

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 705 574**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/569** (2006.01)

**C12N 15/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.10.2014 PCT/EP2014/072386**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.04.2015 WO15059065**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.10.2014 E 14786202 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.11.2018 EP 3060920**

54 Título: **Procedimientos para medir partículas de virus libres de células a partir de gotas de sangre seca**

30 Prioridad:

**22.10.2013 US 201361894332 P**

**28.02.2014 US 201461945974 P**

**17.07.2014 US 201462025886 P**

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

**26.03.2019**

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)**

**Grenzacherstrasse 124**

**4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**BAUM, PAUL;**

**CRASK, MEGAN y**

**WU, XIAONING**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

ES 2 705 574 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

Procedimientos para medir partículas de virus libres de células a partir de gotas de sangre seca

5 **CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere al campo de la medición de la concentración vírica en la sangre y, más en particular, a procedimientos para medir partículas de virus libres de células a partir de gotas de sangre seca.

10 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

En 2013, la Organización Mundial de la Salud (OMS) revisó las pautas actuales de prevención y tratamiento de la infección por el VIH e hizo hincapié en la importancia de la prueba de determinación de la concentración vírica (CV) del VIH en el tratamiento de pacientes positivos para el VIH. En lugar de cuadros clínicos iniciales y recuentos de células CD4, la OMS recomienda encarecidamente el uso de una prueba de determinación de la concentración vírica del VIH para vigilar el tratamiento antirretrovírico (TAR) de la infección por el VIH y reducir el límite del nivel de la CV plasmática del VIH de 5000 copias/ml a 1000 copias/ml para alcanzar la eficacia terapéutica. En otras palabras, si los pacientes con infección por el VIH en TAR tienen un valor vírico en plasma mayor de 1000 copias/ml, se considerará un fracaso del tratamiento farmacológico. Las respuestas al fracaso del tratamiento, tal como el asesoramiento sobre la adherencia, la prueba de determinación de la resistencia a los fármacos y las pautas de tratamiento de segunda línea, requieren mucho tiempo y son costosas, y solo deben usarse si es necesario.

Después de la infección, el virus del VIH no solo comienza a replicarse por sí solo en las células infectadas, sino que también integra su ADNc en los cromosomas del huésped como ADN provírico del VIH latente (Greene, W.C. y Peterlin, B.M., 2002, Charting HIV's remarkable voyage through the cell, *Nat Med.* 8(7): 673-80; Blankson, J.N., D. Persaud, R.F. Siliciano, 2002, The Challenge of Viral Reservoirs in HIV-1 Infection, *Annu. Rev. Med.* 53:557-593). La concentración vírica del VIH normalmente se mide usando plasma como tipo de muestra. Sin embargo, en entornos con recursos limitados, tales como África, las muestras de plasma pueden no obtenerse, almacenarse, transferirse ni someterse a prueba fácilmente (Organización Mundial de la Salud 2013, Consolidated guidelines on the use of antiretroviral drugs for treating and preventing HIV infection: recommendations for a public health approach. Organización Mundial de la Salud, Ginebra). Las gotas de sangre seca (DBS) se han evaluado como una solución para la prueba de determinación de la concentración vírica del VIH en los entornos con recursos limitados, con éxito limitado (Smit PW *et al.*, 2014, Systematic review of the use of dried blood spots for monitoring HIV viral load and for early infant diagnosis, *PLoS ONE.* 9(3): e86461; Bertagnolio, S. N.T. Parkin, M. Jordan, J. Brooks, J.G. Garcia-Lerma, 2010; Dried blood spots for HIV-1 Drug Resistance and Viral Load Testing: A Review of Current Knowledge and WHO Efforts for Global HIV Drug Resistance Surveillance, *AIDS Rev.* 12:195-208; Johannessen, A, 2010; Dried blood spots in HIV monitoring: applications in resource-limited settings, *Bioanalysis.* 2(11):1893-1908). Además, las muestras de gotas de sangre seca se han evaluado como una solución para la prueba de determinación de la concentración vírica del VHB sin considerar la exactitud de la medición (Mohamed S. *et al.*, Dried blood spot sampling for HBV serology and molecular testing, *PLoS ONE*, 8(4): e61077). Roche Molecular Diagnostics (RMD) tiene un producto para uso en investigación exclusivamente (RUO), desarrollado en 2009, que usa la prueba del VIH-1 con PCR en tiempo real COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® (CAP/CTM) v2.0 y el procedimiento con gotas de líquidos secas (DFSP), para medir la concentración vírica del VIH en DBS. Por desgracia, cuando se someten a prueba muestras de plasma y DBS pareadas, la prueba DFSP produce valores de concentración vírica más altos en comparación con los valores de referencia en plasma. Esta sobreestimación es particularmente pronunciada en muestras con concentraciones víricas plasmáticas de menos de 5.000 copias/ml, probablemente debido a la detección de ADN y ARN del VIH asociados a células.

De acuerdo con el procedimiento de DFSP del VIH-1 CAP/CTM, la DBS con VIH se incuba primero con un agente caotrópico: el tampón de preextracción de muestras (SPEX) y el total de ácidos nucleicos, incluyendo el ARN vírico del VIH en los líquidos sanguíneos, más ADN y ARN del VIH asociados a otras células, tales como ADN provírico del VIH, se extraen y se eluyen de la DBS en el tampón SPEX.

A continuación, el tampón extraído se coloca en el instrumento CAP/CTM para la purificación de ácidos nucleicos seguido de la amplificación y detección específicas del VIH. Las metodologías de extracción de ácidos nucleicos actualmente existentes para la medición de la CV del VIH en DBS lisan completamente todas las células y desnaturalizan todos los complejos de proteínas, lo que permite la extracción completa de los ácidos nucleicos totales de la DBS, incluyendo las partículas víricas del VIH libres en los líquidos sanguíneos y el ARN y ADN del VIH asociados a células.

La sobrecuantificación de la CV del VIH en DBS es un problema no solo con el ensayo en DBS de Roche, sino que también se observa con otros ensayos disponibles comercialmente, tales como el ensayo en DBS para el VIH de Abbott. En las comunidades médicas y científicas sobre el VIH, se ha especulado que el ADN del VIH presente en las células infectadas por el VIH en las DBS provoca la sobrecuantificación de la concentración vírica, aunque los mecanismos exactos de este fenómeno de sobrecuantificación no están claros ni demostrados (Médecins Sans Frontières Access Campaign, 2013). La sobreestimación en DBS se puede mejorar pero no eliminar por

procedimientos de amplificación que tienen especificidad por el ARN con respecto al ADN (por ejemplo, el procedimiento NASBA usado por BioMerieux NucliSENS®). Sigue habiendo una necesidad de procedimientos alternativos que aborden los desafíos de la sobrecuantificación de CV del VIH en una muestra.

## 5 SUMARIO DE LA INVENCIÓN

Una solución para la sobreestimación en DBS puede ser eliminar de la muestra tanto el ARN como el ADN asociados a células, dejando que solo se detecte el virus libre de células, similar a una muestra de plasma. Esto puede evitar los costosos errores de clasificación de pacientes como fracasos de tratamiento. Dichos procedimientos y beneficios relacionados se describen en la presente divulgación.

La presente invención se define por las reivindicaciones adjuntas. La divulgación se refiere a un procedimiento para medir ácidos nucleicos y/o partículas de virus libres de células a partir de gotas de sangre seca. El procedimiento puede incluir las etapas de rehidratar una muestra de sangre seca aplicando una solución tampón a la muestra de sangre seca para producir una muestra de sangre seca rehidratada; opcionalmente, fijar células presentes en la muestra de sangre seca rehidratada con un reactivo de fijación para contener el ARN y/o el ADN asociados a células con las células; eluir los ácidos nucleicos y/o partículas de virus libres de células de la muestra de sangre seca rehidratada con un reactivo de elución que eluye preferentemente partículas de virus libres de células sin alterar el ARN y/o ADN asociados a células; separar los ácidos nucleicos y/o partículas de virus libres de células de cualquier residuo celular que pueda estar presente en la muestra de sangre seca rehidratada por medio de un filtro; y medir ácidos nucleicos y/o partículas de virus libres de células mediante una técnica de cuantificación de partículas de virus seleccionada del grupo que consiste en cuantificación de ácidos nucleicos específicos para la secuencia, ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA), reacción en cadena de la polimerasa (PCR), amplificación isotérmica de ácidos nucleicos, hibridación de ácidos nucleicos, hibridación *in situ* y microscopía electrónica.

De acuerdo con la presente divulgación, las partículas de virus que se van a medir en las DBS pueden ser uno o más del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus linfótropo de linfocitos T humanos 1 o 2 (HTLV-1 o 2), virus de la hepatitis C (VHC), virus de la hepatitis B (VHB), citomegalovirus (CMV) (por ejemplo, CMV humano) y virus de Epstein-Barr (VEB). Un modo de realización de la solución tampón puede incluir un reactivo de fijación y un reactivo de elución. Un modo de realización del reactivo de fijación puede ser metanol y un modo de realización del reactivo de elución puede ser solución salina tamponada con fosfato u otros tampones adecuados. En algunos modos de realización del procedimiento, la etapa de separación puede incluir filtración por columna de centrifugado, filtración por vacío o centrifugación. Los modos de realización pueden incluir un filtro que tiene tamaños de poros con un intervalo de entre aproximadamente 0,1 µm a aproximadamente 100 µm, por ejemplo, entre aproximadamente 20 µm a aproximadamente 80 µm, por ejemplo, entre aproximadamente 30 µm a aproximadamente 70 µm, por ejemplo, entre aproximadamente 40 µm a aproximadamente 60 µm.

Preferentemente de acuerdo con la presente invención, la solución tampón comprende PBS. En un modo de realización adicional, la solución tampón comprende la solución de elución. En otro modo de realización, la solución de elución comprende PBS.

