorescencia conocido u otro tipo de equipamiento de detección. Las señales se convierten a la forma digital y se suministran al módulo de control que implementa el algoritmo de control 40. Los amplicones de control interno se pueden usar para evaluar la reacción de amplificación, y si se desea, para el análisis cuantitativo.

El algoritmo de control en la figura 5 primero realiza una comparación (indicada en la etapa 100) de la señal del amplicón de control interno del primer formato 72 para determinar si la señal es mayor que un valor umbral predeterminado. Si no lo es, se rechaza el ensayo entero como se indica en 102. Si la señal de control interno es mayor que el umbral, el algoritmo de control prosigue para comparar la segunda señal de balizas/detectores (del formato 72) para determinar si es mayor que un segundo umbral. Si es mayor que el segundo umbral, se indica un resultado positivo. Se fija un valor umbral para un posterior ensayo de detección múltiple, como se indica en 112. Por ejemplo, en la etapa 112 el resultado positivo para la micobacteria en la muestra respiratoria indica que debe iniciarse un ensayo de formato de detección alta de tipo "A" para analizar más la micobacteria.

Si la comparación en la etapa 104 da como resultado un valor negativo, el algoritmo de control todavía prosigue para determinar si garantiza un resultado negativo para el ensayo en su conjunto. Específicamente, aunque el resultado de las micobacterias sea negativo, el algoritmo de control en la etapa 106 determina si la medición de la tercera señal de baliza/detector es mayor que el tercer umbral (para el virus RSV), o si la medición de la cuarta señal de baliza/detector es mayor que el cuarto umbral (para el virus Influenza). Si una de estas señales de balizas/detectores es mayor que el valor umbral, el algoritmo 40 fija el parámetro de ensayo, x, a un segundo valor o valor diferente o característico, por ejemplo, "B", que indica que debería iniciarse un ensayo de formato de detección alta en el tipo "B" para el análisis adicional de RSV o Influenza.

Si la comparación en la etapa 106 es negativa, el algoritmo prosigue para realizar un análisis similar para el tercer formato 76. De forma específica, el algoritmo de control 40 en la etapa 108 determina si la medición del quinto grupo de señales de balizas/detectores es mayor que el quinto valor umbral (para *Mycoplasma*), o si la medición del sexto grupo de señales de balizas/detectores es mayor que un sexto valor umbral (para *Legionella*). Si cualquiera de estas señales de balizas/detectores es mayor que el valor umbral, el algoritmo 40 fija el parámetro de ensayo, x, a un tercer valor o valor diferente, por ejemplo "C" que indica que debería iniciarse un ensayo de tipo "C" para el posterior análisis de *Mycoplasma* o *Legionella*.

Si la comparación en la etapa 108 es negativa, entonces todos los detectores/balizas en los tres formatos 72, 74, 76 (distintos de la baliza de control) son negativos. Por lo tanto, el algoritmo de control indica que se ha obtenido un resultado negativo para el primer panel de ensayos de cribado 30 y el instrumento no prosigue al formato de detección alta.

Suponiendo que al menos una de las comparaciones en las etapas 104, 107 y 108 da como resultado una respuesta positiva, el o los amplicones adecuados de los formatos que tienen los resultados positivos se transfieren al formato de detección alta adecuado, preferiblemente automáticamente. En una realización preferida, las etapas de transferencia de la primera estación de reacción (30) a la segunda estación de reacción (50) se producen sin exposición de los amplicones al entorno.

Los expertos en la materia observarán que aunque se llevan a cabo tres ensayos de formato bajo en paralelo en la figura 5, el procedimiento se puede aplicar a cualquier número arbitrario o combinación de paneles en la primera etapa 30, y el algoritmo de control 40 se puede modificar para dar cuenta de los diferentes formatos o combinaciones de formatos con los ajustes por omisión adecuados.

Los expertos en la materia también observarán que el algoritmo de control 40 de la figura 5 (así como para otras figuras) se puede implementar en hardware que usa, por ejemplo, puertas lógicas. Sin embargo, puesto que se esperaría que las estaciones de reacciones de los instrumentos que llevan a cabo el análisis de cribado 30 o el análisis de detección múltiple 50 estuvieran conectados a una unidad de procesamiento central programable, se prefiere tener el módulo de control implementado en la unidad de procesamiento más que construir un módulo de control de hardware distinto. Sin embargo, dadas las etapas de funcionamiento del algoritmo de control en las figuras 2-5, un módulo de control implementado enteramente en hardware sería otra realización.

En relación con la figura 6, un instrumento 120 para llevar a cabo los procedimientos de las figuras 2-5 mostrados en la forma de diagrama de bloques, proporciona una combinación de módulos, con el procedimiento de funcionamiento y comunicación como se ha descrito en el presente documento.

ES 2 286 983 T3

En relación con la figura 6, se transfiere una muestra entre la estación de preparación de muestra 122, a las primeras estaciones de reacción 128 y la segunda reacción 134 (cuando sea necesario) del instrumento por un medio de transferencia de fluidos, por ejemplo un conducto 124, 126, 132. Alternativamente, los amplicones se pueden transferir de la primera estación de reacción 128 a la segunda estación de reacción 134 por un conducto de fluidos 142 controlado por el módulo de control 138. La transferencia se hace automáticamente sin intervención humana y sin contacto entre líquidos y el entorno externo, lo cual minimiza el riesgo de contaminación de la muestra y liberación de los amplicones transportados por el aire desde la reacción de amplificación.

La transferencia de muestra desde la estación de procesamiento de la muestra 122 a las primeras estaciones de reacción 128 y segunda reacción 134 a la estación de detección 136, se puede realizar sin mover realmente la muestra en los conductos de fluidos 124, 126, 132. La transferencia también se puede realizar desde la primera estación de reacción 128 a la segunda estación de reacción 134 donde se lleva a cabo un formato de detección alta. Esto se puede hacer mediante módulos de muestras en cámaras como los descritos en la patente de EE.UU. 5.786.182 (Catanzariti). Dichas cámaras también pueden ser el sitio de las etapas de preparación de la muestra. Otro ejemplo de un medio para realizar dicha transferencia se describe en el documento FR9811383 presentado el 8 de septiembre de 1998.

Como se ha indicado antes, la estación 128 en la figura 6 lleva a cabo un primer grupo de reacciones de hibridación. La primera estación de reacción 128 incorpora un medio o dispositivo que tiene medios para analizar al menos de 1 a 10 secuencias de ácidos nucleicos distintas que se sospecha que están presentes en la muestra de ensayo. Los amplicones de control interno también se pueden detectar, y por lo tanto, también deben proporcionarse sondas complementarias de los amplicones de control interno.

El instrumento 120 incluye al menos un sistema de detección 136 adecuado y un módulo de control 138 que se usan para determinar una señal de hibridación positiva del objetivo o los amplicones en esta primera reacción de hibridación. Más en particular, el sistema de detección 136 proporciona señales al módulo de control 138, que después se digitalizan para ser usadas por una unidad de procesamiento central en el módulo de control 138 para ejecutar el algoritmo de control 40 de las figuras 2-5.

La segunda estación de reacción 134, en una realización preferida, comprende una estación para llevar a cabo un segundo grupo de reacciones de hibridación en un dispositivo con formato de detección alta recuperado del inventario 129. El formato de detección alta comprende un medio o dispositivo que tiene medios para analizar más de 100 secuencias de ácidos nucleicos distintas y típicamente 400 secuencias de ácidos nucleicos distintas y preferiblemente más de 1000 secuencias de ácidos nucleicos distintas. El formato de detección alta es un ejemplo del ensayo de detección múltiple descrito antes.

