

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 797 726**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/6806** (2008.01)

**C12Q 1/686** (2008.01)

**C12Q 1/70** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.07.2015 PCT/US2015/039683**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.01.2016 WO16007709**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.07.2015 E 15819649 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.04.2020 EP 3167294**

54 Título: **Procedimiento de prueba de la carga viral del VIH-1 automatizada para gotas secas**

30 Prioridad:

**11.07.2014 US 201462023458 P**

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

**03.12.2020**

73 Titular/es:

**ABBOTT MOLECULAR INC. (100.0%)  
1300 East Touhy Avenue  
Des Plaines, IL 60018, US**

72 Inventor/es:

**HUANG, SHIHAI, X.;  
DUNN, CHAD;  
SALITURO, JOHN y  
ERICKSON, BRIAN**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

ES 2 797 726 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

Procedimiento de prueba de la carga viral del VIH-1 automatizada para gotas secas

5 **Antecedentes**

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es el agente etiológico del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). (Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983, 220:868-71; Popovic M, Sarngadharan MG, Read E, et al. Detection, isolation and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-I) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* 1984, 224:497-500; Gallo RC, Salahuddin SZ, Popovic M, et al. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-I) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* 1984, 224:500-3). Puede transmitirse mediante contacto sexual, exposición a sangre o hemoderivados infectados o de una madre infectada hacia el feto. (Curran JW, Jaffe HW, Hardy AM, et al. Epidemiology of HIV infection and AIDS in the United States. *Science* 1988, 239:610-16). El síndrome agudo del VIH, caracterizado por síntomas pseudogripales, se desarrolla entre 3 y 5 semanas después de la infección inicial y está asociado con altos niveles de viremia. (Daar ES, Moudgil T, Meyer RD, Ho DD. Transient high levels of viremia in patients with primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *New Engl J Med* 1991, 324:961-4; Clark SJ, Saag MS, Decker WD. High titers of cytopathic virus in plasma of patients with symptomatic primary HIV-1 infection. *New Engl J Med* 1991, 324:954-60). De 4 a 6 semanas después de la presentación de los síntomas, se puede detectar la respuesta inmunitaria específica contra el VIH. (Albert J, Abrahamsson B, Nagy K, et al. Rapid development of isolate-specific neutralizing antibodies after primary HIV-1 infection and consequent emergence of virus variants which resist neutralization by autologous sera. *AIDS* 1990, 4:107-12; Horsburgh CR Jr, Ou CY, Jason J, et al. Duration of human immunodeficiency virus infection before detection of antibody. *Lancet* 1989, 334:637-40). Tras la seroconversión, la carga viral en la sangre periférica disminuye y la mayoría de los pacientes entran en una fase asintomática que puede durar varios años. (Pantaleo G, Graziosi C, Fauci AS. New concepts in the immunopathogenesis of human immunodeficiency virus (HIV) infection. *New Engl J Med* 1993, 328:327-35). Quantitative measurement of HIV levels in peripheral blood has greatly contributed to the understanding of the pathogenesis of HIV infection (Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, et al. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* 1995, 373:123-6; Wei X, Ghosh SK, Taylor ME, et al. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature* 1995, 373:117-22) and has been shown to be an essential parameter in prognosis and management of HIV infected individuals. (Mellors JW, Rinaldo CR JR, Gupta P, et al. Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science* 1996, 272:1167-70; Mellors JW, Munoz A, Giorgi JV, et al. Plasma viral load and CD4+ lymphocytes as prognostic markers of HIV-1 infection. *Ann Intern Med* 1997, 126(12):946-54; Chene G, Sterne JA, May M, et al. Prognostic importance of initial response in HIV-1 infected patients starting potent antiretroviral therapy: analysis of prospective studies. *Lancet* 2003, 362:679-86; Egger M, May M, Chene G, et al. Prognosis of HIV-1 infected drug patients starting highly active antiretroviral therapy: a collaborative analysis of prospective studies. *Lancet* 2002, 360:119-29; Wood E, Hogg RS, Yip B, et al. Higher baseline levels of plasma human immunodeficiency virus type 1 RNA are associated with increased mortality after initiation of triple-drug antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 2003, 188:1421-5; Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos. 2004 Directrices para el uso de agentes antirretrovirales en adultos y adolescentes infectados por el VIH-1. Disponible en Internet en: [AIDSinfo.nih.gov/guidelines](http://AIDSinfo.nih.gov/guidelines)). Las decisiones relativas al inicio o cambios en la terapia antirretroviral vienen determinadas por el control de los niveles de ARN del VIH (carga viral) en plasma, el recuento de linfocitos T CD4+ y el estado clínico del paciente. (Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos. 2004 Directrices para el uso de agentes antirretrovirales en adultos y adolescentes infectados por el VIH-1. Disponible en Internet en: [AIDSinfo.nih.gov/guidelines](http://AIDSinfo.nih.gov/guidelines); Yeni PG, Hammer SM, Hirsch MS, et al. Treatment for Adult HIV Infection. 2004 Recommendations of the International AIDS Society-USA Panel. *JAMA* 2004, 292:251-65). El objetivo del tratamiento antirretroviral es reducir el virus VIH en plasma hasta niveles por debajo de lo detectable de las pruebas de carga viral disponibles. (Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos. 2004 Directrices para el uso de agentes antirretrovirales en adultos y adolescentes infectados por el VIH-1. Disponible en Internet en: [AIDSinfo.nih.gov/guidelines](http://AIDSinfo.nih.gov/guidelines); AS, Essunger P, Cao Y, et al. Decay characteristics of HIV-1 infected compartments during combination therapy. *Nature* 1997, 387(6629):188-91). HIV RNA levels in plasma can be quantitated by prior art procedures by nucleic acid amplification or signal amplification technologies. (Mulder J, McKinney N, Christopher C, et al. Rapid and simple PCR assay for quantitation of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma: application to acute retroviral infection. *J Clin Microbiol* 1994, 32:292-300; Dewar RL, Highbarger HC, Sarmiento MD, et al. Application of branched DNA signal amplification to monitor human immunodeficiency virus type 1 burden in human plasma. *J Inf Diseases* 1994, 170:1172-9; Van Gemen B, Kievits T, Schukink R, et al. Quantification of HIV-1 RNA in plasma using NASBA™ during HIV-1 primary infection. *J Virol Methods* 1993, 43:177-87).

60 **Sumario de la invención**

La medición cuantitativa de los niveles de VIH-1 en la sangre periférica es un parámetro esencial para determinar el pronóstico de la enfermedad y el ciclo del tratamiento antirretroviral para los pacientes infectados. Debido a la estabilidad limitada del ARN viral, las pruebas convencionales de carga viral (CV) del VIH-1 en plasma imponen requisitos restrictivos para la recogida, manipulación y transporte de muestras, lo cual puede dificultar la expansión de las pruebas de CV en entornos de recursos limitados. Las gotas secas (GS), incluyendo las gotas de sangre seca

(GSS), representan una opción factible que supera estas limitaciones logísticas y técnicas. Otras GS además de las GSS pueden ser de, por ejemplo, plasma, saliva, suero, etc. Esta invención proporciona métodos y procedimientos novedosos y no obvios de un ensayo nuevo de la CV del VIH-1 en GS/GSS.