Los detalles de uno o más modos de realización de la divulgación se exponen en los dibujos adjuntos y la descripción a continuación. Otras características, objetivos y ventajas de la divulgación serán evidentes a partir de los dibujos y la descripción detallada, y a partir de las reivindicaciones.

## 45 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La FIGURA 1 muestra una vista esquemática del ciclo de vida del virus VIH. Después de que una célula huésped se infecta por el virus VIH, el genoma del ARN vírico se retrotranscribe por la transcriptasa inversa codificada por el virus al ADNc. El ADNc se integra a continuación en el ADN cromosómico del huésped, que forma un ADN provírico. Genomas de ARN vírico del VIH adicionales se transcriben desde el ADN provírico y se transportan al citoplasma para el ensamblaje de partículas víricas. El virus VIH madurado brota de las células infectadas y se convierte en una partícula vírica libre.

La FIGURA 2 muestra una vista esquemática de un modo de realización ejemplar de una configuración para medir partículas de virus libres de células a partir de gotas de sangre seca. Una muestra de un paciente con infección por el VIH con DBS en papel de filtro Whatman se coloca primero en una columna de centrifugado y se incuba con un tampón de fijación/elución o extracción. Después de la extracción de partículas víricas de la DBS, el tampón que contiene los virus se pasa a través de un filtro en la columna de centrifugado, por ejemplo, por centrifugación o bien por vacío. El tampón de transferencia recolectado se coloca a continuación en el CAP/CTM para otra preparación de la muestra y la amplificación y detección de la diana.

La FIGURA 3 muestra una vista esquemática detallada de un modo de realización ejemplar de un procedimiento para medir partículas de virus libres de células a partir de DBS fijada en papel de filtro Whatman 903. Tras la rehidratación y la fijación, la mayoría de las células sanguíneas permanecen en la superficie del papel de filtro y el ADN y ARN del VIH asociados a células están contenidos en las células infectadas, mientras que las partículas víricas libres de células se

desactivan en el tampón de elución. Algunas células sanguíneas, incluyendo células infectadas por el VIH y residuos celulares, también se pueden disociar con el papel de filtro 903. Cuando se realiza la centrifugación, el filtro de columna de centrifugado evita que las células o los residuos celulares pasen a través de él, pero no los virus libres de células eluidos, y los virus VIH libres de células se recolectan de la solución de transferencia.

5 La FIGURA 4 muestra el rendimiento analítico de la elución en SPEX y PBS de gotas de sangre seca, en relación con la concentración vírica plasmática.

10 La FIGURA 5 muestra la correlación clínica entre las concentraciones víricas en DBS y plasmáticas, usando elución en PBS. Se ha aplicado un factor de corrección de 0,6 log.

La FIGURA 6 muestra un gráfico de sesgos que compara los procedimientos de concentración vírica en DBS con la concentración vírica plasmática como procedimiento de referencia.

15 La FIGURA 7 muestra la correlación y la concordancia de las mediciones de concentración vírica a partir de DBS con plasma.

### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

20 Si bien hay productos disponibles que reducen la contribución del ADN asociado a células a la medición de la concentración vírica en DBS, los procedimientos descritos en el presente documento pueden reducir tanto el ARN asociado a células como el ADN asociado a células. Los procedimientos descritos son fáciles de realizar y no requieren instrumentos complicados ni tratamientos bioquímicos. Es importante destacar que los procedimientos no alteran los procedimientos de recolección de muestras actualmente existentes para DBS, ni cambian los protocolos posteriores existentes, por ejemplo, el producto del DFSP del VIH-1 CAP/CTM de RMD.

25 Rehidratar una DBS (por ejemplo, una DBS con VIH) con una solución o un tampón de extracción que solo puede eluir las partículas víricas libres de células (por ejemplo, partículas víricas del VIH libres de células) de la DBS rehidratada sin alterar las células o los residuos celulares en la DBS puede permitir la separación de las partículas más pequeñas libres de células de los residuos asociados a células de mayor tamaño. La medición de la concentración vírica (CV) (por ejemplo, CV del VIH) de las partículas de virus liberadas se puede realizar entonces sin interferencia del ARN y ADN asociados a células (por ejemplo, ARN y ADN del VIH).

30 En un aspecto de la invención, una DBS (por ejemplo, una DBS con VIH) se rehidrata en una solución tampón. En un modo de realización, la solución tampón comprende un tampón biológico y un reactivo de fijación. Por ejemplo, se puede usar solución salina tamponada con fosfato (PBS) (el tampón biológico) con metanol (el reactivo de fijación), que puede eluir preferentemente partículas víricas libres de células (por ejemplo, partículas de VIH libres de células), pero sin alterar las células infectadas (por ejemplo, células infectadas por el VIH con ARN del VIH asociado a células y ADN provírico) en una DBS rehidratada (por ejemplo, una DBS con VIH). Se pueden usar modos de realización ejemplares de los reactivos de fijación (o reactivos fijadores y deshidratantes), tales como metanol, etanol, formaldehído, cloroformo y/o acetona. El modo de realización ejemplar del tampón de elución puede incluir soluciones tamponadas con fosfato, tales como PBS. El PBS es un tampón normal que está cerca de las condiciones fisiológicas humanas y el metanol puede fijar células precipitando proteínas. El metanol se ha usado ampliamente como un fijador suave en los inmunoensayos. Cuando una DBS (por ejemplo, una DBS con VIH) se trata con PBS más metanol, el ARN y ADN víricos asociados a células (por ejemplo, ARN y ADN del VIH) pueden estar contenidos en las células fijas, mientras que las partículas víricas libres de células (por ejemplo, partículas del VIH) se pueden eluir de la DBS rehidratada con PBS. Aunque la tasa de recuperación del virus libre de células con esta solución de PBS/metanol puede ser más baja que con el tampón SPEX, es posible que esta solución pueda disminuir significativamente la liberación de ADN y ARN víricos asociados a células (por ejemplo, ADN y ARN del VIH) de la DBS (véase los ejemplos). Optimizar los protocolos y procedimientos experimentales puede aumentar la tasa de recuperación de virus de la DBS. Además, en algunos modos de realización de los procedimientos descritos se pueden usar otros tampones y sus combinaciones con disolventes que tienen propiedades similares a PBS/metanol.

35 En otro aspecto de la invención, una DBS (por ejemplo, una DBS con VIH) se rehidrata en una solución tampón en ausencia de un reactivo de fijación. En un modo de realización adicional, la DBS se rehidrata en una solución tampón que comprende un tampón biológico. En otro modo de realización, el tampón biológico es PBS. En otro modo de realización, la solución tampón está libre de un reactivo de fijación. La solución tampón que contiene PBS se puede usar para eluir preferentemente partículas víricas libres de células (por ejemplo, partículas víricas de VIH libres de células) sin alteración de las células infectadas (por ejemplo, células infectadas por el VIH que contienen ARN del VIH asociado a células y ADN provírico) que están presentes en la DBS rehidratada. Cuando la DBS se trata con PBS, el ARN y ADN asociados a células pueden estar contenidos en las células fijadas, mientras que las partículas víricas libres de células se pueden eluir de la DBS rehidratada con PBS. En un modo de realización, la DBS es una DBS con VIH.

60 En un aspecto adicional, la presente divulgación proporciona un procedimiento para medir partículas de virus libres de células a partir de una gota de sangre seca (DBS). En un modo de realización, el procedimiento comprende la etapa de

rehidratar una muestra de sangre seca aplicando una solución tampón a la muestra de sangre seca para producir una muestra de sangre seca rehidratada. En otro modo de realización, el procedimiento comprende la etapa de eluir partículas de virus libres de células de la muestra de sangre seca rehidratada con un reactivo de elución. En otro modo de realización, el reactivo de elución eluye preferentemente partículas de virus libres de células sin alterar el ARN y/o ADN asociados a células. En un modo de realización adicional, el procedimiento comprende la etapa de separar los virus libres de células de cualquier residuo celular que pueda estar presente en la muestra de sangre seca rehidratada. En un modo de realización, la separación es por medio de un filtro. En otro modo de realización, la etapa de separación es opcional. En otro modo de realización, el procedimiento comprende la etapa de medir partículas de virus libres de células mediante una técnica de cuantificación de partículas víricas. En otro modo de realización, las partículas de virus son partículas de virus de ARN o ADN. En un modo de realización adicional, las partículas de virus de ARN o ADN están presentes en una solución acuosa durante la etapa de rehidratación (la solución tampón acuosa) y durante la etapa de elución (la solución de elución acuosa) de manera que son adecuadas para su uso en las etapas de separación y/o de medición del procedimiento.

Para reducir aún más la contaminación del ARN y ARN víricos (por ejemplo, VIH) asociados con células de la DBS rehidratada, los eluidos extraídos con PBS/metanol (o PBS solo) se pueden pasar a través de un filtro, lo que permite una separación adicional de las partículas de virus eluidas de los residuos celulares de mayor tamaño que posiblemente se hayan desprendido de la DBS durante la extracción. Los filtros de columna de centrifugado están disponibles con tamaños de poros definidos. Otros procedimientos de separación, tales como filtración al vacío o centrifugación, pueden aumentar el rendimiento de este procedimiento. Los expertos en la técnica apreciarán que pueden ser adecuados otros procedimientos de separación. En un modo de realización, la DBS es una DBS con VIH.

Los procedimientos descritos de la presente solicitud también se pueden aplicar para el aislamiento de otros virus transmitidos por la sangre a partir de DBS o sangre entera, tales como HTLV, VHC, VHB o similares. Además, los procedimientos se pueden extender para aislar pequeñas moléculas bioquímicas, tales como pequeños ácidos nucleicos o polipéptidos, de células grandes o residuos celulares. Por ejemplo, los procedimientos se pueden usar para recolectar ácidos nucleicos o antígenos específicos de tumores libres de células a partir de sangre entera sin interferencias de grandes cantidades de ADN cromosómico y residuos celulares. Los procedimientos también se pueden usar para enriquecer ADN fetal circulante de muestras de DBS maternas.