El módulo de control 138 proporciona integración y control del funcionamiento entero del instrumento 120. El módulo de control 138 determina la necesidad de completar o implementar el segundo grupo de reacciones de hibridación en uno o más formatos de detección alta seleccionados basándose en si la estación de detección 136 detectaba una hibridación positiva del objetivo o los amplicones en el primer formato de detección baja, como se describe en las figuras 2-5. Finalmente, la estación de detección 136 y el módulo de control 138 detectan señales positivas de hibridación de una pluralidad de objetivos o amplicones en el formato de detección alta en la estación 134, en la que el formato de detección alta proporciona más datos analíticos para la secuencia de ácido nucleico objetivo en la muestra de ensayo.

El instrumento 120 incluye una estación de procesamiento de la muestra 122. El investigador pone una muestra biológica o analítica, por ejemplo, de un paciente humano u otra fuente, en la estación 122, en el que la muestra es procesada de acuerdo con técnicas conocidas en la técnica o descritas en el presente documento. La estación 122 preferiblemente incluye un componente de la estación de amplificación integral para amplificar los ácidos nucleicos en el caso de que la fuente de la muestra u otras circunstancias dicten que es aconsejable la amplificación. La estación de amplificación también puede ser una estación separada. Adicionalmente, en una realización alternativa, la amplificación de la muestra se podría iniciar si la estación de detección 136 indica que el resultado de una muestra no amplificada es negativo. Las etapas de procesamiento de la muestra específica vendrán determinadas en parte por el análisis de la muestra que se lleve a cabo.

El instrumento 120 incluye un medio de transferencia de fluidos, por ejemplo, un conducto de fluidos 124 conectado a la estación de procesamiento de la muestra 122 que suministra un fluido que contiene el objetivo o los amplicones a una válvula de tres vías 130. La válvula 130 puede ser controlada por el módulo de control 138 para suministrar el fluido a un segundo conducto 126 que conduce a una primera estación o módulo de reacción 138, en el que se lleva a cabo el formato de detección baja (etapa 30 en las figuras 2-5). En el caso de que se elija un conducto de fluidos 124 como medio para suministrar la muestra a la primera estación de reacción 128, deberían usarse procedimientos de descontaminación/limpieza convencionales para prevenir la contaminación de la muestra por el conducto 124. Los ejemplos incluyen ácido, lejía, ozono, u otras técnicas químicas, técnicas térmicas o eléctricas.

La primera estación de reacción 128 lleva a cabo la reacción de hibridación con los objetivos o amplicones, y las señales de las sondas detectoras se hacen mediante una estación de detección 136. La estación de detección 136 mide las señales (por ejemplo, fluorescencia o luminiscencia) de las sondas detectoras complementarias a los amplicones objetivos, digitaliza las señales, y las suministra junto con un bus de datos digital 146 al módulo de control 138. El algoritmo de control 40 descrito en el presente documento se ejecuta en el hardware o en el software en el módulo de control 138.

En una realización preferida, el ensayo de cribado usado en la primera estación de reacción 128 se lleva a cabo en un dispositivo desechable, y lo puede seleccionar el instrumento 120 basándose en las entradas de datos que hace el usuario en la interfaz de usuario 140. Por ejemplo, si el usuario está procesando una muestra de sangre de un paciente o muestra de la garganta, para cada tipo de muestra el instrumento 120 usará un tipo diferente de formato de detección baja en la estación 128. El usuario introducirá el tipo de muestra del paciente en la interfaz de usuario 140 y el módulo de control selecciona un panel para el formato de selección baja de un inventario 129 de paneles o da instrucciones de otra forma al usuario para cargar dichos dispositivos desechables en el sistema de instrumentos. Idealmente, para reducir el coste de los ensayos usando ensayos de formatos de detección baja en la primera estación de reacción 128, el dispositivo comprenderá paneles que tienen un número limitado de pocillos o cámaras para detectar un espectro pequeño de agentes (por ejemplo, diez o menos pocillos, quizás más, dependiendo de la fuente de la muestra). Además, todos los tipos diferentes de formatos almacenados en el inventario 129 deben estar marcados con códigos de barras o símbolos similares de forma que la identificación del panel se pueda confirmar mediante rutinas de procesamiento de seguridad en el instrumento 120 y se pueda recuperar el formato correcto del inventario 129.

La primera estación de reacción 128 está situada cerca de una estación de detección 136. La estación de detección 136 contiene, por ejemplo, un tubo fotomultiplicador, detector de fluorescencia u otro tipo de sistema de detección dependiendo del tipo de señal que se va a detectar en la primera estación de reacción 128. Los dispositivos que contienen el ensayo en la primera estación de reacción 128 también se podrían mover mediante mecanismos de traslación adecuados a la estación de detección 136. Un marcador de detección preferido es quimioluminiscente o de fluorescencia.

Dependiendo de los resultados del algoritmo de control implementado en el módulo de control 138, el ensayo se rechaza, se considera que es negativo, o se procesa en el ensayo de detección múltiple. Un ejemplo de como puede proseguir esto es tener el módulo de control 138 que emite una señal análoga junto con el conductor 144 a una válvula 142 colocada en un conducto que une la primera estación de reacción 128 con una segunda estación de detección 134 en el que se lleva a cabo el formato de detección alta. Cuando la válvula 142 se abre, se transfiere un fluido que contiene los amplicones para el objetivo que se está ensayando a la segunda estación de reacción 134.

En una realización representativa, la reacción de hibridación en la segunda estación de reacción 134 se proporciona en un dispositivo de detección alta desechable, tal como un producto de matriz de alta densidad similar al descrito antes. El formato de detección alta para usar en el segundo análisis de detección múltiple se recupera también del inventario de dispositivos 129. Se pueden incorporar además múltiples medios de detección en o adyacentes a una segunda estación de reacción 134 para detectar hibridaciones en el formato de detección alta.

Cuando la estación de detección 136 ha acabado con la detección de las señales de hibridación de la segunda estación de reacción, los resultados se procesan en el módulo de control 138 y se presentan en la interfaz de usuario 140. Alternativamente, el instrumento 120 podría preparar e imprimir un informe adecuado, almacenar los datos de forma electrónica para su posterior recuperación, o enviar los datos o resultados a instrumentos adicionales u ordenadores.

En relación con la figura 7, se muestra en forma de diagrama de bloques otro diseño de un instrumento analítico 200 para llevar a cabo el procedimiento de las figuras 2-5. El instrumento 200 tiene la misma organización básica y funcionamiento que el instrumento de la figura 6. El instrumento tiene una estación de preparación de la muestra 202 y estación de amplificación 203 para procesar y después amplificar las secuencias de ácidos nucleicos en las muestras de ensayo como se ha explicado en el presente documento. La estación proporciona amplicones para una primera estación de reacción 204 en el que se procesa un dispositivo para realizar la hibridación del objetivo y los amplicones de control interno en la muestra con las balizas/detectores. El panel o dispositivos procesados en la estación 204 se colocan cerca de un detector 209, que hace las mediciones del producto de hibridación y proporciona las señales al módulo de control 210. El módulo de control 210 implementa el algoritmo 40 de las figuras 2-5. Se coloca un módulo detector 208 cerca de la segunda estación de reacción 206. El formato de detección alta u otro dispositivo se usa en la segunda estación de reacción 206 y lo lee el módulo detector 208 y las señales se suministran al módulo de control 210 de la forma explicada en el presente documento. El módulo de control 210 sólo dirige la transferencia de amplicones la primera estación de reacción 204 a la segunda estación de reacción 206 si los resultados del algoritmo de control indican que está justificado el ensayo del formato de detección alta. Los resultados finales se presentan en una interfaz de usuario 212, se imprimen en un informe o se transfieren de forma electrónica cuando se necesiten.