5 El desarrollo de ensayos de GSS para la cuantificación del ARN del VIH-1 y del ADN proviral (un genoma viral, o parte del mismo, que se incorpora en el ADN de una célula hospedadora) se encuentra en sus inicios. Los ensayos desarrollados en la técnica hasta ahora tienen muchas desventajas relacionadas con el costo y la eficiencia. Por ejemplo, muchos de los procedimientos actuales requieren la transferencia manual de eluatos de GS o GSS para los procedimientos de extracción del ácido nucleico, lo cual representa una oportunidad para que ocurra un error o  
10 contaminación en el ensayo. Si se desea o requiere un tratamiento con ADNasa en los ensayos de la técnica anterior, los procedimientos a menudo implican el uso de reactivos adicionales (tampones de reacción específicos de ADNasa y tampones de desactivación), equipo (dispositivos de calentamiento), tiempo (para que se completen las etapas del procedimiento de la ADNasa) y manipulación manual adicional.

15 El procedimiento de la presente invención reduce y elimina estas desventajas de la técnica anterior. El ensayo de CV del VIH-1 en GS/GSS de la presente invención utiliza un flujo de trabajo novedoso y un sistema de tampones de elución/reacción innovador. Estas mejoras en comparación con la técnica anterior tienen como resultado un ensayo que puede ser casi completamente automatizado con una precisión y eficiencia mayores, en comparación con la técnica anterior. Además, estas mejoras en comparación con la técnica anterior permiten el uso de ADNasa sin el  
20 tiempo añadido y la incomodidad inherente a los procedimientos de la técnica anterior donde se utiliza ADNasa.

La presente invención contempla un método automatizado para detectar ácidos nucleicos del VIH-1 en una muestra de sangre, comprendiendo el método: a) proporcionar: i) una muestra de sangre que se sospecha infectada con VIH  
25 secada en un soporte sólido, ii) un tampón de elución, iii) un instrumento de preparación de las muestras automatizado, programable, iv) un instrumento de PCR automatizado, programable, v) ADNasa y vi) reactivos de PCR adecuados para la detección de ácidos nucleicos del VIH-1; b) eluir la muestra de sangre del soporte sólido con el tampón de elución para crear una muestra eluida; c) cargar automáticamente la muestra eluida en el instrumento de preparación de las muestras automatizado, programable para la extracción y purificación posterior de ácidos nucleicos para crear una muestra procesada; d) cargar los reactivos de PCR en el instrumento de PCR  
30 automatizado, programable; e) iniciar un programa automatizado para dispensar alícuotas de los reactivos de PCR en la muestra procesada; f) llevar a cabo la PCR en los ácidos nucleicos extraídos en la muestra procesada con el instrumento de PCR automatizado, programable; g) analizar los resultados de la PCR generados por el instrumento de PCR automatizado, programable para determinar si alguna muestra comprende ácidos nucleicos del VIH-1; h) en donde, dicho tampón de elución comprende aproximadamente GITC 3,5 M, aproximadamente Tween® 20 5 %  
35 (nombre comercial del polisorbato 20; también denominado monolaurato de polioxietileno (20) sorbitano), aproximadamente KOAc (acetato de potasio) 50 mM a aproximadamente pH 6,0; i) en donde, opcionalmente, la ADNasa se añade a una o más de las muestras procesadas, los reactivos de PCR, o la reacción de PCR completa después de la adición de los reactivos de PCR a la muestra procesada.

40 La invención además contempla que el método adicionalmente incluya controles negativos y positivos.

La invención además contempla que la etapa b) sea de alrededor de 20 minutos a temperatura ambiente con mezclado intermitente suave o a 55 grados C durante 30 minutos con mezclado intermitente suave.

45 La invención además contempla que el procedimiento automatizado se programe mediante comandos de software.

La invención además contempla que la etapa i) se lleve a cabo y que dicha ADNasa no requiera tampones de reacción específicos de ADNasa, sea efectiva a temperatura ambiente o a las temperaturas utilizadas durante las etapas cíclicas de la PCR, degrade eficazmente el ADN en el periodo de tiempo de 30 minutos, no necesite  
50 inactivarse después de degradar eficazmente el ADN y no impacte negativamente en la detección de secuencias de ARN.

La invención además contempla que el soporte sólido sea papel de filtro.

55 La invención además contempla que el ácido nucleico sea ARN.

La invención además contempla que el ácido nucleico sea ADN proviral.

### Breve descripción de las figuras

60 La Figura 1 muestra ADNasa (Ambion DNase I (libre de ARNasa) (N.º Cat. AM2222) o equivalente) que elimina ADN de manera efectiva y no impacta negativamente en las señales de ARN. La ADNasa se utilizó para tratar directamente ácidos nucleicos extraídos antes de llevar a cabo una reacción de PCR.

65 La Figura 2 muestra ADNasa (New England Biolabs Dnase I (libre de ARNasa) (N.º Cat. MO303S) o equivalente) que no elimina ADN de manera efectiva y no impacta negativamente en las señales de ARN. La ADNasa se

utilizó para tratar directamente ácidos nucleicos extraídos antes de llevar a cabo una reacción de PCR.

La Figura 3 muestra ADNasa (Sigma Aldrich DNase 1 (calidad amplificación) (N.º Cat. AMPD1) o equivalente) que elimina ADN de manera efectiva e impacta negativamente en las señales de ARN. La ADNasa se utilizó para tratar directamente ácidos nucleicos extraídos antes de llevar a cabo una reacción de PCR.

La Figura 4 muestra ADNasa (Promega RQ1 RNase-Free DNase) (N.º Cat. M6101) o equivalente) que elimina ADN de manera efectiva y no impacta negativamente en las señales de ARN. La ADNasa se utilizó para tratar directamente ácidos nucleicos extraídos antes de llevar a cabo una reacción de PCR.

La Figura 5 muestra una comparación de las condiciones de elución de las GSS de 55 °C durante 30 minutos frente a temperatura ambiente durante 20 minutos a 1000 copias/ml del VIH-1. Se utilizaron setenta y un replicados por condición. El umbral de ciclo (Ct) a 55 °C durante 30 min fue anterior al Ct a temperatura ambiente durante 20 minutos. La relación máxima (MR; una medición de la fuerza de la señal) a 55 °C durante 30 minutos fue mayor que la MR a temperatura ambiente durante 20 minutos.

La figura 6 muestra la elución de la GSS a temperaturas que van de 52 a 65 °C de 25 a 45 minutos. Mientras que los valores de Ct fueron comparables en todas las condiciones, la condición con el valor de MR más alto fue 55 °C durante 30 minutos.

La Figura 7 muestra la elución de la GSS a 55 °C durante 10, 20 y 30 minutos. Al aumentar el tiempo de elución, se observó una tendencia a mejorar el Ct y aumentar la MR aunque las diferencias entre cada punto temporal no fueron significativas. Después de la incubación a 55 °C durante 30 minutos, una incubación extra a temperatura ambiente hasta 24 horas no afectó a los resultados de la PCR.

### Descripción detallada de la invención

Hasta la fecha, las pruebas en muestras de plasma es el método de referencia para la evaluación de la carga viral (CV) en individuos infectados con VIH en el tratamiento antirretroviral (TAR). En escenarios con recursos limitados, el uso de gotas de sangre seca (GSS) es un tipo prometedor de tipos de muestra alternativa para las pruebas de CV y genotipificación. El método de la GSS junto con un procesamiento de las muestras automatizado y sistemas basados en PCR en tiempo real, permitirían realizar una medición de la CV o la genotipificación en laboratorios centrales.