La medición periódica de la concentración vírica es una herramienta importante para guiar las pautas de tratamiento de los sujetos infectados, especialmente aquellos en tratamiento antivírico (por ejemplo, tratamiento antirretrovírico) (Arredondo *et al.*, J. Clin. Microbiol., 2012, 50(3):569). Como se analiza en el presente documento, la medición de la concentración vírica en plasma se enfrenta a determinados desafíos en entornos con recursos limitados y la medición de la concentración vírica en muestras de sangre seca ha tenido un éxito limitado. Los procedimientos de la presente invención se pueden usar para obtener una medición de la concentración vírica a partir de una muestra de sangre seca que concuerde con una medición de la concentración vírica (CV) a partir de una muestra de plasma. El término "concordancia" o "concordante con" como se usa en el presente documento se refiere al grado en que al menos dos mediciones de la concentración vírica están en un estado de acuerdo estadístico. En algunos modos de realización, la concordancia de una medición de la CV de una muestra de sangre seca con una medición de la CV plasmática está entre aproximadamente un 85 % y aproximadamente un 99 %. En otros modos de realización, la concordancia es de al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 86 %, al menos aproximadamente un 87 %, al menos aproximadamente un 88 %, al menos aproximadamente un 89 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 91 %, al menos aproximadamente un 92 %, al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 94 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 %. Este tipo de concordancia se aplica en el contexto de un punto de decisión médica para un paciente antes, durante o después del tratamiento antivírico. En un punto de decisión médica, es frecuente medir la concentración vírica del VIH en una muestra de un paciente por el  $\log_{10}$  del número de copias (cp) de virus por ml (o  $\log_{10}$  cp/ml). En general, el límite para la concentración vírica (CV) del VIH es de 1000 cp/ml, donde una medición  $>1000$  cp/ml o  $<1000$  cp/ml guía una decisión médica. Por ejemplo, dependiendo de la cp/ml medida, la decisión médica podría ser iniciar una pauta de tratamiento de la infección por el VIH, así como continuar, modificar o interrumpir una pauta de tratamiento existente de la infección por el VIH. Por ejemplo, para un paciente con infección por el VIH que recibe tratamiento antirretrovírico, una medición posterior de  $>1000$  cp/ml del VIH indicaría que el tratamiento existente no ha tenido éxito, mientras que una medición de  $<1000$  cp/ml del VIH indicaría que el tratamiento existente ha tenido éxito. Por lo tanto, la concordancia entre las mediciones de la concentración vírica a partir de una muestra de sangre seca y a partir de una muestra de plasma significa que las cp/ml demuestran una correlación estadísticamente significativa en el contexto de un punto de decisión médica. Como se describe en la tabla 3.2 del ejemplo 3, se usaron muestras pareadas de 196 muestras de pacientes para obtener mediciones de la concentración vírica a partir de una muestra de plasma y de un procedimiento de muestra de sangre seca de acuerdo con los procedimientos de la presente invención (también conocida como elución de virus libre o proceso FVE). De las 196 muestras pareadas, (i) se encontró que 93 tenían una CV de  $<1000$  cp/ml para muestras tanto de plasma y como de sangre seca; (ii) se encontró que 93 tenían una CV de  $>1000$  cp/ml para muestras tanto de plasma como de sangre seca; y (iii) se encontró que solo 10 tenían  $>1000$  cp/ml en plasma y  $<1000$  cp/ml en muestras de sangre seca. Por consiguiente, la concordancia global de las muestras de sangre seca con las de plasma fue alta, de un 95 %. Por el contrario, y como se muestra en la tabla 3.1, la concordancia global de las muestras de sangre seca con las de plasma usando el protocolo de gota de líquido seco

(DFSP) fue mucho menor debido al hecho de que, de las 196 muestras pareadas, se encontró que 64 tenían >1000 cp/ml en plasma pero <1000 cp/ml en muestras de sangre seca. Por consiguiente, la concordancia global de las muestras de sangre seca con las de plasma fue solo de un 67 %.

5 En otro aspecto, la presente invención proporciona procedimientos en los cuales el límite de medición de la concentración vírica (CV) del VIH para fines de guiar una decisión médica está entre aproximadamente 1000 cp/ml y aproximadamente 5000 cp/ml, en el que una medición de CV > el límite indicaría que un tratamiento existente no ha tenido éxito, mientras que una medición de la CV < el límite indicaría que un tratamiento existente ha tenido éxito. En otros modos de realización, el límite de medición de la CV es aproximadamente 1100 cp/ml, aproximadamente 1200 cp/ml, aproximadamente 1300 cp/ml, aproximadamente 1400 cp/ml, aproximadamente 1500 cp/ml, aproximadamente 1600 cp/ml, aproximadamente 1700 cp/ml, aproximadamente 1800 cp/ml, aproximadamente 1900 cp/ml, aproximadamente 2000 cp/ml, aproximadamente 2100 cp/ml, aproximadamente 2200 cp/ml, aproximadamente 2300 cp/ml, aproximadamente 2400 cp/ml, aproximadamente 2500 cp/ml, aproximadamente 2600 cp/ml, aproximadamente 2700 cp/ml, aproximadamente 2800 cp/ml, aproximadamente 2900 cp/ml, aproximadamente 3000 cp/ml, aproximadamente 3100 cp/ml, aproximadamente 3200 cp/ml, aproximadamente 3300 cp/ml, aproximadamente 3400 cp/ml, aproximadamente 3500 cp/ml, aproximadamente 3600 cp/ml, aproximadamente 3700 cp/ml, aproximadamente 3800 cp/ml, aproximadamente 3900 cp/ml, aproximadamente 4000 cp/ml, aproximadamente 4100 cp/ml, aproximadamente 4200 cp/ml, aproximadamente 4300 cp/ml, aproximadamente 4400 cp/ml, aproximadamente 4500 cp/ml, aproximadamente 4600 cp/ml, aproximadamente 4700 cp/ml, aproximadamente 4800 cp/ml, aproximadamente 4900 cp/ml o aproximadamente 5000 cp/ml.

En un aspecto, la presente divulgación proporciona un procedimiento para obtener una medición de la concentración vírica a partir de una muestra de sangre seca que concuerda con una medición de la concentración vírica a partir de una muestra de plasma. En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para medir partículas de virus libres de células a partir de muestras de sangre seca (por ejemplo, gotas de sangre seca). En un modo de realización, el procedimiento comprende la etapa de rehidratar una muestra de sangre seca con una solución tampón. En otro modo de realización, se sospecha que la muestra de sangre seca contiene partículas de virus. En otros modos de realización, la solución tampón comprende PBS. En un modo de realización adicional, la etapa de rehidratación va seguida de una etapa de elución.

En otro modo de realización, el procedimiento comprende la etapa de eluir partículas de virus libres de células de la muestra de sangre seca rehidratada con un reactivo de elución que preferentemente eluye partículas de virus libres de células sin alterar el ácido nucleico asociado a células (o eluye partículas de virus libres de células en ausencia de alteración del ácido nucleico asociado a células). En un modo de realización, el ácido nucleico asociado a células es ARN y/o ADN. En un modo de realización adicional, el reactivo de elución es el mismo que la solución tampón de la etapa de rehidratación. En un modo de realización adicional, la etapa de elución va seguida de una etapa de separación.

En otro modo de realización, el procedimiento comprende la etapa de incubar una muestra de sangre seca en una solución tampón para rehidratar la muestra de sangre seca y eluir partículas de virus libres de células sin alterar el ácido nucleico asociado a células (o eluir partículas de virus libres de células en ausencia de alteración del ácido nucleico asociado a células). En un modo de realización adicional, la etapa de incubación va seguida de una etapa de separación.

En otro modo de realización, el procedimiento comprende la etapa de separar el virus libre de células de la muestra de sangre seca rehidratada. En un modo de realización, la etapa de separación comprende separar el virus libre de células de cualquier residuo celular que pueda estar presente en la muestra de sangre seca rehidratada. En otro modo de realización, la etapa de separación comprende filtración, incluyendo, sin limitación, filtración en columna de centrifugado por centrifugación o vacío. En algunos modos de realización, la filtración comprende el uso de un filtro que tiene un tamaño de poro de entre aproximadamente 0,1  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 100  $\mu\text{m}$ . En un modo de realización adicional, la etapa de separación está precedida por una etapa de rehidratación y/o una etapa de elución, o precedida por una etapa de incubación.

En un aspecto, el procedimiento comprende una etapa de medición basada en la muestra obtenida de la etapa de separación. En un modo de realización, la etapa de medición comprende medir la cantidad de partículas de virus libres de células en la muestra obtenida después de la etapa de separación. En otro modo de realización, la etapa de medición comprende obtener una medición de la concentración vírica a partir de la muestra que esté en concordancia con una medición de la concentración vírica a partir de una muestra de plasma. En otro modo de realización, la etapa de medición comprende la cuantificación de partículas víricas. En algunos modos de realización, una técnica de cuantificación de partículas de virus se selecciona del grupo que consiste en cuantificación de ácidos nucleicos específicos para la secuencia, ELISA, PCR, amplificación isotérmica de ácidos nucleicos, hibridación de ácidos nucleicos, hibridación *in situ* y microscopía electrónica. Los expertos en la técnica apreciarán que otras técnicas de cuantificación de partículas de virus pueden ser adecuadas para su uso con los procedimientos descritos en el presente documento.

65

En un modo de realización, los procedimientos descritos en el presente documento son adecuados para medir diversos virus, incluyendo, sin limitación, VIH, HTLV, VHC, VHB, CMV y VEB.