Como se ha indicado previamente, el algoritmo de control proporciona un medio para determinar si hay que dirigir la transferencia de amplicones a un ensayo de formato de detección alta seleccionado de la primera estación de reacción 204. La segunda estación de reacción debe estar físicamente separada de la primera estación de reacción, de modo que su uso es completamente opcional. En la primera parte del ensayo (es decir, etapa 30 en las figuras 2-5), la etapa de procesamiento de la amplificación 30 puede generar grandes cantidades de amplicones que deben estar encerrados o se convierten en contaminantes potenciales para futuros ensayos. Normalmente se intentaría mantener esta parte de la estación de procesamiento del ensayo cerrado o confinado de alguna forma, debido al requisito de limitar la potencial contaminación durante la transferencia de estos amplicones físicamente a los módulos de ensayo.

En otro aspecto, el sistema preferiblemente incluye un conducto de fluidos para transferir el objetivo, preferiblemente amplicones, desde un suministrador u otra fuente a la primera estación de reacción, y si se dirigen los amplicones a la segunda estación de reacción según determine dicho módulo de control, sin intervención humana.

Alternativamente, un dispositivo de transferencia puede recibir amplicones y ser transferidos a la primera estación de reacción y si es necesario a una segunda estación de reacción para transferir los amplicones a uno o más segundas estaciones de reacción 206.

5 Ejemplos

Los siguientes ejemplos sirven para describir diferentes realizaciones de la presente invención. No debe considerarse que los ejemplos limitan la invención a estas realizaciones, sino que están definidas solamente por las reivindicaciones que concluyen esta memoria descriptiva y sus equivalentes.

10 Ejemplo 1

Se lleva a cabo la amplificación de una región conservada de micobacterias de una muestra de ensayo en una primera estación de reacción. Las secuencias de ácidos nucleicos se describen en las patentes de EE.UU. 5.547.842 (Hogan); 5.643.723 (Persing); 5.589.585 (Mabilat); 5.702.317 (Mabilat) y 5.849.901 (Mabilat).

Para los aislados, se rasparon una o dos colonias de bacterias que acaban de crecer (3-5 mm de diámetro, aprox. 10⁸ bacterias) en el extremo de una espátula y se volvieron a suspender en 250 µl de agua estéril en un tubo Eppendorf de 1,5 ml. Los ácidos nucleicos totales se liberaron del material de cultivo mediante mezcla vortical de la suspensión bacteriana en presencia de perlas de vidrio. Se añadió una parte alícuota de 5 µl del lisato directamente a la reacción PCR. Alternativamente, se añadieron 20 ng de ADN plasmídico a la reacción PCR. La región hipervariable de 16S se amplificó con la PCR usando cebadores del género *Mycobacterium* (posiciones 213-236 y 394-415 en la secuencia de referencia de *M. tuberculosis*, M20940, Genbank, el tamaño del amplicón de TB es 202 pb). Los cebadores también contenían una secuencia promotora T3 o T7 de bacteriófago en su extremo 5': T3-MI 5'aattaaccctcactaaagggAA CACGTGGGTGATCTGCCCTGCA y T7-M2 5'-gtaatacgactcactataggctTGTGGCCGGACACCCTCTCA (secuencia promotora en minúsculas, secuencia de micobacterias en mayúsculas). El sitio de *rpoB* Rif de *M. tuberculosis* se amplificó usando los cebadores MTX 2281 TB y MTX 2985 TB, descritos antes, y se pusieron colas de las secuencias promotoras T3 o T7. La amplificación de la región *KatG* de *M. tuberculosis* analizada en la matriz, se realizó usando los cebadores con cola T3 o T7 33f 5'. TCACAGCCCGATAACACCAAC y 2288r 5'-GGCCGATCAACCCGAAT CAGC (posiciones 1942-1962 y 4197-4217 en X68081, el tamaño del amplicón de TB es 2275 pb).

La PCR se llevó a cabo en un volumen de reacción de 100 µl que contenía KCl 50 mM, Tris 10 mM, pH 8,3, MgCl₂ 1,5 mM, gelatina al 0,001% (p/v), DMSO al 5% (v/v), 0,5 µM de cada cebador, 200 µM de cada uno de los cuatro trifosfatos de desoxinucleótido y 1,5 unidades de Taq polimerasa (AMpliTaq, Perkin-Elmer). La PCR se llevó a cabo en un ciclador térmico 2400 de Perkin-Elmer con una etapa de desnaturalización inicial a 94°C durante 5 min y condiciones de ciclación a 94°C durante 45 s, 60°C durante 30 s, 72°C durante 30 s (2 min para el objetivo *katG*) durante 35 ciclos y 72°C durante 10 min para el último ciclo.

Con el fin de cribar si hay micobacterias presentes en una muestra, se debe preparar una sonda diseñada en una región conservada de las micobacterias, tal como una región que va a ser amplificada por los dos cebadores. En este ejemplo, una sonda de detección que comprende la secuencia 5' GATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGT 3' permite el cribado. Después de la desnaturalización del fragmento de la PCR con calor o tratamiento alcalino, e hibridación del fragmento amplificado con la sonda marcada (como se describe en *Nucleic Acids Research*, Vol. 26, pp 2150-2155 (1998)), el análisis de la señal fluorescente indica las especies de micobacterias presentes en la muestra.

Cuando el procedimiento de cribado fue positivo, se usaron los amplicones de la PCR marcados con el promotor para generar la transcripción *in vitro* de los objetivos de ARN monocatenarios marcados. Cada 20 µl de reacción contenían aproximadamente 50 ng de producto de la PCR, 20 U de ARN polimerasa T3 o T7 (Promega), acetato de Tris 40 mM, pH 8,1, Mg(acetato)₂ 100 mM, DTT 10 mM, de cada uno de ATP, CTP y GTP 1,25 mM, UTP 0,5 mM y fluoresceína-UTP 0,25 mM. La reacción se llevó a cabo a 37°C durante 1 hora. El ARN transcrito *in vitro* se fragmentó ajustando la concentración de MgCl₂ a 30 mM y calentando a 94°C durante 30 min, o por incubación con MnCl₂ 30 mM e imidazol 30 mM a 65°C durante 30 min. Se analizó la eficacia de la fragmentación mediante PAGE desnaturalizante.

Se usó una estrategia de teselado de matriz similar a la descrita en el documento de EE.UU. 5.837.832 (Chee) para identificar las secuencias que diferencian las especies de micobacterias y las mutaciones *rpoB*. Para cada base en una secuencia de referencia dada, se sintetizan en la matriz cuatro sondas de igual longitud. La base cuestionada se sitúa centralmente en las sondas, que también tienen extremos 3' y 5' comunes. Una sonda es un complemento exacto de la secuencia de referencia, mientras que las otras tres sondas representan los posibles emparejamientos erróneos de una base con la base cuestionada. Las células base se determinan comparando la intensidad de la hibridación de un objetivo marcado con las cuatro sondas. Para las secuencias de ARNr 16S, se eliminó el exceso de sondas sintetizando sondas compartidas por dos o más relacionadas sólo una vez en la matriz. Además de las sondas naturales para *rpoB*, cada mutación de resistencia a la rifampina está representada por su propio grupo de sondas. La matriz también contiene 2,2 kb de la secuencia del gen *KatG* de *M. tuberculosis*, que codifica la catalasa peroxidasa. La matriz de sondas se divide en cuatro zonas distintas correspondientes a las secuencias ARNr 16S, antisentido de *rpoB*, homsentido de *rpoB* y homsentido de *katG*. La matriz se divide en unidades o celdas específicas de 50 µm x 50 µm a lo largo de un área de 1,28 cm x 1,28 cm, haciendo un número total de 65.000 sitios de síntesis diferentes. Se usó una base de datos de 82 secuencias de ARNr 16S únicas para diseñar la matriz, que permite la discriminación de 54 especies de

fenotipos diferentes. Algunas especies o complejos taxonómicos están representados por más de una secuencia de referencia debido a la heterogeneidad de la secuencia observada en la región del ARNr 16S teledada en la matriz (es decir, complejo de *M. avium-intracellulare*). También está representada en la matriz una base de datos de secuencias *rpoB* de 61 aislados resistentes a la rifampina. Estas secuencias contienen 51 mutaciones de *rpoB* únicas.