Para adaptar los ensayos de carga viral del VIH a la GSS, los aspectos técnicos más importantes son la sensibilidad y la especificidad del ensayo. La sensibilidad clínica y la especificidad del ensayo de la carga viral de GSS se definen mediante el uso de un umbral de 1000 copias/ml en las directrices de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de 2013 para el tratamiento antirretroviral. La proporción de pacientes con CV en plasma <1000 copias/ml durante 12 meses o más después del inicio del TAR es un resultado clave como parte de las evaluaciones de resistencia a los fármacos adquirida. Los pacientes con CV por debajo de este nivel se categorizan como pacientes con éxito del tratamiento farmacológico (Parkin, 2014 AIDS Rev.)

La especificidad del ensayo se refiere al aislamiento/amplificación del ARN libre de células frente al ADN o ARN asociado a células. Si un ensayo recoge tanto el ARN libre de células como el ADN o ARN asociado a células, se observará una sobrecuantificación significativa a concentraciones bajas de CV en plasma, ya que el ADN celular es la fuente predominante de ácido nucleico derivado de virus no plasmático en gotas de sangre seca. (Parkin, 2014 AIDS Rev.). El sistema Abbott RealTime HIV-1 m2000 incorpora reactivos y métodos que son específicos o al menos selectivos para el ARN (Parkin, 2014 AIDS Rev.). También se ha descrito una correlación aceptable entre las cargas virales en plasma y las muestras de GSS usando el ensayo Abbott RealTime HIV-1 (Marconi, A., et al., 2009 Clin Microbiol Infect; Arredondo et al., 2012 J Clin Micro).

La sensibilidad del ensayo se representa normalmente mediante el límite de detección (LOD) del ensayo. La principal dificultad en cuanto a la sensibilidad de la GSS es que las limitaciones de volumen restringen los números de copias de entrada (revisado por Nell T. Parkin, 2014). Se desarrolló una versión modificada del ensayo Abbott RealTime HIV-1 DBS (ensayo Abbott RealTime HIV-1 DBS en modo abierto), el cual implica el uso de una muestra de GSS perforada de 70 µl que no requiere escisión. Además, no se requiere transferencia de la muestra entre tubos. Una GSS se eluye en 1300 µl de tampón, usándose 1000 µl como entrada para el procesamiento. Por lo tanto, la cantidad real de sangre completa que se transfiere para la extracción es de aproximadamente 53,8 µl. Una tasa de recuperación de la elución de la GSS determinada experimentalmente (en comparación con el plasma) utilizando la condición de elución a temperatura ambiente actual (indicada en el protocolo en modo abierto de GSS inicial) variaba del 24 % al 43 % (en comparación con el plasma), con un promedio del 35 %, lo que conduce a un intervalo del LOD calculado de 1080 copias/ml a 1934 copias/ml. (En estos experimentos, tanto la sangre completa como el plasma se enriquecieron con la misma concentración del VIH; no se incluyó el efecto del hematocrito). Dado que el umbral propuesto por la OMS para la determinación con éxito de un tratamiento TAR es una CV de ≤ 1000 copias/ml (Consideraciones técnicas y operativas para implementación de las pruebas de carga viral del VIH 2014), el ensayo de CV del VIH de GSS tiene que tener un límite de detección (LOD) ≤ 1000 copias/ml. Para lograr esta

sensibilidad utilizando una GSS de 70 µl, la eficiencia de elución de la GSS necesita ser mejorada en un 10 % o más para disminuir el LOD a menos de 1000 copias/ml.

El ensayo de CV del VIH-1 de GS/GSS de la presente invención se diseñó para llevarse a cabo en un aparato automatizado que pueda programarse para los parámetros de extracción de ácidos nucleicos y amplificación de la presente invención. Los instrumentos Abbott RealTime *m2000sp* y *m2000rt* (dispositivo; Abbott Molecular, Abbott Park, IL) son ejemplos de dispositivos automatizados y programables adecuados para el ensayo de CV del VIH-1 de GSS de la presente invención. Los parámetros/instrucciones de operación de los instrumentos Abbott Realtime *m2000sp* y *m2000rt* (e instrumentos adecuados disponibles en otras fuentes) son conocidas por un experto con conocimientos normales en la técnica. La presente invención no está limitada al uso de este dispositivo y otros dispositivos similares eran conocidos por un experto con conocimientos normales en la técnica en el momento de esta invención. El ensayo del VIH-1 de la presente invención utiliza preferentemente la tecnología de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con detección homogénea de fluorescencia en tiempo real. Un diseño de sonda fluorescente de doble cadena parcial permite la detección de diversas variantes del VIH-1, incluyendo los grupos M, O y N. El ensayo puede estandarizarse contra un patrón viral del Laboratorio de Garantía de la Calidad en Virología (VQA) del AIDS Clinical Trial Group u otro patrón (Yen-Lieberman B, Brambilla D, Jackson B, et al. Evaluation of a quality assurance program for quantitation of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma by the AIDS clinical trials group virology laboratories, *J Clin Microbiol*, 1996, 34:2695-701), y contra los patrones internacionales de la Organización Mundial de la Salud para el ARN del VIH-1 (NIBSC; Holmes H, Davis C, Heath A, et al. An international collaborative study to establish the 1st international standard for HIV-1 RNA for use in nucleic acid-based techniques, *J Virol Methods*, 2001, 92:141-50; Davis C, Heath A, Best S, et al. Calibration of HIV-1 working reagents for nucleic acid amplification techniques against the 1st international standard for HIV-1 RNA, *J Virol Meth*, 2003, 107:37-44). Los resultados del ensayo se expresan en copias/ml, Log de copias/ml, Unidades internacionales/ml (UI/ml) o Log UI/ml.

Como se indica en el WHO Early Infant Diagnosis of HIV - Global HIV Web Study ([depts.washington.edu/ghivaid/reslimited/case7/discussion.html](http://depts.washington.edu/ghivaid/reslimited/case7/discussion.html)), las pruebas en gota de sangre seca es un medio aceptable para recoger muestras para el análisis y representa un riesgo biológico menor que las muestras líquidas. Además, los artículos revisados por expertos han mostrado que el uso de muestras de GSS es factible cuando se comparan con las muestras de plasma en cuanto a sensibilidad y confianza (*J. Clin Microbiol*, 2011, 50(3):569-572).

La eficacia, eficiencia y exactitud de la preparación de la muestra automatizada y los sistemas de análisis, tales como el Abbott Sample Preparation System (*m2000sp*) y el analizador Abbott Real-Time PCR (*m2000rt*) se han confirmado en artículos de revistas revisadas por expertos (Marconi, et al., Evaluation of the Abbott Real-Time HIV-1 quantitative assay with dried blood spot specimens, *Clin. Microbiol. Infect*, 2009, 15:93-97). Además, se han publicado comparaciones de varios artículos para la recogida de GSS (Rottinghaus, et al., *J. Clin. Microbiol.*, 2012, 51(1):55-60).

Aunque una gran cantidad de trabajos han investigado el uso de la GSS en preparaciones automatizadas y sistemas de ensayo, aún se necesitan mejoras en el flujo de trabajo y la química de reactivos para proporcionar una mayor capacidad de utilización y una mayor sensibilidad. La presente invención proporciona una mayor eficiencia, flujo de trabajo y rendimiento respecto a los procedimientos de ensayo de CV del VIH-1 de GSS de la técnica anterior que utilizan sistemas automatizados.