5 Como se describe en el presente documento, el procedimiento de gota de líquido seco de la prueba del VIH-1 CAP/CTM implica la incubación de una muestra de sangre seca con un agente caotrópico (tampón SPEX) para extraer ácido nucleico. Este procedimiento también requiere la incubación de la muestra en el tampón a 56 °C a 1000 rpm con agitación continua durante 10 minutos. En un aspecto, la presente invención proporciona procedimientos de extracción de virus libres de células de una muestra de sangre seca en los que el uso de calentamiento o temperaturas elevadas y mezcla en vórtex o agitación son opcionales o no se requieren. En un modo de realización, los procedimientos descritos en el presente documento se realizan en ausencia de calentamiento o temperatura elevada y/o en ausencia de mezcla en vórtex o agitación. En otro modo de realización, al menos una o todas las etapas de rehidratación, elución, incubación y separación se realizan (i) sin o en ausencia de calentamiento o temperatura elevada; (ii) en ausencia de o sin mezcla en vórtex o agitación; y/o (iii) a temperatura ambiente. El término "temperatura ambiente" se refiere a la temperatura a la cual una muestra de sangre seca se pone en contacto con un tampón de acuerdo con los procedimientos de la presente invención. En general, la temperatura ambiente es la temperatura de un entorno con temperatura controlada. La temperatura ambiente varía de aproximadamente 18 °C a aproximadamente 30 °C. En un modo de realización, la temperatura ambiente es aproximadamente 18 °C, aproximadamente 19 °C, aproximadamente 20 °C, aproximadamente 21 °C, aproximadamente 22 °C, aproximadamente 23 °C, aproximadamente 24 °C, aproximadamente 25 °C, aproximadamente 26 °C, aproximadamente 27 °C, aproximadamente 28 °C, aproximadamente 29 °C o aproximadamente 30 °C.

En otro modo de realización, la DBS que se va a rehidratar comprende sangre entera con EDTA. El EDTA tiene propiedades beneficiosas cuando se usa en muestras de sangre, incluyendo, sin limitación, un conservante, un anticoagulante y/o un antibacteriano. Los expertos en la técnica apreciarán que otros conservantes/anticoagulantes/agentes antibacterianos pueden ser adecuados para su uso en una muestra de sangre y su DBS correspondiente que son objeto de los procedimientos descritos en el presente documento.

Los modos de realización de la divulgación se describirán con más detalle en los siguientes ejemplos.

## 30 EJEMPLOS

Se proporcionan los siguientes ejemplos y figuras para ayudar al entendimiento de la presente invención, cuyo verdadero alcance se expone en las reivindicaciones adjuntas.

### 35 Ejemplo 1

#### Protocolo:

- 40 1. Recolectar muestras de DBS para someterlas a prueba usando procedimientos convencionales, aplicando la gota de sangre en una tarjeta de filtro Whatman 903 y dejándola secar.
2. Recortar la gota de sangre seca de la tarjeta de filtro Whatman y colocarla en un tubo S o una columna de filtro de centrifugado debidamente etiquetados.
- 45 3. Añadir 1000 µl de metanol al 10 % en tampón PBS al tubo que contiene la DBS. Si se añade a una columna de centrifugado, añadir 500 µl de tampón solamente.
4. Colocar el tubo S o la columna de filtro de centrifugado en la incubadora a 56 °C, 1000 rpm, durante 10 minutos.
- 50 a. Si se coloca la DBS directamente en un tubo S, omitir la etapa 4.
5. Centrifugar brevemente las columnas en una microcentrífuga (si se usa el filtro centrífugo VWR de 0,2 µm, centrifugar durante 5-10 minutos a una velocidad máxima de 5000 x g). A continuación, extraer y desechar la columna de centrifugado y añadir 500 µl de tampón al tubo de recolección.
- 55 6. Cargar muestras en COBAS® AmpliPrep e iniciar el protocolo HI2DFSP96.

60 **Materiales:** COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® 96; kit RUO para procedimiento de gota de líquido seco para prueba del VIH-1 COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan®; tarjetas de filtro Whatman 903 (n.º de cat. de Whatman 95026-896); solución de metanol al 10 % en PBS; y filtros centrífugos VWR. n.º de cat. 82031-356, tamaño de poro de 0,2 µm.

65 **Resultados:** El tampón PBS se evaluó con diferentes sales y detergentes, tales como NaCl (3 M), Tween-20 (0,1 %), Triton X-100 (0,1 %), SDS (1 %) y metanol (10 %). SPEX es el control positivo con el que comparar. En los experimentos, el tampón SPEX simplemente se reemplazó por diferentes tampones individuales. Los tubos S que contenían DBS se incubaron a 56 °C durante 10 minutos con agitación. Después de la extracción, se siguió el

5 protocolo de DFSP del VIH-1 CAP/CTM habitual (ver el prospecto para "procedimiento de gota de líquido seco para la prueba del VIH-1 COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan®"). Dado que las concentraciones de virus del VIH aumentaron y las células del VIH en la sangre entera (WB) fueron relativamente bajas (aproximadamente 500 cp/DBS o 7E3 cp/ml, 12 células/DBS o 1,2E3 células/ml) y los valores víricos solo fueron de <400 cp/ml. Por lo tanto, se usaron valores de Ct de la diana para comparar los diferentes tampones en lugar de los valores víricos. Casi todas las QS en esas muestras se comportaron normalmente.

10 Como se muestra en la tabla 1, el PBS con metanol al 10 % pudo eluir las partículas víricas del VIH de la DBS de WB con el virus de manera relativamente eficaz en comparación con el tampón SPEX. El retardo en el Ct con PBS/MeOH se podría deber a las condiciones de extracción y elución deficientes.

**Tabla 1.** Elución de partículas víricas del VIH a partir de DBS (6 réplicas)

	<b>SPEX</b>	<b>PBS/MeOH</b>
Ct promedio	31,8 ± 0,44	34,15 ± 1,64
positiva	3	6
Número de no detectadas	3*	0

15 \* muestras llamadas inválidas basadas en QS

20 Como se muestra en la tabla 2, PBS/MeOH solo pudo eluir algunas trazas detectables del ADN y ARN del VIH asociados a células a partir de la WB enriquecida con células del VIH con Ct retardados en comparación con SPEX. En otras palabras, PBS/MeOH redujo significativamente la elución del ADN y ARN del VIH asociado a células a partir de la DBS enriquecida con células del VIH.

**Tabla 2.** Elución de ADN/ARN del VIH asociado a células (6 réplicas)

	<b>SPEX</b>	<b>PBS/MeOH</b>
Ct promedio	30,5 ± 1,66	35,27 ± 1,81
positiva	6	3
Número de no detectadas	0	3

25 Cuando los virus VIH más las células positivas para el VIH se mezclaron y se añadieron a WB, como se muestra en la tabla 3, SPEX pudo eluir ambos de manera eficaz, mientras que PBS/MeOH solo pudo eluir los virus VIH con Ct similar al del virus VIH solo (tabla 1).

**Tabla 3.** Elución de la mezcla de virus + células (6 réplicas)

	<b>SPEX</b>	<b>PBS/MeOH</b>
Ct promedio	29,58 ± 0,81	33,75 ± 0,99
positiva	6	6
Número de no detectadas	0	0

35 La tabla 4 resume las diferencias de Ct entre la DBS enriquecida con virus y la DBS enriquecida tanto con virus como con células. Claramente, hubo un gran Ct diferente cuando se usó el tampón SPEX debido a la contribución de las células del VIH, mientras que hubo una diferencia de Ct mucho más pequeña cuando se usó el tampón PBS/MeOH, lo que sugiere que PBS/MeOH solo eluye los virus libres de células, independientemente de la presencia de células del VIH en la DBS.

**Tabla 4.**

	<b>SPEX</b>	<b>PBS/MeOH</b>
Virus	31,8	34,15
Mezcla	29,58	33,75
Diferencia de Ct (virus-célula)	2,22	0,4

**Referencias:**

45 Johanson, H.C., V. Hyland, C. Wicking, R.A. Sturm, 2009, DNA elution from buccal cells stored on Whatman FTA Classic Cards using a modified methanol fixation method, BioTechniques Vol. 46 n.º 4.; Médecins Sans Frontières Access Campaign, 2013, Putting HIV treatment to the test: A product guide for viral load and point-of-care CD4 diagnostic tools; 8E5 Cell line Producing Aids Viral Antigens without producing infectious virus particles: n.º de patente 4.752.565; Cultured Viral Particles from SeraCare, Certificate of Analysis (parte n.º: PN-227; n.º de lote: 51884).

Ejemplo 2



**Protocolo:**

1. Recolectar muestras de DBS para someterlas a prueba usando procedimientos convencionales, aplicando la sangre entera con EDTA positiva para el VIH en una tarjeta de filtro Whatman 903 y dejándola secar durante al menos 3 horas. [Las tarjetas de Munktell también funcionan].
2. Recortar la gota de sangre seca de la tarjeta de filtro Whatman y colocarla en un tubo S debidamente etiquetado.
3. Añadir 1000 µl del tampón PBS al tubo que contiene la DBS.
4. Incubar a temperatura ambiente durante al menos 30 minutos.
  - a. Calentar y agitar (opcional).
  - b. Si se desea, el tiempo de incubación se puede aumentar hasta la mañana siguiente.
5. Cargar muestras en COBAS® AmpliPrep e iniciar el protocolo HI2DFSP96.

**Materiales:** COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® 96; kit RUO para procedimiento de gota de líquido seco para prueba del VIH-1 COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan®; tarjetas de filtro Whatman 903; PBS (Mediatech, Inc. y fabricado por Corning Cellgro, n.º de cat. 21-040-CV).

**Resultados:** Las investigaciones sobre el rendimiento del procedimiento usaron muestras de gotas de sangre seca y plasma pareadas de 157 sujetos infectados por el VIH con concentraciones víricas que iban desde indetectables hasta  $>10^5$  copias/ml. El rendimiento del nuevo procedimiento (extracción con PBS) se comparó con el del procedimiento antiguo (extracción con el tampón de guanidinio SPEX). Las concentraciones víricas plasmáticas se usaron como referencia.