La hibridación de las matrices de sondas se llevó a cabo usando GENE CHIP Fluidics Station (Affymetrix). Se diluyeron 1 a 5 μ l del ARN marcado objetivo fragmentado en 500 μ l de tampón de hibridación. El tampón de hibridación I consistía en 4,5X SSPE (NaCl 0,675 M, NaH_2PO_4 45 mM, EDTA 4,5 mM, pH 7,4), Triton X-100 al 0,005% (v/v) a 30°C. Se detectó la señal fluorescente emitida por el objetivo unido a la matriz con una densidad de 6 usando el escáner GeneArray (Hewlett Packard, Palo Alto, CA). Las intensidades celulares de la matriz de sondas, lectura automática de nucleótidos, determinación de la secuencia e informes fueron generados por las funciones disponibles en el software de GENE CHIP (Affymetrix). Se determinó un índice de selección de candidatos por el porcentaje de homología entre la secuencia obtenida experimentalmente y el de todas las secuencias de referencia teledadas en la matriz. Las secuencias de ácidos nucleicos se describen en las patentes de EE.UU. 5.589.585 (Mablat); 5.702.317 (Mablat) y 5.849.901 (Mablat) o están disponibles en Genbank u otras bases de datos.

Ejemplo 2

Análisis del VIH

Las secuencias de ácidos nucleicos del VIH usadas en las primeras matrices de la invención y específicamente para determinar la carga vírica, las han publicado Lin, y col., *J. Clin. Microbiol.* 36(3), pp. 835-839 (1998) y Korber, y col., *Science* 280, pp 1868-1871 (1998) o están disponibles para el público en Genbank u otras bases de datos. Los documentos publicados que describen las secuencias de ácidos nucleicos del VIH incluyen EP 0345375 (De Leys); EP 0173529 (Wong-Staal); EP 0178978 (Alizon); EP 0181150 (Luciw) y EP 0185444 (Chang). Las patentes de EE.UU. que describen secuencias de ácidos nucleicos incluyen 5.079.342 (Alizon) y 5.310.541 (Alizon). Véase también Kozal, Michael J. y col., "Extensive polymorphisms observed in HTV-1 clade B protease gene using high-density oligonucleotide arrays", *Nature Medicine*, Vol. 2, no. 7, pp. 753-759 (July 1996).

REIVINDICACIONES

1. Un sistema integrado de instrumentos para el análisis automático de ácidos nucleicos, que comprende:

a) una estación de procesamiento de la muestra para proporcionar una o más secuencias de ácidos nucleicos objetivo de una muestra de ensayo;

b) una primera estación de reacción de ensayo para llevar a cabo una reacción de hibridación en una o más de dichas secuencias de ácidos nucleicos objetivo o sus secuencias complementarias, comprendiendo dicha primera estación de reacción un primer dispositivo de formato de detección limitada o baja que tiene medios para analizar al menos una y menos de 50 secuencias distintas de ácidos nucleicos;

c) una segunda estación de reacción para llevar a cabo una segunda reacción de hibridación en una o más de dichas secuencias de ácidos nucleicos o sus secuencias complementarias, comprendiendo dicha segunda estación de reacción un segundo dispositivo de formato de detección alta o múltiple que tiene medios para analizar más de 100 secuencias distintas de ácidos nucleicos, que incluye más de 100 sondas de oligonucleótidos, cada una con una secuencia distinta, unida o inmovilizada sobre una matriz adecuada;

d) al menos un detector para determinar señales positivas de detección de hibridación para dichas secuencias de ácidos nucleicos objetivo o sus secuencias complementarias en dichas primera y segunda reacciones de hibridación; y

e) un módulo de control para el funcionamiento integrado de dichos instrumentos, en el que dicho módulo determina la necesidad de llevar a cabo la segunda reacción de hibridación basándose en los resultados de dicho detector y del análisis de las señales de detección de dichas primera y segunda reacciones de hibridación.

2. Un instrumento como se describe en la reivindicación 1, en el que dicho primer dispositivo de formato de detección tiene al menos de 1 a 10 secuencias distintas de ácidos nucleicos.

3. Un instrumento como se describe en la reivindicación 1, en el que dicho instrumento además comprende un segundo detector para detectar señales positivas de reacción de hibridación de dichas secuencias de ácidos nucleicos objetivo o sus secuencias complementarias en dicho segundo formato de detección y en el que dicho segundo formato de detección proporciona más datos para dichas secuencias de ácidos nucleico objetivo.

4. Un instrumento como se describe en la reivindicación 1, en el que dicha estación de procesamiento de la muestra comprende además medios para preparar secuencias de ácidos nucleicos objetivo seleccionadas.

5. Un instrumento como se describe en la reivindicación 1, en el que dicha estación de procesamiento de la muestra además comprende medios para llevar a cabo un procedimiento de amplificación de ácidos nucleicos de dichas secuencias de ácidos nucleicos objetivo proporcionadas en la etapa a.

6. Un instrumento como se describe en la reivindicación 5, en el que dicha estación de procesamiento de la muestra comprende además un medio para proporcionar secuencias de ácidos nucleicos de control interno.

7. Un instrumento como se describe en la reivindicación 1, en el que dicho instrumento comprende además un medio de transferencia de fluidos desde dicha estación de procesamiento de la muestra a dicha primera estación de reacción de ensayo.

8. Un instrumento como se describe en la reivindicación 1, en el que dicho instrumento comprende además un medio de transferencia de fluidos desde dicha primera estación de reacción de ensayo a dicha segunda estación de reacción de ensayo determinado por dicho módulo de control.

9. Un instrumento como se describe en la reivindicación 1, en el que dicho instrumento comprende además un medio de transferencia de fluidos desde dicha primera estación de reacción de ensayo a dicha segunda estación de reacción, automática sin intervención humana y sin permitir el contacto entre los fluidos que se transfieren y el entorno exterior.

10. Un instrumento como se describe en la reivindicación 1, en el que dicho primer dispositivo de formato de detección proporciona medios para llevar a cabo una reacción de hibridación en solución homogénea.

11. Un instrumento como se describe en la reivindicación 1, en el que dicho segundo dispositivo de formato de detección proporciona medios para llevar a cabo una reacción de hibridación en matriz.

12. Un instrumento como se describe en la reivindicación 6, en el que se lleva a cabo un procedimiento de amplificación en dicha o dichas secuencias de ácidos nucleicos objetivo y la o las secuencias de ácidos nucleicos de control interno.