#### 45 Ventajas de la recogida de muestras de GSS

Las ventajas de la recogida de GSS respecto a las muestras de sangre líquida son numerosas. Las GSS son fáciles de recoger; solo se necesita una punción en el dedo o en el talón, evitando así la necesidad de venopunción. No se requieren habilidades de flebotomía. El equipo para la recogida es mínimo. Las tarjetas de muestra normalmente tienen un indicador del tamaño de la gota (diámetro) para asegurar un tamaño de muestra adecuado. Un volumen de muestra de alrededor de 70 µl es habitualmente el adecuado. Las muestras se secan al aire en condiciones ambientales. La GSS no necesita refrigeración para su almacenamiento. La GSS se puede almacenar o transportar en un recipiente cerrado (tal como Tupper Wear® o en un sobre cerrado). Las muestras son fáciles de transportar y son estables durante largos periodos de tiempo en condiciones ambientales (entre semanas y meses). Por lo tanto, las muestras pueden recogerse en sitios externos y transportarse a un centro de análisis centralizado. Debido al bajo riesgo biológico asociado con las muestras de GS/GSS, las muestras apropiadamente envasadas pueden enviarse por correo hasta el centro de análisis (Shipping Guidelines for Dried-Blood Spot Specimens, CDC, [www.cdc.gov/labstandards/pdf/nsqap/Bloodspot\\_Transportation\\_Guidelines.pdf](http://www.cdc.gov/labstandards/pdf/nsqap/Bloodspot_Transportation_Guidelines.pdf), y las referencias contenidas en el documento; Clinical Laboratory and Standards Institute. Blood collection on filter paper for newborn screening programs; Approved standard-Fifth edition. CLSI document LA4-A6. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012). Una vez en el centro de análisis las muestras se pueden extraer usando sistemas automatizados o procedimientos manuales si se desea.

#### 65 Definiciones

Las siguientes definiciones son relevantes para la presente divulgación:

El término "alrededor de" y "aproximadamente", a menos que se indique de otro modo, se refiere a una variación de +/-10 % respecto al valor indicado. Se ha de entender que una variación de este tipo está siempre incluida en cualquier valor dado proporcionado en el presente documento, se haga o no referencia específica él. Además, todos los intervalos mencionados incluyen todos los valores que se encuentran entre dicho intervalo se mencione o no realmente el valor específico. Por lo tanto, el intervalo de 1 - 10 incluye, por ejemplo, los valores 2, 3,6, 9,015, etc.

La expresión "reacción en cadena de la polimerasa (PCR)" se refiere a un método para producir copias de una secuencia de ADN. El método emplea ciclos térmicos (es decir, ciclos de calentamiento y enfriamiento para la desnaturalización (o fusión) y replicación del ADN, respectivamente). Los cebadores, que son fragmentos cortos de ADN que contienen secuencias complementarias a la secuencia de ADN que ha de copiarse, y una ADN polimerasa termoestable, tal como una de *Thermus aquaticus*, denominada Taq polimerasa, se utilizan para seleccionar la secuencia de ADN y copiarla (véase, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos Números 4.683.195; 4.800.195, y 4.965.188). Mediante los ciclos repetidos, las copias que se han hecho, se usan como plantillas para generar más copias (es decir, una reacción en cadena). Las técnicas de PCR incluyen, pero sin limitación, PCR estándar, PCR específica de alelo, PCR de ensamblaje, PCR asimétrica, PCR digital, PCR de arranque en caliente, PCR específica de intersecuencia, PCR inversa, PCR mediada por ligamiento, PCR específica de metilación, PCR de minicebador, PCR anidada, PCR de extensión superpuesta, PCR en tiempo real, PCR de transcripción inversa, PCR en fase sólida, PCR térmica de entrelazado asimétrico y PCR con rampa descendente de temperaturas.

La expresión reacción en cadena de la polimerasa de transcripción reversa (RT-PCR) se refiere a un método de detección cualitativa de la expresión de un gen mediante la creación de transcritos de ADN complementarios (ADNc) a partir de ARN.

La expresión "reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real", "PCR en tiempo real" y "PCR cualitativa (qPCR)" se refiere a un método de medición cuantitativa que mide la amplificación del ADN utilizando sondas fluorescentes.

El término "cebador", tal como se usa en el presente documento se refiere a un oligonucleótido que inicia la síntesis de ácido nucleico dependiente de la plantilla. En presencia de una plantilla de ácido nucleico, precursores de nucleósido trifosfato, una polimerasa y cofactores, en condiciones adecuadas de temperatura y pH, el cebador puede extenderse en su extremo 3' mediante la adición de nucleótidos por la polimerasa para dar lugar a un producto de extensión del cebador. El cebador puede variar en longitud dependiendo de las condiciones particulares empleadas y del propósito de la amplificación. Por ejemplo, un cebador para la amplificación para un propósito de diagnóstico tiene normalmente alrededor de entre 15 y alrededor de 35 nucleótidos de longitud. El cebador debe ser suficientemente complementario con la plantilla deseada para iniciar la síntesis del producto de extensión deseado. En otras palabras, el cebador debe ser capaz de hibridar suficientemente con la hebra de la plantilla deseada para proporcionar el resto 3' hidroxilo del cebador en yuxtaposición apropiada para su uso en la iniciación de la síntesis mediante una polimerasa. No es necesario que el cebador sea un complemento exacto de la plantilla deseada. Por ejemplo, una secuencia de nucleótidos no complementaria puede estar presente en el extremo 5' de otro cebador que es complementario. Como alternativa, las bases no complementarias pueden estar dispersas en el cebador de oligonucleótido, siempre que la secuencia del cebador tenga una complementariedad suficiente con la secuencia de la hebra de la plantilla deseada para proporcionar un complejo plantilla-cebador para la síntesis del producto de extensión.

## PCR

Las secuencias diana se amplifican con técnicas conocidas en la técnica. La técnica de elección es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La amplificación por PCR se puede realizar mediante técnicas de PCR estándar, siguiendo las instrucciones del fabricante. El sistema Abbott *m2000* comprende dispositivos que automatizan la preparación de las muestras y las reacciones de PCR basadas en la entrada del usuario.

La reacción de amplificación puede comprender, y preferentemente comprende, un ácido nucleico de control interno (CI) y un par de cebadores para amplificar el ácido nucleico de CI. Cuando la reacción de amplificación comprende un ácido nucleico de CI, las condiciones que promueven la amplificación también promueven la amplificación del ácido nucleico de CI. Cualquier sustancia adecuada se puede usar como el CI. Ejemplos de secuencias diana de CI incluyen las usadas en la sección Ejemplos, a continuación.

Aunque cualquier muestra adecuada de un tejido o fluido corporal puede utilizarse como la fuente de la muestra de ácido nucleico, es decir, ADN o ARN, en la presente invención la muestra se eluye a partir de una GSS. Una proteinasa, tal como una proteinasa K, se puede añadir a la muestra para digerir proteínas no deseadas, si así se requiere o se desea.

La muestra puede prepararse para ensayo utilizando cualquier método adecuado conocido en la técnica. Deseablemente, el método extrae y concentra ácidos nucleicos. El método también hace que la secuencia diana sea accesible para su amplificación, y elimina inhibidores potenciales de la amplificación del extracto. En la presente invención, los ácidos nucleicos se eluyen de la GSS con el tampón de elución de la presente invención.