Las DBS se hicieron a partir de sangre entera con EDTA. Las concentraciones víricas plasmáticas se midieron con el protocolo del VIH-1 CAP/CTM en plasma v2.0 habitual. La extracción con SPEX siguió el protocolo de DFSP habitual, incluyendo la incubación a 56 °C durante 10 minutos con agitación. La elución con PBS de DBS se realizó en tubos S que contenían 1 ml de PBS a temperatura ambiente, sin agitación. Los tiempos de elución variaron desde 30 minutos hasta la mañana siguiente. Después de la extracción, se siguió la amplificación y detección habitual de la diana con el protocolo de DFSP del VIH-1 CAP/CTM (véase el prospecto del envase para "procedimiento de gota de líquido seco para la prueba del VIH-1 COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan®").

Como se muestra en la FIGURA 4, el procedimiento DFSP dio como resultado una sobrecuantificación de muestras con bajas concentraciones víricas plasmáticas. Por el contrario, el procedimiento de elución de virus libre mostró mucha menos sobrecuantificación en este intervalo. El procedimiento de elución de virus libre dio como resultado una subcuantificación sistemática en todo el intervalo de prueba de aproximadamente  $0,6 \log_{10}$ . Parte de esta subcuantificación,  $0,3 \log_{10}$ , se puede explicar por el hecho de que la sangre entera es solo un 50 % de plasma, y el archivo de definición de la prueba que se está usando no tiene en cuenta este factor.

Como se muestra en la FIGURA 5, la correlación mejorada de la elución de PBS con la concentración vírica plasmática también dio como resultado una mejor concordancia clínica. Esto es especialmente notable después de aplicar un factor de corrección de  $0,6 \log$ .

**Ejemplo 3**

Las gotas de sangre seca (DBS) mejoran el acceso a la prueba de determinación de la concentración vírica del VIH, pero producen resultados diferentes a los del plasma debido al ácido nucleico vírico asociado a células. Se realizaron los siguientes experimentos para evaluar un procedimiento de elución de virus libre (FVE) para la elución preferencial del virus asociado a plasma a partir de muestras de DBS con solución salina tamponada con fosfato.

**PROCEDIMIENTOS:** Para el procedimiento con gota de líquido seco (DFSP) convencional de COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® (CAP/CTM), se extrajeron DBS con un tampón de preextracción de muestras a base de guanidinio (SPEX) de acuerdo con las instrucciones del prospecto del envase (Roche Molecular Systems. Prospecto del envase RUO para procedimiento de gota de líquido seco para prueba del VIH-1 COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan®. Roche Molecular Systems, Pleasanton, CA, EE. UU.). Para el protocolo de elución de virus libre (FVE), se incubó cada DBS en 1 ml de solución salina tamponada con fosfato libre de calcio y magnesio (PBS, NaCl 154 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  5,6 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,1 mM, pH 7,4; Corning) en un tubo de muestra S de COBAS® a temperatura ambiente durante  $>30$  min sin agitación. A continuación, el eluido con PBS se procesó directamente en el tubo S (sin retirar el papel de la DBS) con el flujo de trabajo normal de la prueba del VIH-1 TaqMan v2.0, usando el programa informático del archivo de definición de la prueba de determinación con gota de líquido seco (DFSP) (*Id.*).

El modo de acción de FVE se exploró usando un sistema modelo de DBS para someter a prueba la sangre negativa para VIH enriquecida con (i) virus purificado 8E5; (ii) ARN purificado de virus 8E5; o (iii) células lavadas que contienen VIH de la línea celular 8E5 (Folks TM, *et al.* 1986, Biological and biochemical characterization of a cloned Leu-3-cell surviving infection with the acquired immune deficiency syndrome retrovirus, J Exp Med. **164**:280-290). Finalmente, los estudios de rendimiento clínico usaron muestras de DBS y plasma pareadas de 196 pacientes infectados por el VIH (con y sin tratamiento antirretrovírico). Los resultados de CV de muestras clínicas procesadas con el procedimiento FVE se compararon con los resultados del protocolo de DFSP, midiéndose las CV plasmáticas con la prueba del VIH-1 CAP/CTM v2.0 como procedimiento de referencia. Tanto para FVE como para DFSP, el ensayo corrige la diferencia de volumen entre una muestra de DBS y una de plasma. Se añadió +0,3 log adicionales a todos los resultados de FVE por el siguiente motivo. Se cree que FVE eluye solo la fracción plasmática de la sangre, que representa aproximadamente un 50 % de una muestra de sangre entera.

**RESULTADOS:** Los experimentos con muestras enriquecidas encontraron que, en comparación con SPEX (que esencialmente eluye a todos los ácidos nucleicos víricos libres de células y asociados a células), la elución en PBS a partir de DBS es aproximadamente 5 veces más selectiva para virus libre de células que los ácidos nucleicos del VIH asociados a células. Usando la elución con PBS, se observó una elución uniforme y cuantitativa, definida como una diferencia de menos de 0,3 log entre las mediciones, con muestras repetidas en un intervalo de tiempos y temperaturas de incubación. Con tiempos de incubación de 0,5, 2 y 12 horas a 23 °C, se midieron concentraciones víricas de 3,10, 3,14 y 3,11 log cp/ml CV, respectivamente. Comparando incubaciones de 0,5 horas a temperaturas de 23, 56 y 70 °C, se midieron las concentraciones víricas de 3,38, 3,34 y 3,20 log cp/ml CV, respectivamente.

Como PBS no confiere la inactivación de RNasa que proporcionan los tampones caotrópicos de guanidinio, se evaluó la estabilidad de la muestra en presencia de altos niveles de RNasa exógena. El eluido de una muestra clínica de DBS positiva para VIH fue resistente a la degradación, con un ciclo de cuantificación (Cq) de 31,2 sin RNasa y un valor de Cq de 32,9 con RNasa. El eluido de una muestra de DBS negativa para VIH enriquecida con virus completo también fue resistente a la degradación, con un Cq de 27,4 sin RNasa y un Cq de 27,1 con RNasa. En cambio, el eluido de una muestra de DBS negativa para VIH enriquecida con ARN vírico natural mostró un Cq de 22,4 sin RNasa y un Cq de 34,2 con RNasa.

Una evaluación clínica del procedimiento usó muestras de DBS y plasma pareadas de 196 pacientes con VIH, tanto con como sin tratamiento antirretrovírico, con CV plasmáticas que iban desde indetectables hasta 10<sup>6</sup> copias/ml. Usando la concentración vírica plasmática como procedimiento de referencia, el procedimiento de elución con PBS redujo la sobrecuantificación de la CV a partir de DBS en comparación con el protocolo de DFSP (figura 6).

La figura 6 muestra un gráfico de sesgos que compara los procedimientos de concentración vírica en DBS con la concentración vírica plasmática como procedimiento de referencia. Los símbolos indican la elución con PBS (•) y SPEX (guanidinio) (Δ). Los valores de PBS se ajustaron con un factor de corrección del volumen de +0,3 log. En comparación con el plasma, PBS tuvo una diferencia media de -0,31 log<sub>10</sub> copias/ml y una desviación estándar de 0,72 log<sub>10</sub> copias/ml, mientras que SPEX tuvo una diferencia media de +0,94 log<sub>10</sub> copias/ml y una desviación estándar de 1,07 log<sub>10</sub> copias/ml.

Con la extracción convencional con SPEX de guanidinio de DBS, la concordancia entre DBS y plasma a un punto de decisión médica de 1000 cp/ml fue solo de un 67 % debido a la sobrecuantificación de concentraciones víricas que clasificaron erróneamente a un 69 % de los pacientes con concentraciones víricas plasmáticas por debajo de 1000 cp/ml como fracasos de tratamiento (véanse la tabla 3.1 y la figura 7).

Tabla 3.1 - Rendimiento del protocolo de DFSP a 1000 cp/ml

Plasma				
		<1000 cp/ml	>1000 cp/ml	
DFSP	<1000 cp/ml	29	0	29
	>1000 cp/ml	64	103	167
		93	103	196

La extracción con SPEX se realizó con una sensibilidad de un 100 % y una especificidad de un 31 %, con un VPP de un 62 % y un VPN de un 100 % para el fracaso virológico como se define por la concentración vírica plasmática.

La figura 7 muestra la correlación y la concordancia de las mediciones de concentración vírica a partir de DBS con plasma. Los símbolos indican la elución con PBS (•) y SPEX (guanidinio) (Δ). Los valores de PBS se ajustaron con un factor de corrección del volumen de +0,3 log. Las áreas sombreadas indican a los pacientes que potencialmente se clasificarían erróneamente por DBS, usando una concentración vírica límite de 1000 cp/ml para indicar el fracaso del tratamiento.

Con la elución con PBS, todos los pacientes suprimidos se clasificaron correctamente, aunque un 10 % de los pacientes con concentraciones víricas superiores a 1000 cp/ml ahora se clasificaron como éxitos de tratamiento (véase la tabla 3.2).

- 5 Tabla 3.2 - Rendimiento de FVE después de la corrección por volumen (+0,3 log cp/ml desde DBS con 50 % de plasma)

Plasma				
		<1000 cp/ml	>1000 cp/ml	
FVE	<1000 cp/ml	93	10	103
	>1000 cp/ml	0	93	93
		93	103	196

- 10 La concordancia global de DBS con plasma mejoró significativamente a un 95 % ( $p < 0,05$ , prueba z bilateral). La elución con PBS se realizó con una sensibilidad de un 90 % y una especificidad de un 100 %, con un VPP de un 100 % y un VPN de un 90 % para el fracaso virológico como se define por la concentración vírica plasmática.