ES 2 286 983 T3

13. Un instrumento como se describe en la reivindicación 1, en el que dicho módulo de control selecciona el uso de uno o más segundos formatos de detección basándose en los resultados de los datos de señal o señales de detección de dicha primera reacción de hibridación.
- 5 14. Un instrumento como se describe en la reivindicación 12, en el que dicha amplificación de dichas secuencias de ácidos nucleicos objetivo y dichas secuencias de ácidos nucleicos de control interno, se lleva a cabo simultáneamente.
- 10 15. Un instrumento como se describe en la reivindicación 5, en el que dicho procedimiento de amplificación se selecciona del grupo constituido por: TMA; PCR; NASBA; SDA y LCR.
16. Un instrumento como se describe en la reivindicación 1, en el que dicho primer dispositivo de formato de detección proporciona un medio para llevar a cabo una reacción de hibridación en matriz.
- 15 17. Un instrumento como se describe en la reivindicación 1, en el que dicho segundo formato de detección comprende una pluralidad de secuencias de ácidos nucleicos y tiene una densidad espacial mayor que 400 nucleótidos/cm².
- 20 18. Un instrumento como se describe en la reivindicación 1, en el que dicho segundo dispositivo de formato de detección incluye al menos 1000 secuencias distintas de ácidos nucleicos.
19. Un instrumento como se describe en la reivindicación 1, en el que dichos primer y segundo formato de detección son dispositivos desechables.
- 25 20. Un procedimiento para llevar a cabo el análisis de ácidos nucleicos usando un instrumento como se describe en la reivindicación 1, que comprende las etapas de:
- a) llevar a cabo una primera reacción de hibridación de formato de detección limitada o baja como se describe en la reivindicación 1, con un ácido nucleico objetivo o su secuencia complementaria, de una muestra de ensayo;
 - 30 b) generar una señal a partir de dicha primera reacción de hibridación;
 - c) suministrar dicha señal a un módulo de control;
 - d) procesar dicha señal en dicho módulo de control para determinar si dicha señal es mayor que un nivel umbral;
 - 35 e) en el caso de que dicha señal sea mayor que dicho nivel umbral, transferir dicho ácido nucleico objetivo o su secuencia complementaria a un dispositivo para
 - f) llevar a cabo una segunda reacción de hibridación de formato de detección múltiple o alta como se describe en la reivindicación 1; y
 - 40 g) generar una señal a partir de dicha segunda reacción; y
 - h) procesar dicha señal en dicho módulo de control para analizar dicho ácido nucleico objetivo.
- 45 21. El procedimiento de la reivindicación 20, en el que dicha segunda reacción comprende un segundo formato de detección que comprende más de 1000 secuencias de ácidos nucleicos.
22. El procedimiento de la reivindicación 20, que además comprende las etapas de amplificar simultáneamente 50 secuencias de ácidos nucleicos objetivo seleccionadas y la secuencia de ácido nucleico de control interno, medir una señal de dicho control interno, comparar dicha señal de control interno con un valor umbral para dicho control interno, y rechazar dicho ensayo en el caso de que dicha señal de control interno sea menor que dicho valor umbral de control interno.
- 55 23. Un procedimiento para llevar a cabo un análisis de ácidos nucleicos usando un instrumento como se describe en la reivindicación 1, que comprende las etapas de:
- amplificar todas las secuencias de ácidos nucleicos objetivo en una muestra de ensayo y las secuencias de control interno que son necesarias para el análisis con formato de detección limitada o baja y múltiple o alta, como se describe 60 en la reivindicación 1;
 - llevar a cabo un análisis con formato de detección limitada o baja como se describe en la reivindicación 1, de una o más secuencias de ácidos nucleicos amplificadas;
 - 65 medir las señales de control interno y señales objetivo de dicho análisis con formato de detección limitada o baja;
 - suministrar dichas señales de control interno y dichas señales objetivo a un módulo de control;

ES 2 286 983 T3

implementar un algoritmo de control en dicho módulo de control, en el que dicho algoritmo:

i) compara dichas señales de control interno con un primero valor umbral, y dicha comparación determina si rechazar dicho ensayo; y si dicha comparación indica que no se rechaza dicho ensayo,

ii) compara dichas señales objetivo con un segundo umbral; y

transferir dichas una o más secuencias de ácidos nucleicos amplificadas previamente a un dispositivo con formato de detección múltiple o alta, como se describe en la reivindicación 1, y llevar a cabo dicho ensayo de detección múltiple en dicho dispositivo.

24. El procedimiento de la reivindicación 24, en el que cada una de dichas etapas se lleva a cabo automáticamente y sin intervención humana.

25. Un procedimiento de diagnóstico para recoger datos de una muestra de ensayo que contiene una o más secuencias de ácidos nucleicos en un instrumento automático como se describe en la reivindicación 1, que comprende:

a) liberar las secuencias de ácidos nucleicos de una muestra de ensayo;

b) amplificar dichas secuencias de ácidos nucleicos para producir amplicones;

c) proporcionar dichos amplicones a un primer formato de detección limitada o baja, como se describe en la reivindicación 1, que comprende secuencias de ácidos nucleicos complementarias de uno o más de dichos amplicones para una reacción de hibridación;

d) detectar la presencia de dichos amplicones hibridados, mediante dicho primer formato de detección limitada o baja; y

e) determinar por el algoritmo de control un resultado positivo o negativo en la etapa c, en el que dichos amplicones de la etapa b se analizan más en un segundo formato de detección múltiple o alta, como se describe en la reivindicación 1, para recoger datos si se ha obtenido un resultado positivo.