Una vez que se eluye la muestra, el ARN puede aislarse, transcribirse de manera inversa y el ADNc resultante puede amplificarse (p. ej., mediante reacción en cadena de la polimerasa de transcripción reversa (RT-PCR), tal como se describe en las patentes de EE.UU. Números 5.310.652; 5.322.770; 5.561.058; 5.641.864; y 5.693.517, por ejemplo). Además, el ADN puede amplificarse directamente sin el uso de una transcriptasa reversa. El ADN pro-viral puede amplificarse de este modo.

El ácido nucleico diana puede ponerse en contacto con cebadores para obtener la amplificación específica de una secuencia diana, si la secuencia diana está presente en la muestra. "Amplificación específica" significa que los cebadores amplifican una secuencia diana específica y no otras secuencias. Véase, por ejemplo, PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification (Erlich, Editor, Freeman Press, NY (1992)); PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Innis, et al., Editors, Academic Press, San Diego, CA (1990)); Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel, 1994-1999, including supplemental updates through April 2004); and Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Sambrook & Russell, 3rd ed., 2001) así como los métodos que se describen en la Publicación de solicitud de patente internacional N.º WO 93/22456 y las patentes de Estados Unidos Números 4.851.331; 5.137.806; 5.595.890; y 5.639.611.

Un cebador puede marcarse de forma detectable con un marcador que puede detectarse por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunquímicos o químicos, por ejemplo (véase, por ejemplo, Sambrook, et al.). Los marcadores útiles incluyen un colorante, tal como un colorante fluorescente, un marcador radiactivo, tal como <sup>32</sup>P, un reactivo denso a los electrones, una enzima, tal como peroxidasa o fosfatasa alcalina, biotina o haptenos y proteínas para las cuales se disponen de antisueros o anticuerpos monoclonales. En la presente invención se prefieren los colorantes fluorescentes. En este sentido, se puede marcar un oligonucleótido detectable, tal como con fluoresceína. Si el cebador se marca con un colorante y el oligonucleótido detectable se marca con fluoresceína y se diseña para que se una a la hebra naciente opuesta al colorante, se puede producir la transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) a lo largo de la hélice del ADN. Otros oligonucleótidos detectables incluyen una sonda molecular, una sonda TAQMAN®, una sonda de ADN monocatenario, una sonda de ADN bicatenario, y similares.

Los reactivos de amplificación de ácidos nucleicos (reactivos de PCR) incluyen una enzima que tiene actividad polimerasa (p. ej., AmpliTaq Gold®), uno o más cofactores enzimáticos (p. ej., MgCl<sub>2</sub>), y desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs; por ejemplo, dATP, dGTP, dCTP, y dUTP o dTTP).

Las condiciones que promueven la amplificación son aquellas que promueven la hibridación de cebadores y la extensión de las secuencias de ácido nucleico. La hibridación depende de varios parámetros, tales como temperatura, fuerza iónica, longitud de las secuencias a amplificarse, complementariedad, contenido de G:C de las secuencias a amplificar. Por ejemplo, la disminución de la temperatura promueve la hibridación de secuencias de ácidos nucleicos. Un alto contenido de G:C y una longitud mayor estabilizan la formación del dúplex. En general, los cebadores y los oligonucleótidos detectables de alrededor de 30 pb o menos y con un alto contenido de G:C funcionan bien. Las condiciones de amplificación preferidas, cebadores y oligonucleótidos detectables se ejemplifican en el presente documento.

La amplificación puede repetirse un número cualquiera de veces mediante ciclos térmicos de la mezcla de reacción entre alrededor de 10 y alrededor de 100 veces, tal como entre alrededor de 20 y alrededor de 75 veces, tal como entre alrededor de 25 y alrededor de 50 veces.

Una vez completadas las reacciones de amplificación, la presencia de un producto amplificado puede detectarse utilizando cualquier método adecuado. Dichos métodos incluyen, sin limitación, aquellos conocidos en la técnica, tales como electroforesis en gel con o sin un colorante fluorescente (dependiendo de si el producto se amplificó con un cebador marcado con colorante), un perfil de fusión con un colorante intercalante (véase, por ejemplo, PCR Technology, Principles, and Applications for DNA Amplification, Erlich, Ed., W. H. Freeman and Co., Nueva York, 1992, Chapter 7), y la hibridación con un oligonucleótido detectable interno. Otros ejemplos de métodos incluyen el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), electroquimioluminiscencia, inmunotransferencia de puntos inversa, cromatografía líquida a presión alta (HPLC) (véase, por ejemplo, Lazar, Genome Res. 4: S1-S14 (1994)), y también se puede usar el análisis de polimorfismo de conformación de cadena sencilla de productos de PCR de cadena sencilla (véase, por ejemplo, Orita, et al., PNAS USA 86: 2766-2770 (1989)). En la presente invención, los marcadores fluorescentes se detectan automáticamente con el aparato de reacción de PCR automatizado.

Los ácidos nucleicos amplificados pueden detectarse mediante la monitorización de un aumento en la cantidad total de ADN de doble cadena (ADNdc) en la mezcla de reacción (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N.º 5.994.056 y las publicaciones de patente de Estados Unidos Números 487.218 y 512.334). Se usa un colorante de unión a ADN, tal como SYBR. El colorante fluoresce cuando se une al ADNdc y se usa la fluorescencia para determinar el aumento del ADNdc.

Como alternativa o preferentemente, la amplificación y detección pueden combinarse en una prueba de PCR en tiempo real. Cuando se usa la PCR en tiempo real, la mezcla puede comprender además reactivos de detección de ácidos nucleicos. Los ejemplos incluyen colorantes fluorescentes no específicos que se intercalan con cualquier

ADN de doble cadena u oligonucleótidos detectables de ADN específico de una secuencia que permiten la detección solo después de que el oligonucleótido detectable hibride con su ADN diana complementario, permitiendo así la amplificación y detección simultáneas. Cuando un oligonucleótido detectable se encuentra presente en la mezcla durante la amplificación, el oligonucleótido detectable debe ser estable en condiciones que promuevan la amplificación, no debe interferir con la amplificación, debe unirse a su secuencia diana en condiciones de amplificación y emitir una señal solo tras la unión a su secuencia diana. Los ejemplos de oligonucleótidos detectables que son particularmente adecuados en este sentido incluyen oligonucleótidos detectables de baliza molecular, oligonucleótidos detectables TAQMAN®, y oligonucleótidos lineales detectables, tales como los descritos por Abravaya, et al. (publicación de solicitud de patente de Estados Unidos N.º 2005/0227257). Los oligonucleótidos detectables pueden formar una disposición de bucle y vástago en combinación con una sonda molecular. Los oligonucleótidos detectables también pueden utilizarse como oligonucleótidos detectables lineales con un fluoróforo (por ejemplo, FAM) en un extremo y un inhibidor de la fluorescencia de alta eficiencia, tal como el Black Hole Quencher (BHQ®; BioSearch Technologies, Inc., Novato, CA), en el otro extremo.

Los términos y expresiones, que se han empleado, se utilizan como términos de descripción y no de limitación. En este sentido, donde ciertos términos se definen, describen o analizan en el presente documento, todas estas definiciones, descripciones y discusiones están previstas a atribuirse a dichos términos. Igualmente, no hay ninguna intención en el uso de dichos términos y expresiones de excluir cualquier equivalente de las características mostradas y descritas o partes de las mismas.