- 15 La elución de DBS con VIH en PBS redujo significativamente la sobrecuantificación de la CV del VIH en DBS con respecto al plasma, en comparación con el protocolo convencional de extracción con guanidinio. Esta elución se puede ejecutar sin etapas o equipos de transferencia de líquidos adicionales. Sin estar limitado por ninguna teoría, los experimentos con sistemas modelo sugieren que el procedimiento funciona al eludir selectivamente el componente de virus libre de la muestra, mientras que los ácidos nucleicos del VIH asociados a células se conservan en el papel. La adición de RNasa A al PBS no modificó la cuantificación del virus, lo que sugiere que la plantilla de ARN eluida por PBS puede estar encapsulada dentro de estructuras víricas protectoras. El protocolo FVE mejoró el porcentaje de acuerdo global para el fracaso virológico, como se define por una CV plasmática >1000 cp/ml, de un 67 % a un 95 %, y demostró una sensibilidad de un 90 % y una especificidad de un 100 % para el fracaso virológico. El uso de una etapa de elución con PBS para separar el virus libre del material celular redujo significativamente la sobrecuantificación de la CV del VIH en DBS.
- 20

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento para medir partículas de virus de ARN libres de células a partir de gotas de sangre seca, que comprende:
  - 5 rehidratar una muestra de sangre seca aplicando una solución tampón a la muestra de sangre seca para producir una muestra de sangre seca rehidratada;
  - 10 opcionalmente fijar células presentes en la muestra de sangre seca rehidratada con un reactivo de fijación para contener ARN y/o ADN asociados a células con las células;
  - 15 eluir dichas partículas de virus libres de células de la muestra de sangre seca rehidratada con un reactivo de elución que comprende solución salina tamponada con fosfato (PBS) que eluye preferentemente dichas partículas de virus libres de células sin alterar el ARN y/o ADN asociados a células;
  - 20 separar los virus de ARN libres de células de cualquier residuo celular que pueda estar presente en la muestra de sangre seca rehidratada por medio de un filtro; y
  - medir partículas de virus de ARN libres de células mediante una técnica de cuantificación de partículas víricas, en la que el virus de ARN se selecciona del grupo que consiste en VIH y HTLV.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la técnica de cuantificación de partículas de virus se selecciona del grupo que consiste en cuantificación de ácidos nucleicos específicos para la secuencia, ELISA, PCR, amplificación isotérmica de ácidos nucleicos, hibridación de ácidos nucleicos, hibridación *in situ* y microscopía electrónica.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el reactivo de fijación se selecciona del grupo que consiste en metanol, etanol, formaldehído, cloroformo y acetona.
4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la etapa de separación comprende la filtración de columna de centrifugado por centrifugación o vacío.
5. El procedimiento de la reivindicación 1 o 4, en el que el filtro comprende un intervalo de tamaño de poro entre aproximadamente 0,1  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 100  $\mu\text{m}$ .
6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la solución tampón comprende el reactivo de fijación y el reactivo de elución.
7. El procedimiento de la reivindicación 1 o 6, en el que el reactivo de fijación comprende metanol y el reactivo de elución comprende PBS.
8. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la solución tampón comprende el reactivo de elución.
9. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 - 8, en el que el procedimiento se realiza a temperatura ambiente.
10. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 - 9, en el que el procedimiento se realiza en ausencia de mezcla en vórtex o agitación.