FIG. 1
TÉCNICA ANTERIOR

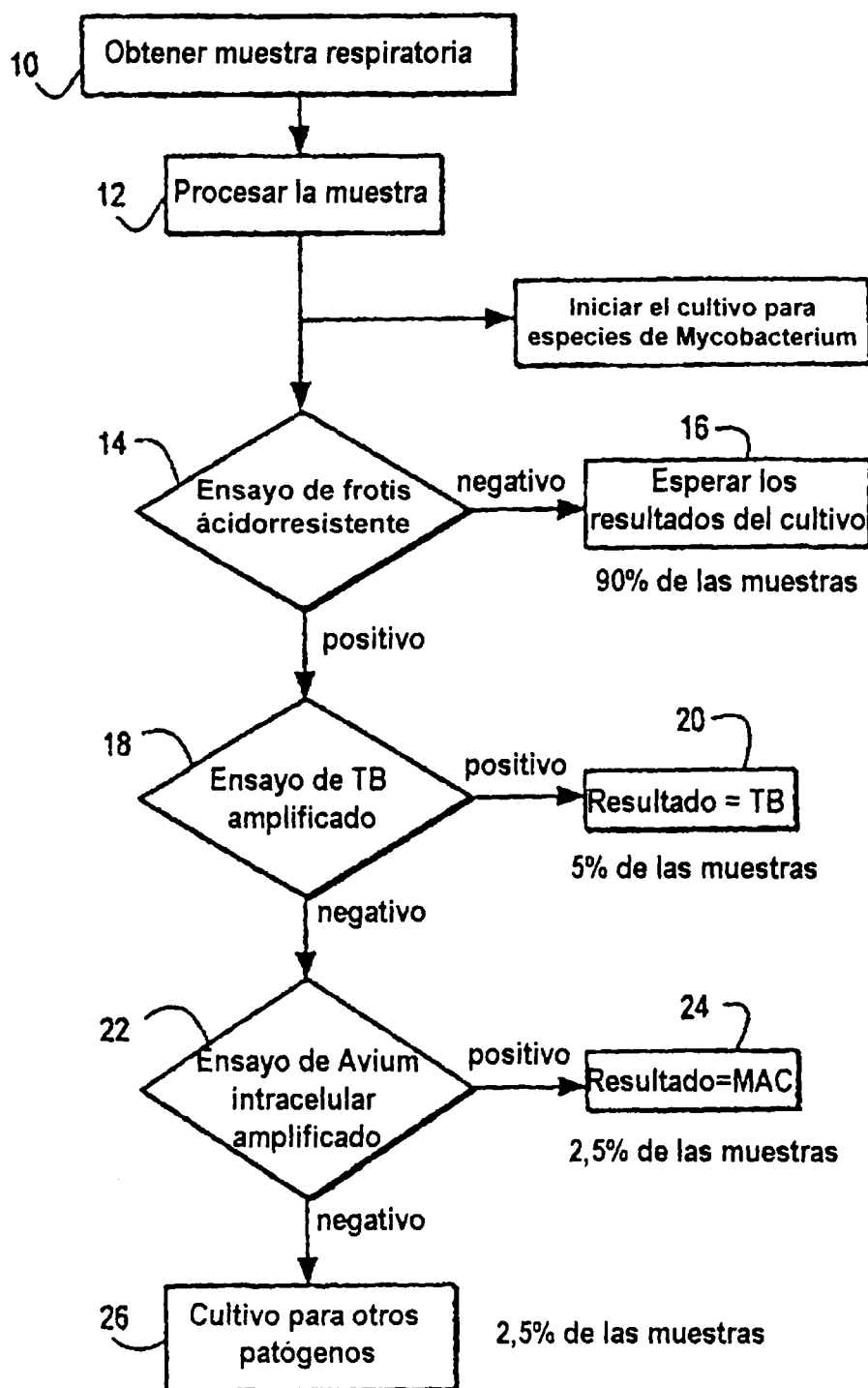


FIG. 2

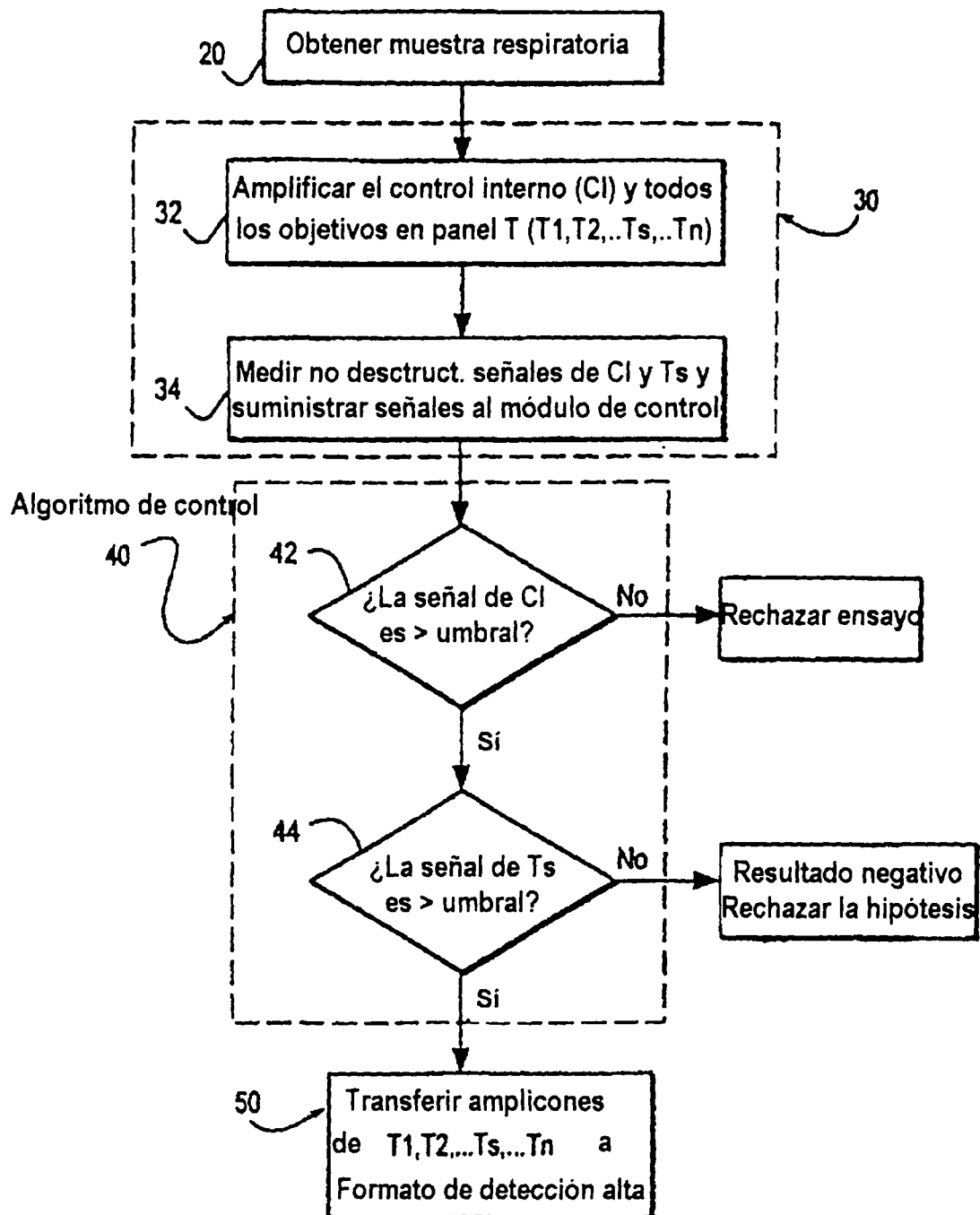