Se reconoce que son posibles varias modificaciones dentro del alcance de la invención reivindicada. Por lo tanto, se entenderá que, aunque la presente invención se ha divulgado específicamente en el contexto de las realizaciones preferidas y las características opcionales, los expertos en la técnica pueden recurrir a modificaciones y variaciones de los conceptos divulgados en el presente documento. Dichas modificaciones y variaciones se consideran dentro del alcance de la invención como se define por las reivindicaciones adjuntas.

Todas las patentes, publicaciones de solicitudes de patentes, artículos de periódico, libros de texto y otras publicaciones mencionadas en la memoria descriptiva son indicativos del nivel de conocimiento de los expertos en la técnica a la que pertenece la divulgación.

La invención descrita de manera ilustrativa en el presente documento se puede poner en práctica de manera adecuada en ausencia de cualquier (cualquiera) elemento(s) o limitación(es), que no está(n) divulgados de manera específica en el presente documento. Por lo tanto, por ejemplo, cada caso en el presente documento de cualquiera de los términos "que comprende", "que consiste esencialmente en" y "que consiste en" se pueden reemplazar con cualquiera de los otros dos términos. Del mismo modo, las formas en singular "un", "uno/a" y "el/la" incluyen las referencias plurales salvo que el contexto indique claramente otra cosa. Por lo tanto, por ejemplo, las referencias al "método" incluye uno o más métodos y/o etapas del tipo, que se han descrito en el presente documento y/o que se volverán evidentes para los expertos en la técnica tras la lectura de la divulgación.

## Ejemplificación

### Ejemplo 1

La presente invención se lleva a cabo preferentemente en aparatos de PCR automatizados, programables, muchos de los cuales son conocidos por un experto con conocimientos normales en la técnica y son adecuados para su utilización con la presente invención con cualesquiera cambios en el procedimiento que puedan ser necesarios para su uso con un sistema específico, siempre que no se desvíe de los conceptos inventivos de la presente invención. En otros casos, la presente invención puede llevarse a cabo de manera manual. Sin embargo, la ejecución manual de la presente invención tiene como resultado una mayor inversión de tiempo y posiblemente una menor precisión debida al error del operador.

Este ejemplo utiliza el sistema Abbott m2000 que comprende los instrumentos *m2000sp* (preparación de la muestra) y *m2000rt* (amplificación de ácido nucleico en tiempo real) y los reactivos Abbott RealTime HIV-1.

### Prueba de la carga viral del VIH-1 de las muestras de gota de sangre seca para su uso conjuntamente con los instrumentos Abbott m2000 (o similar) y los reactivos Abbott RealTime HIV-1 (o similar)

El procedimiento descrito a continuación se aplica a la prueba de la carga viral del VIH-1 de las muestras de gota de sangre seca (GSS). Este procedimiento descrito a continuación se usa conjuntamente con los instrumentos Abbott *m2000sp* y *m2000rt* y los reactivos Abbott RealTime HIV-1. Otros sistemas y aparatos se encuentran disponibles en la técnica y un experto con conocimientos normales en la técnica puede modificar el procedimiento divulgado a continuación para su uso en los otros sistemas y aparatos disponibles basándose en las enseñanzas de la presente memoria descriptiva y sin desviarse de los conceptos inventivos de la presente memoria descriptiva.

### Procedimiento instrumental

El archivo de aplicación (es decir, software) para el ensayo de la carga viral del VIH-1 de GSS debe instalarse en los sistemas Abbott *m2000sp* y Abbott *m2000rt* antes de realizar el ensayo.

### 5 Recogida de muestras e instrucciones de manipulación

Las GSS pueden aplicarse en tarjetas de papel Munktell TFN (Suecia) (o tarjetas de papel equivalente, tal como se conocen por los expertos con conocimientos normales en la técnica) mediante las siguientes etapas:

- 10 • Echar gotas de sangre completa sobre los círculos de 12 milímetros (media pulgada) de una tarjeta de papel Munktell TFN (o equivalente), asegurándose que todo el círculo esté cubierto. Se recomienda usar al menos 70 µl de sangre (~3-5 gotas; no apretar ni estrujar el dedo) para cada círculo para asegurar una cobertura completa. Si se ha recogido sangre completa en tubo de recogida de sangre, la sangre recién extraída puede mantenerse desde 2-8 °C (temperatura de refrigerador) hasta 15-30 °C (temperatura ambiente) durante 24 horas antes de la aplicación de las gotas. Además, la sangre debe mezclarse antes de la aplicación de las gotas usando una pipeta.
- 15 • Secar al aire la tarjeta a temperatura ambiente.
- Para el transporte o el almacenamiento, envasar cada tarjeta en una bolsa o en otro envase sellable con bolsas desecantes. Las tarjetas se pueden conservar en condiciones ambientales durante 12 semanas. Como alternativa, las tarjetas se pueden conservar a 2-8 °C o -10 °C o a una temperatura inferior durante 24 semanas.
- 20 • Transporte de muestras, si así se requiere o se desea, de acuerdo con la temperatura de almacenamiento y los tiempos recomendados mencionados anteriormente. Para los transportes nacionales e internacionales, las muestras deben envasarse y etiquetarse en cumplimiento con las regulaciones estatales, federales e internacionales aplicables al transporte de muestras clínicas, diagnósticas o biológicas.

### 25 Protocolo del ensayo

1. Este ejemplo de protocolo usó el sistema Abbott RealTime. Un experto con conocimientos normales en la técnica será capaz de adaptar este protocolo a otros dispositivos y sistemas similares sin experimentación excesiva. En cada ciclo pueden procesarse un total de 96 muestras. En cada ciclo se incluye un control negativo, un control positivo bajo, y un control positivo alto, permitiendo así procesar un máximo de 93 muestras de GSS por ciclo cuando no se incluyen los calibradores. Estas etapas no se aplican a los controles y calibradores de Abbott, los cuales deberían procesarse como muestras directamente líquidas. Procesar las muestras de GSS mediante las siguientes etapas:

- 35 • Preparar tubos de transporte Abbott con 1,3 ml de tampón de elución de GS/GSS (el tampón de elución comprende aproximadamente GITC 3,5 M (tiocianato de guanidinio), aproximadamente Tween® 20 5 %, aproximadamente KOAc 50 mM (acetato de potasio) a aproximadamente pH 6,0. Tween® es una marca comercial registrada de ICI Americas, Inc., Bridgewater, Nueva Jersey. Tween® 20 es un nombre comercial del polisorbato 20. En los métodos de la presente invención también se pueden utilizar otras marcas de polisorbato 20. [GITC se puede usar desde 1,0-5,5 M, 2,0 - 4,5 M, 3,0 - 4,0 M y alrededor de 3,5 M; Tween20 se puede usar al 0 - 20 %, 2 % - 8 %, 4 % - 6 % y alrededor de 5 %; El acetato de potasio se puede usar a 10 - 500 mM, 20 mM - 300 mM, 30 mM - 200 mM, 40 mM - 100 mM y alrededor de 50 mM; y el pH puede ser desde 5 - 10, 5,2 - 8, 5,6 - 7, 5,8 - 6,5 y alrededor de 6,5.]
- 45 • Separar una (1) GSS entera para cada muestra de una tarjeta de papel Munktell TFN (o equivalente). Cada GSS debe tener alrededor de 12 milímetros (media pulgada) de diámetro. NOTA: Si es aplicable, evitar el contacto directo de la superficie cortante con las muestras de GSS. Limpiar el instrumento usado para cortar la GSS entre muestras, si fuera necesario, de acuerdo con las buenas prácticas de laboratorio. Colocar la GSS en el tubo de transporte Abbott que contiene el tampón de elución de GS/GSS. Asegurarse de que la GSS se sumerja completamente en el tampón de elución de GS/GSS. NOTA: Durante esta etapa de transferencia de la GSS, puede colocarse una tarjeta de papel Munktell TFN perforada encima del tubo de transporte Abbott, donde la GSS se libera de la tarjeta y se dirige al interior del tubo utilizando una punta de pipeta limpia.
- 50 • Incubar a temperatura ambiente durante alrededor de 20 minutos o incubar durante 30 minutos a 55 °C con mezclado intermitente antes de colocar la muestra en un instrumento Abbott *m2000sp* o en otro sistema robótico (Etapas 7).