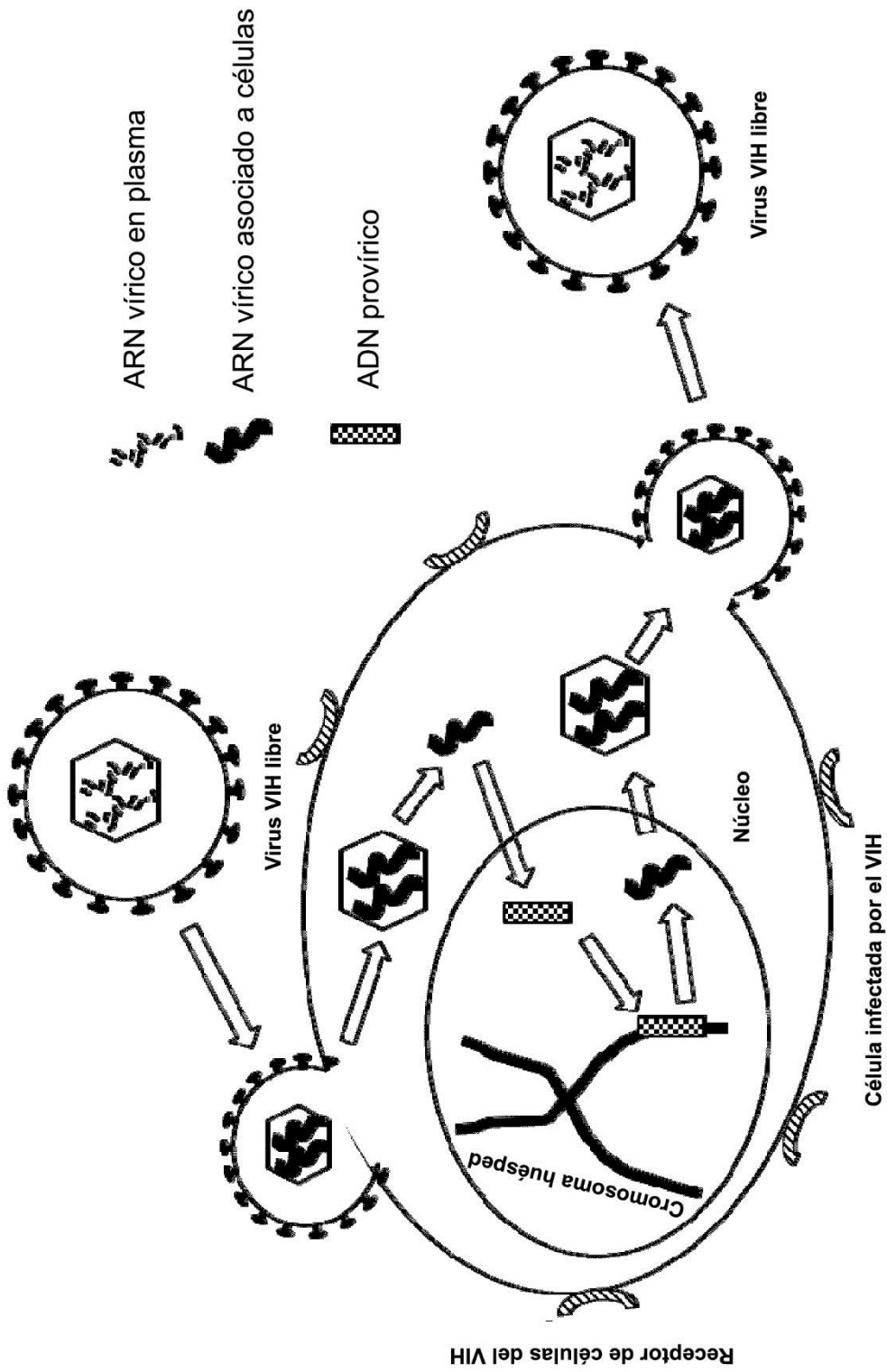


Fig. 1

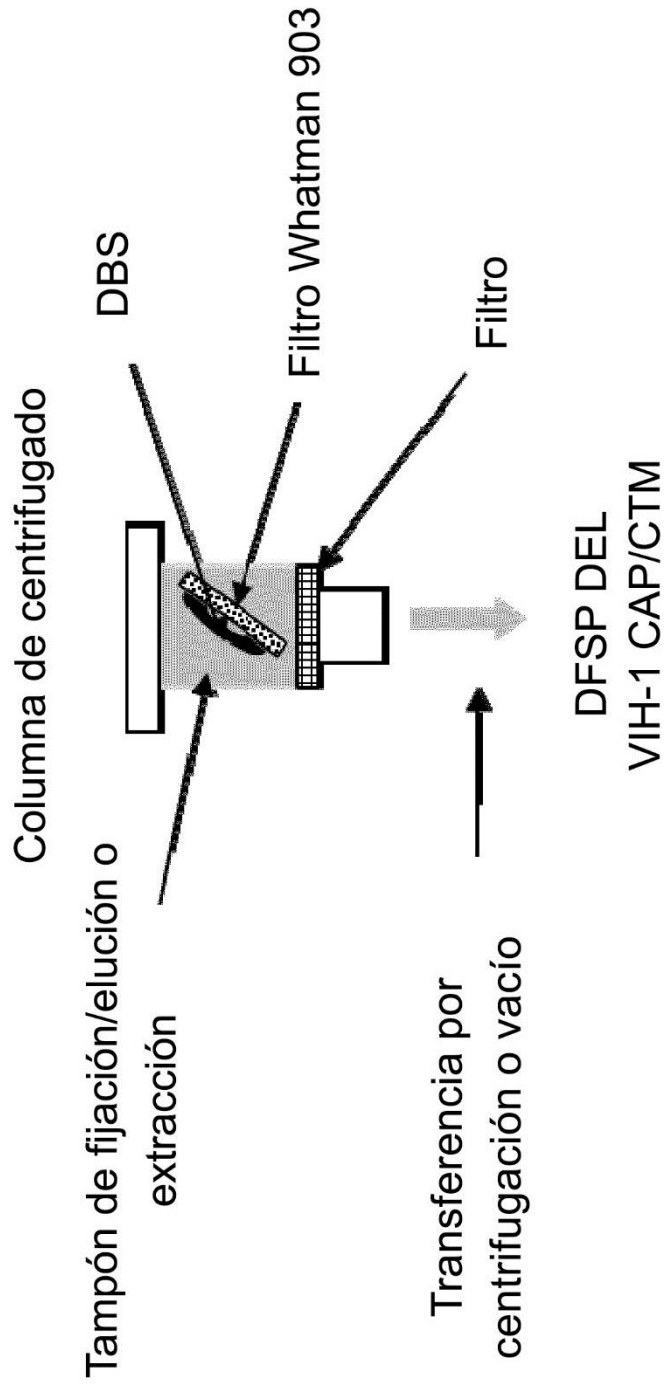


Fig. 2

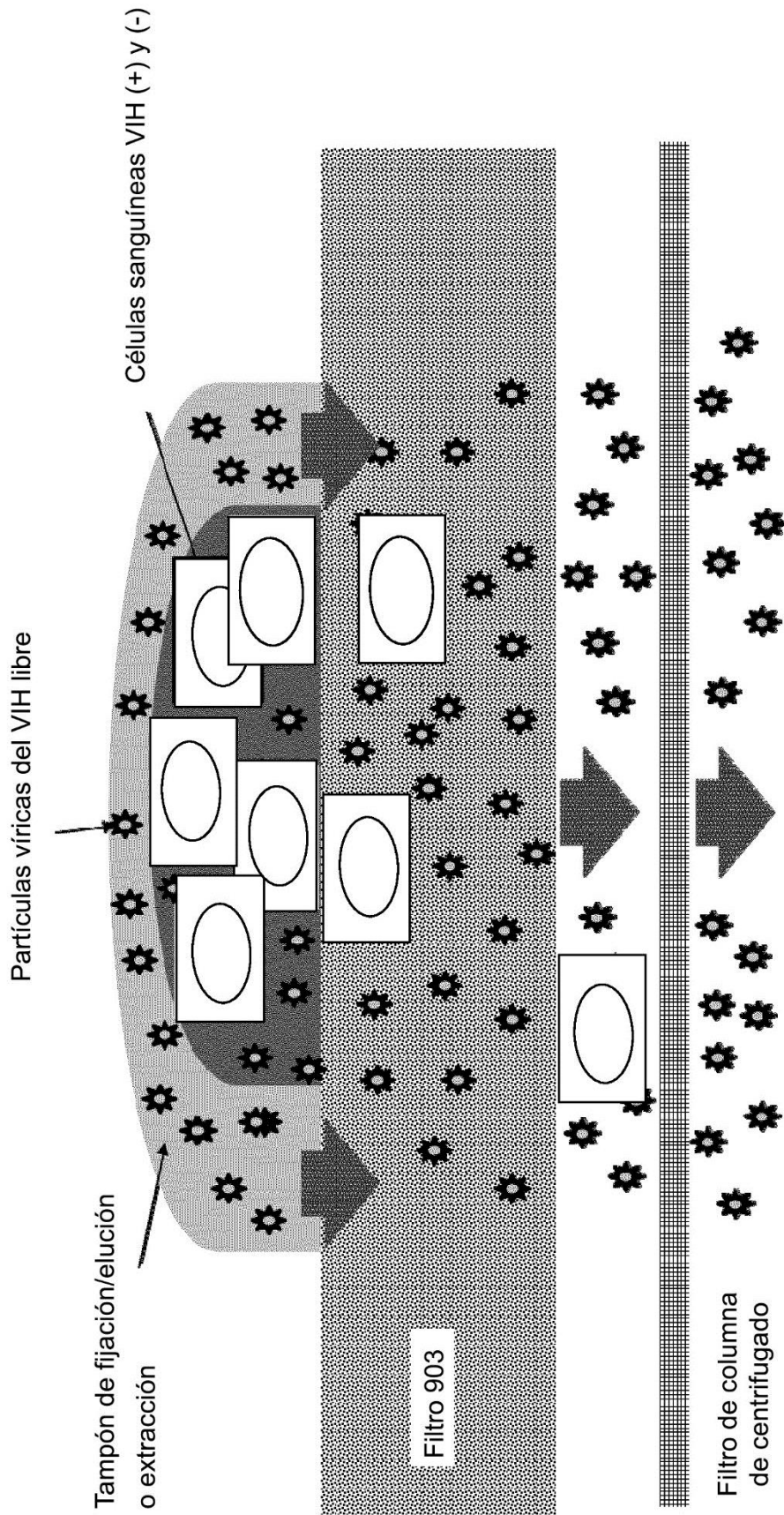


Fig. 3

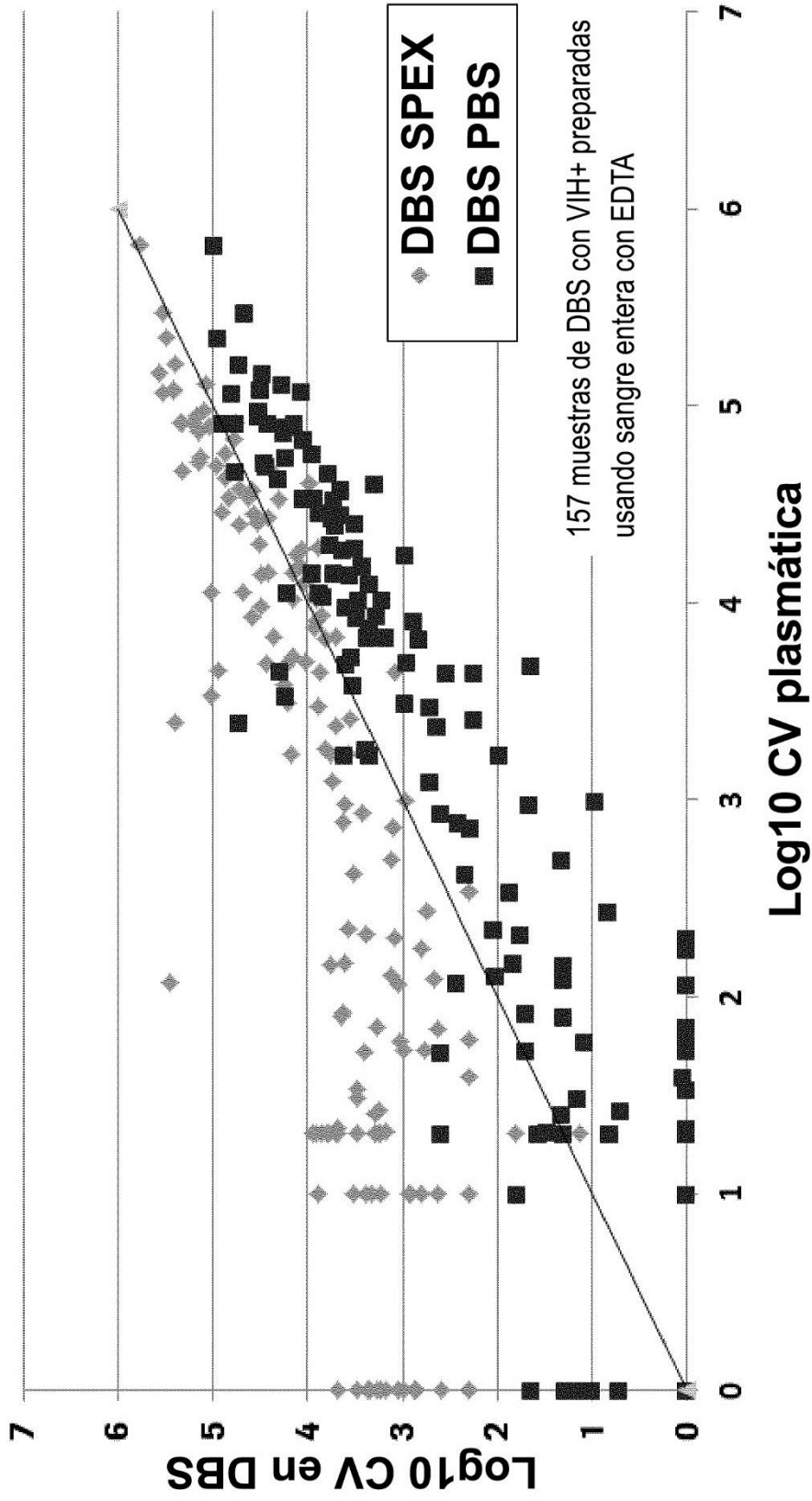