FIG. 3

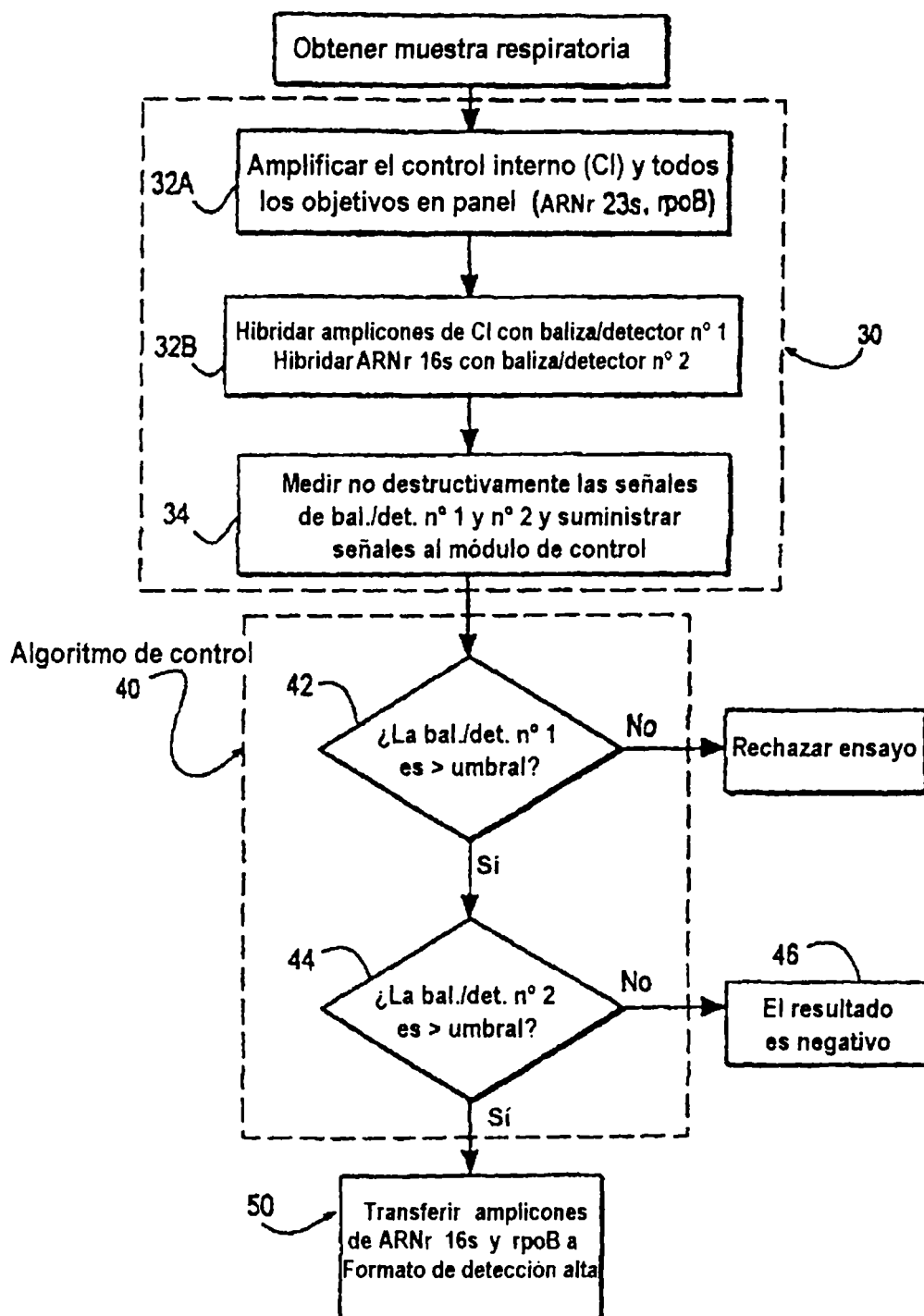
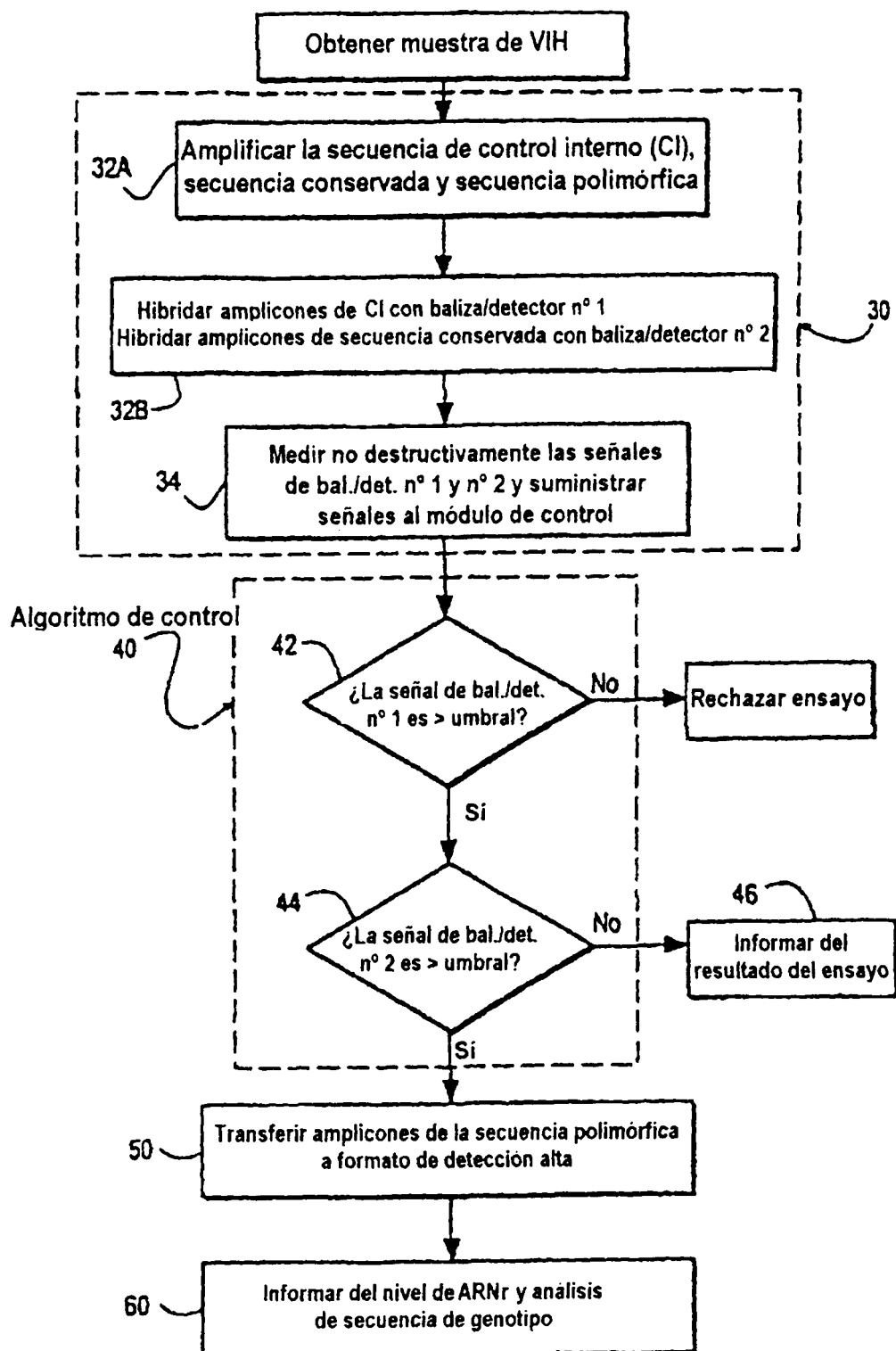