2. Descongelar los controles del ensayo apropiados y el control interno (CI) a una temperatura entre 15 y 30 °C o entre 2 y 8 °C (e intermedias). Descongelar los calibradores a una temperatura entre 15 y 30 °C o entre 2 y 8 °C (e intermedias) solo si se realiza un ciclo de calibración.

- 60 • Una vez descongelados, los controles del ensayo, el CI y los calibradores pueden almacenarse a una temperatura entre 2 y 8 °C durante 24 horas antes de usar.
- 65 • Agitar en vórtex (es decir, mezclar de forma extremadamente vigorosa con un mezclador vórtex o equivalente) cada calibrador del ensayo y cada control 3 veces durante 2 a 3 segundos antes de usar. Asegurarse de que el contenido de cada vial se encuentra en el fondo después de la agitación con vórtex golpeando ligeramente los viales sobre la mesa para que el líquido llegue hasta el fondo del vial. Asegurarse

de que no se forman burbujas o espuma; y si están presentes, eliminar las burbujas con una punta de pipeta estéril, usando una nueva punta para cada vial.

- Preparar controles internos (CI) según las instrucciones del fabricante, como se conoce en la técnica.

5 3. Descongelar los reactivos de amplificación a una temperatura entre 15 y 30 °C o entre 2 y 8 °C (e intermedias) y almacenar a una temperatura entre 2 y 8 °C hasta que se necesiten para el procedimiento de preparación de la mezcla maestra de amplificación.

10 • Una vez descongelados, los reactivos de amplificación se pueden almacenar a 2-8 °C durante 24 horas si no se usan inmediatamente.

- Preparar los reactivos de amplificación (reactivos de PCR) según las instrucciones del fabricante, como se conoce en la técnica.

15 • Colocar los controles positivos bajos y altos, el control negativo, los calibradores, si es aplicable, y las muestras de GSS en los tubos de transporte Abbott en las gradillas de muestras del sistema Abbott *m2000sp*.  
NOTA: Asegurarse de que las gradillas de muestras del sistema Abbott *m2000sp* se han calibrado específicamente para este procedimiento de carga viral del VIH-1 de GSS.

20 • Cargar las gradillas de muestras cuidadosamente para evitar salpicaduras. Si se utilizan, los códigos de barras de las etiquetas de los tubos deben orientarse hacia la derecha para su lectura. Asegurarse de que todos los tubos están bien asentados en la gradilla de muestras de forma que el fondo de los tubos toque la parte inferior de la gradilla.

- Cargar las gradillas de muestras llenas en el sistema Abbott *m2000sp* en posiciones consecutivas de la gradilla de muestras, con la primera gradilla situada lo más lejos a la derecha de la mesa de trabajo, y cualquier gradilla adicional progresivamente a la izquierda de la primera gradilla.

25 5. Colocar los tubos de reacción de 5 ml en el subsistema de soporte de 1 ml del sistema Abbott *m2000sp*.

6. Cargar los reactivos del Sistema de preparación de la muestra Abbott y la placa de 96 pocillos profundos de Abbott en la mesa de trabajo del sistema Abbott *m2000sp*.

30 7. En la pantalla del Protocolo, seleccionar el archivo de la aplicación de la carga viral del VIH-1 de GSS. Iniciar el protocolo de extracción de las muestras.

35 • Introducir calibrador (necesario si no se ha guardado una curva de calibración en el sistema Abbott *m2000rt*) y controlar los valores específicos del lote en los campos de extracción de las muestras: Campos configuración de la mesa de trabajo, Calibrador y Controles. Los valores específicos del lote están especificados en cada calibrador de Abbott RealTime HIV-1 y Tarjeta del kit de control.

- El protocolo Adición de la mezcla maestra del sistema Abbott *m2000sp* (etapa 9) debe iniciarse en el plazo de 1 hora después de haber completado la preparación de la muestra.

40 **NOTA: Cambiar los guantes antes de manipular los reactivos de amplificación.**

8. Cargar los reactivos de amplificación y el vial de la mezcla maestra en la mesa de trabajo del sistema Abbott *m2000sp* una vez completada la preparación de la muestra.

45 9. Seleccionar la placa de pocillos profundos apropiada que coincida con la correspondiente extracción de preparación de la muestra. Iniciar el protocolo de adición de la mezcla maestra del sistema Abbott *m2000sp*.

50 • Una vez completada la extracción de la muestra, el sistema Abbott *m2000sp* llena automáticamente cualquier pocillo vacío de la placa de reacción óptica de 96 pocillos de Abbott cuando en un ciclo se procesan más de 48 muestras. El llenado de la placa no se lleva a cabo para ciclos que contienen 48 muestras o menos.

10. Encender e inicializar el instrumento Abbott *m2000rt* en el Área de amplificación.

55 11. Sellar la placa de reacción óptica de 96 pocillos de Abbott una vez completada la adición de las muestras y de la mezcla maestra en el instrumento Abbott *m2000sp* de acuerdo con lo descrito en el capítulo Instrucciones de funcionamiento del Manual de funcionamiento del sistema Abbott *m2000sp*.

12. Colocar la placa de reacción óptica sellada en la base para el soporte libre de salpicaduras para su transferencia al instrumento Abbott *m2000rt*.

60 13. Colocar la placa de reacción óptica de 96 pocillos de Abbott en el instrumento Abbott *m2000rt*. En la pantalla del Protocolo, seleccionar el archivo de la aplicación de la carga viral del VIH-1 de GSS. Iniciar el protocolo como se describe en el capítulo Instrucciones de funcionamiento del Manual de funcionamiento del sistema Abbott *m2000rt*.

65 14. Puede añadirse ADNasa a una o más de las muestras eluidas, los reactivos de PCR y la reacción de PCR

completa después de la adición de los reactivos de PCR a la muestra procesada, si se considera necesario por el operador. Los reactivos/tampones de la reacción de la ADNasa y los reactivos/tampones de desactivación no son necesarios.

5 **Resultados**

La concentración del ARN del VIH-1 viral en una muestra o control se calcula a partir de la curva de calibración almacenada. El instrumento Abbott *m2000rt* ofrece automáticamente los resultados en la estación de trabajo del sistema Abbott *m2000rt*. Los resultados del ensayo se expresan en copias/ml, log [copias/ml], Unidades internacionales (UI)/ml o log [UI/ml]. Para la interpretación de los resultados véase la Tabla 1 a continuación.