Fig. 4



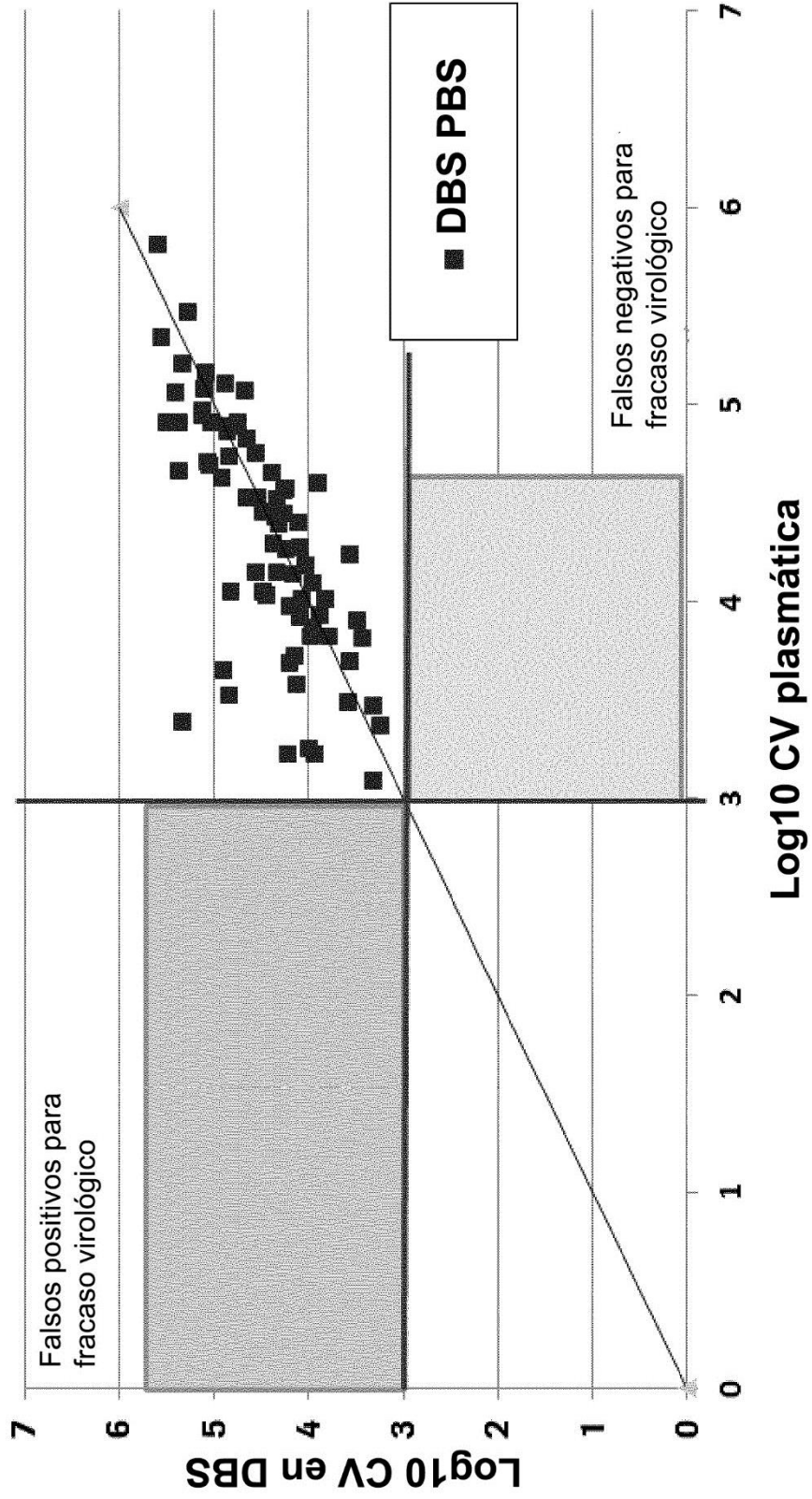


Fig. 5

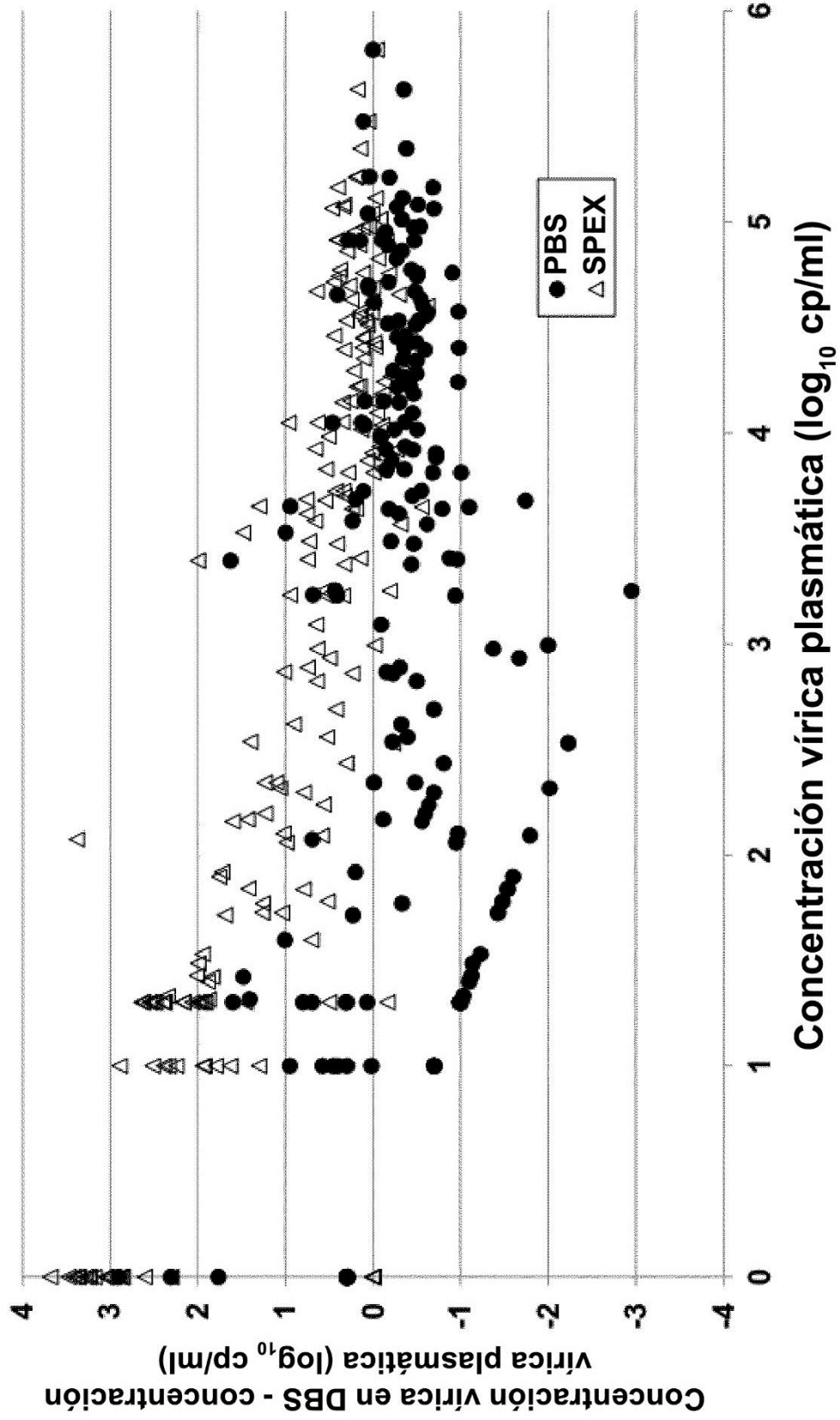


Fig. 6

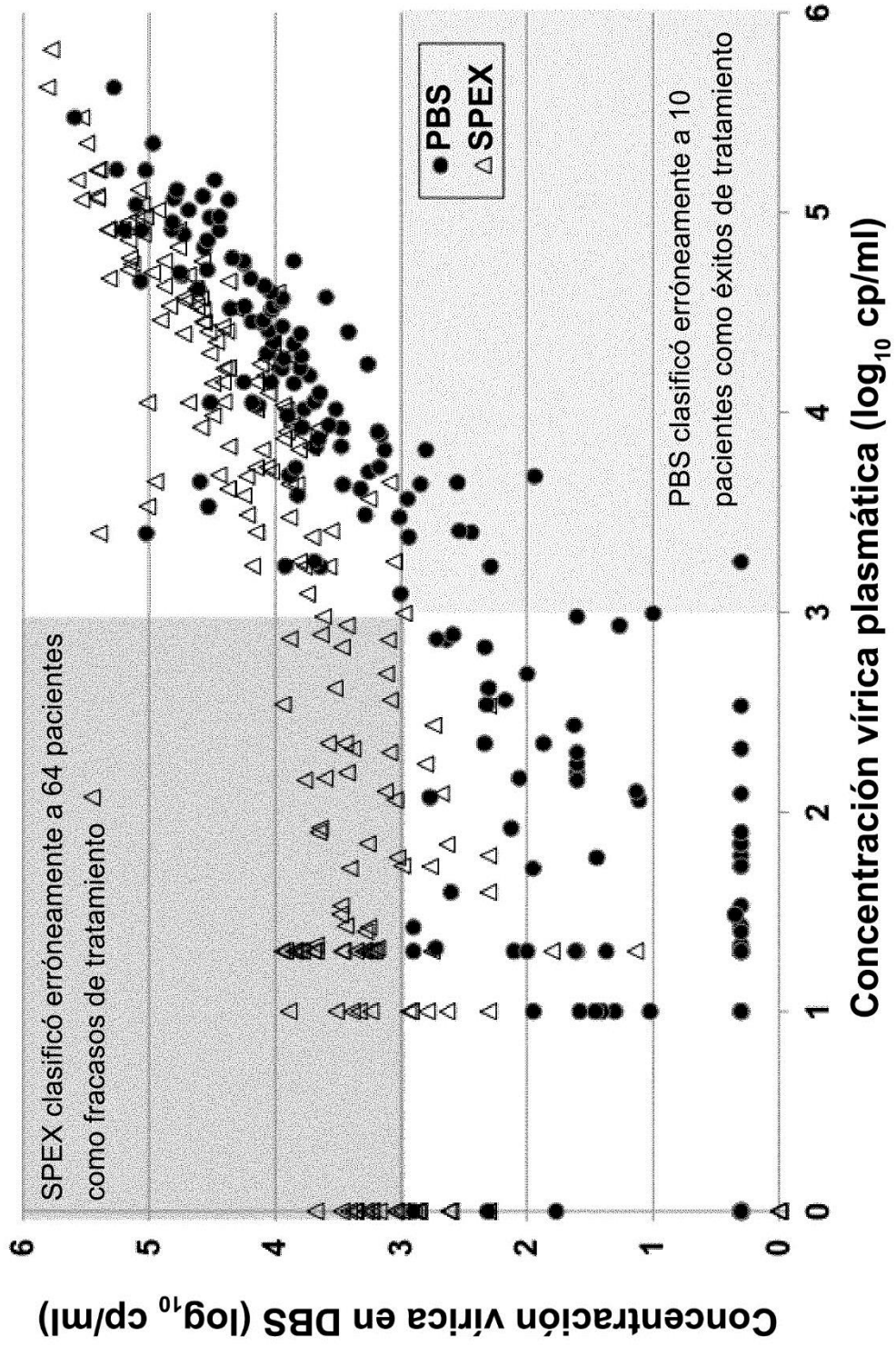


Fig. 7