FIG. 4



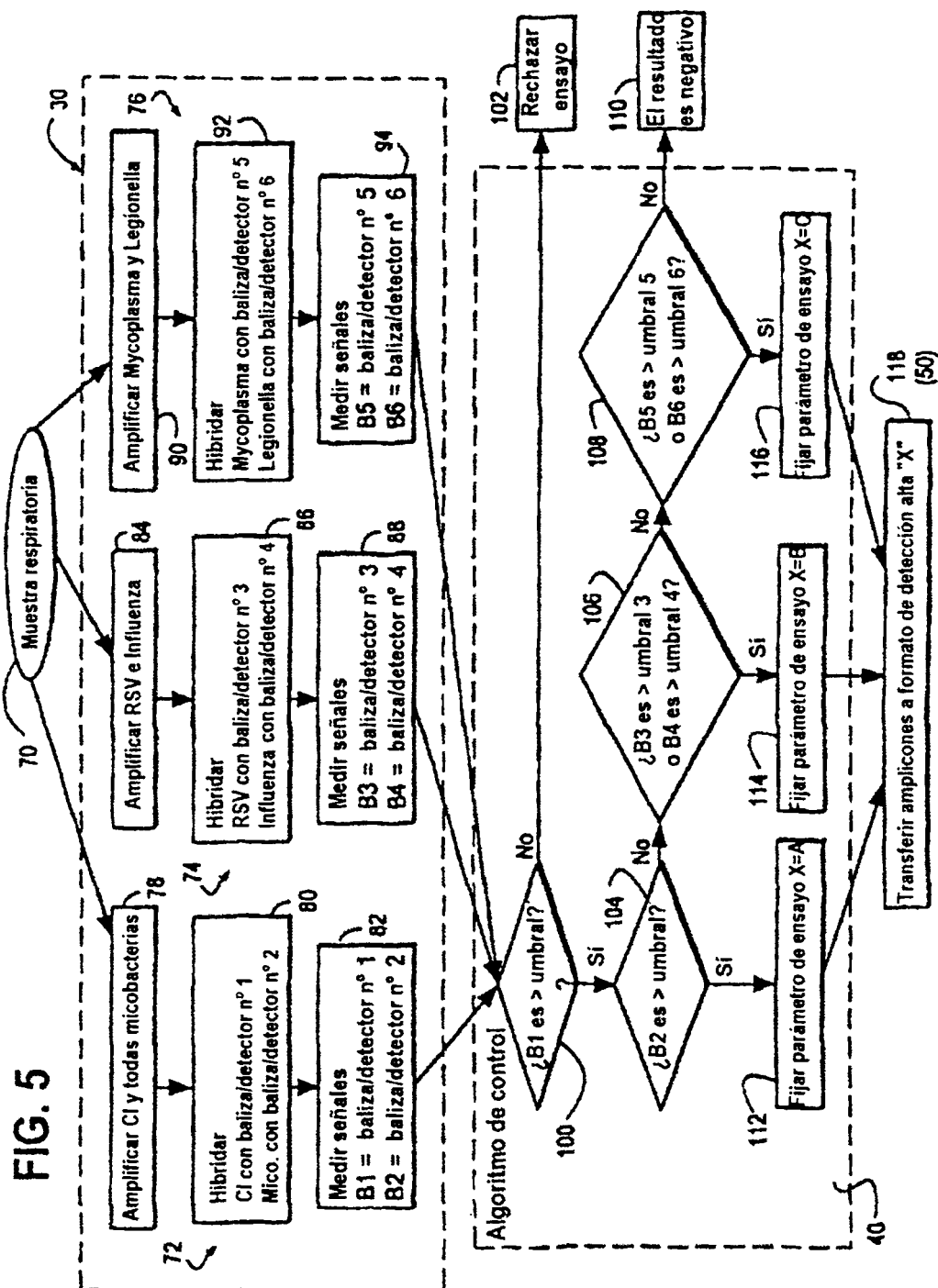


FIG. 6

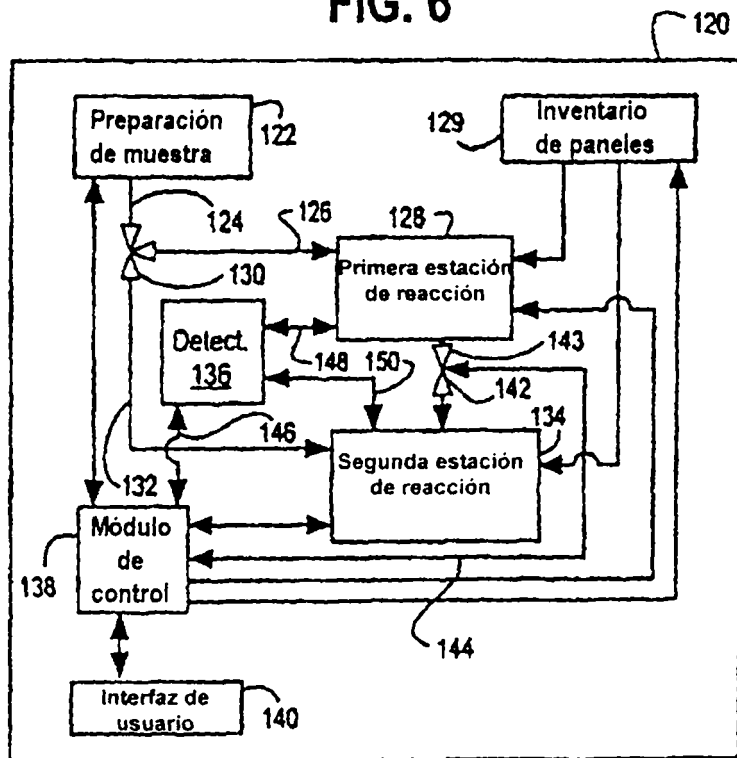
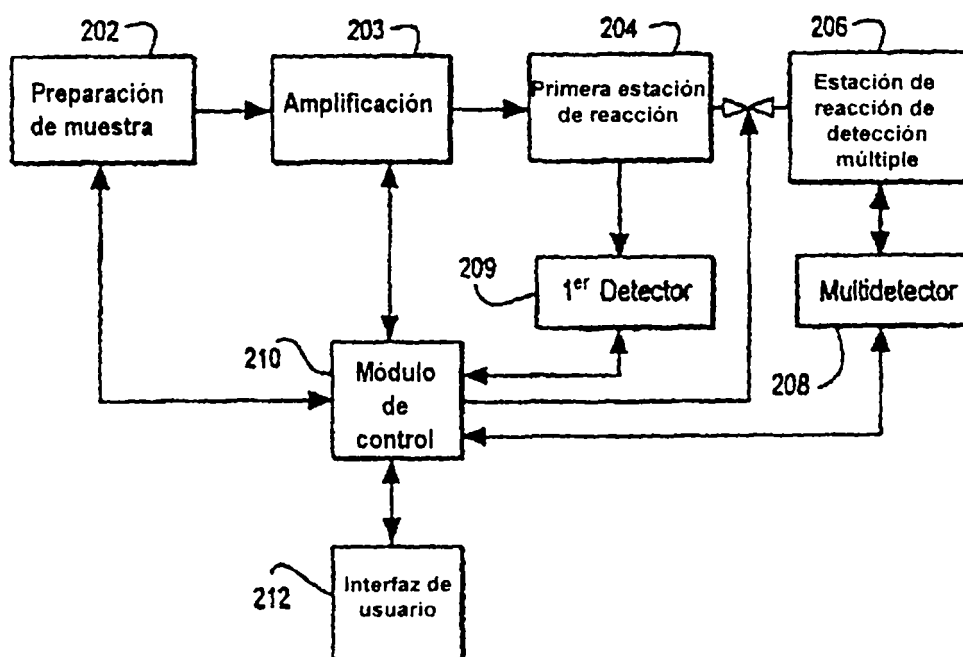


FIG. 7



ES 2 286 983 T3

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> bioMerieux, Inc.	
5	<120> “Procedimiento y dispositivos para realizar el análisis de una muestra de ácido nucleico”	
	<130> CF/JF/G14879EP	
	<140>	
	<141>	
10	<150> US 09/291.566	
	<151> 1939-04-13	
	<160> 5	
	<170> PatentIn Ver. 2.1	
15	<210> 1	
	<211> 44	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador del género Mycobacterium (posiciones 213-236 en la secuencia M20940 de <i>M. tuberculosis</i> y promotor T3 de bacteriófago)	
25	<400> 1	
	aattaaccct cactaaaggg aacacgtggg tgatctgccc tgca	44
30	<210> 2	
	<211> 43	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador del género Mycobacterium (posiciones 394-415 en la secuencia M20940 de <i>M. tuberculosis</i> y promotor T7 de bacteriófago)	
40	<400> 2	
	gtaatacgac tcactatagg gctgtggcc ggacaccctc tca	43
45	<210> 3	
	<211> 21	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: posiciones 1942-1962 de X68081 del cebador con cola de T3	
55	<400> 3	
	tcacagcccg ataacaccaa c	21
60	<210> 4	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
65	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: posiciones 4197-4217 de X6B081 del cebador con cola de T7	

ES 2 286 983 T3

<400> 4

ggccgatcaa cccgaatcag c

21

5

<210> 5

<211> 30

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: sonda, diseñada en una región conservada de Mycobacterium

15

<400> 5

gatgagcccg cggcctatca gcttggtggt

30

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65