**Tabla 1**

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS	
Resultado	Interpretación
No detectado	Diana no detectada
<7,00 log (copias/ml)	Detectado*
>7,00 log (copias/ml)	>ULQ <sup>a</sup>
<sup>a</sup> ULQ = límite superior de cuantificación	
*Para la búsqueda del archivo AppSpec (v4 o superior), todas las muestras detectadas deben expresarse con un resultado de CV. El LOD real se ofrecerá tras el estudio de verificación. Una vez el obtenido el valor LOD, Los resultados "detectado" se separarán en dos categorías: 1). "Detectado" 2). "Detectado", < valor LOD".	

15 **Ejemplo 2**

El ejemplo muestra las características de diseño que permiten trabajar al procedimiento de ensayo automatizado de GSS de la presente invención con eficiencia y sensibilidad mejorada respecto a los métodos de la técnica anterior.

Los procedimientos implican las siguientes etapas:

1. La GSS se recorta de la tarjeta de GSS.
2. La GSS se incuba en un tampón de tratamiento.
3. El tubo de reacción que contiene la GSS en el tampón se carga en el sistema robótico automatizado (p. ej. el sistema Abbott *m2000sp*).
4. El sistema robótico funciona mediante una secuencia de comandos para procesar la muestra de GSS mediante el proceso de extracción de ácido nucleico manipulando directamente el tubo donde se ha incubado la GSS sin intervención manual.
5. Después de la extracción del ácido nucleico, el sistema robótico forma la mezcla maestra de PCR (es decir, la reacción completa de PCR sin los ácidos nucleicos diana). Como alternativa, esta etapa puede evitarse si la mezcla maestra de PCR se ha formado y cargado *a priori* en el sistema.
6. El sistema robótico forma la reacción de PCR completa combinando los ácidos nucleicos extraídos al final de la Etapa 4 con la mezcla maestra de PCR obtenida al final de la Etapa 5.
7. Los informes de los ciclos de PCR y de reducción de datos/resultados se realizan en un instrumento analítico (p. ej. un instrumento de PCR en tiempo real, tal como el Abbott *m2000rt*).
8. Si se desea por la aplicación específica, se añade ADNasa y se incuba con los ácidos nucleicos extraídos obtenidos de la etapa 4 para eliminar/reducir el contenido de ADN. En tal caso, los ácidos nucleicos tratados con ADNasa se procesarán adicionalmente partiendo de la Etapa 6. Como alternativa, puede añadirse ADNasa a los reactivos de PCR antes o durante la formación de la mezcla maestra de PCR. Además, de forma alternativa, la ADNasa puede formularse en el reactivo o reactivos de PCR. En tal caso, la mezcla maestra de PCR que contiene la ADNasa se procesará adicionalmente partiendo de la Etapa 6. Durante la Etapa 6, la ADNasa se distribuye a cada muestra mediante el sistema robótico, evitando la distribución manual de la ADNasa. Además, puede requerirse una incubación de tratamiento de la ADNasa después de la Etapa 6 y antes de la Etapa 7.

Nota: Una aplicación específica donde se pueda desear el uso de ADNasa es una PCR específica de ARN del VIH, donde puede eliminarse/reducirse la interferencia del ADN proviral.

Las tecnologías que permiten los procedimientos de ensayo y el rendimiento del ensayo anteriores incluyen:

1. El tampón de tratamiento que eluye el ácido nucleico de la GS/GSS con alta eficiencia. Esta divulgación incluye el uso del tampón *mWash 1* de Abbott (GITC 3,5M; Tween 20 5 %; KOAc 50 mM, pH 6,0) como el tampón de tratamiento/elución de la GSS. Nota: Abbott ha proporcionado previamente un protocolo de CV del VIH de GSS comercial y un ensayo de GSS cualitativo del VIH CE-IVD que utiliza el tampón de *mLysis* de Abbott como tampón de tratamiento (GITC 4,66M; Tween 20 10 %; Trizma 100 mM, pH 7,8). Más adelante se proporciona una comparación de estos dos procedimientos donde se muestra la inesperada superioridad del procedimiento de la presente invención.
2. Los parámetros de la secuencia de comandos que permiten al sistema robótico de pipetas transferir el líquido

directamente desde el tubo que contiene el material sólido de la GSS para el posterior procesamiento de forma robusta y precisa dejando un volumen muerto de  $\leq 300$   $\mu$ l en el tubo después de la transferencia de líquidos.

3. El uso de ADNasa que degrada eficazmente ADN en los ácidos nucleicos extraídos sin incluir tampones de reacción de ADNasa específicos.

4. El uso de ADNasa con la propiedad descrita en el apartado 3 que degrada eficazmente el ADN a temperatura ambiente.

5. El uso de ADNasa con las propiedades descritas en los apartados 3 y 4 que degrada eficazmente el ADN en un período de tiempo de 30 minutos.

6. El uso de ADNasa con las propiedades descritas en los apartados 3-5 que no necesita inactivarse ni con la introducción de reactivos ni de temperaturas elevadas.

7. El uso de ADNasa que degrada eficazmente el ADN en la reacción de PCR cuando la ADNasa se ha introducido en los reactivos de PCR antes de la exposición a los ácidos nucleicos extraídos o cuando se introduce durante la formación de la reacción de PCR.

8. El uso de ADNasa con la propiedad descrita en el apartado 7 sin incluir un tampón de reacción de ADNasa específico.

9. El uso de ADNasa con las propiedades descritas en los apartados 7 y 8 que degrada eficazmente el ADN a temperatura ambiente o a temperaturas durante varias fases de los ciclos de la PCR.

10. El uso de ADNasa con las propiedades descritas en los apartados 7-9 que degrada eficazmente el ADN en un período de tiempo de 10 minutos. Preferentemente, en el caso donde las temperaturas durante las distintas etapas de los ciclos de PCR pueden apoyar la función de la ADNasa, el tratamiento con ADNasa no requiere tiempo adicional o etapas de ciclos más allá de las incluidas en los ciclos de PCR.

11. El uso de ADNasa con las propiedades descritas en los apartados 7-10 que no necesita inactivarse ni con la introducción de reactivos ni de temperaturas elevadas antes y durante la PCR.

12. El uso de ADNasa y las condiciones de tratamiento con ADNasa asociadas de los elementos 3-11 que no impacta negativamente a la detección de las secuencias de ARN.

13. El uso del ajuste "volumen de PCR" (como parámetro de los ciclos térmicos) en un valor inferior al volumen de PCR real. Este ajuste elimina el efecto de "límite" observado en una placa de PCR llena que impacta negativamente en la sensibilidad cuando se compara con un ciclo en una placa de PCR parcial. El efecto de "límite", tal como se ha observado con algunas etapas de la técnica de cicladores de PCR de tiempo real, es causado por el exceso de temperatura de la unidad térmica de control. El enfoque de menor volumen de PCR conduce a un control térmico más lento y más preciso, mejorando así la mayoría del exceso de temperatura.

14. El corte de la reacción de PCR es determinado por el experto en la técnica de modo que sea apropiado para la muestra diana de GS/GSS específica.

#### Detalles de un ejemplo de las tecnologías de la presente invención:

1. La transferencia robótica del líquido desde los tubos que contienen la GSS consiste en las siguientes etapas:

- Se empuja la GSS al fondo del tubo de muestra mediante una punta de pipeta desechable utilizando un algoritmo "Detectar fondo del tubo".
- La punta desechable se retrae lentamente una corta distancia (p. ej., 3 mm) del fondo del tubo de muestra y se lleva a cabo una pequeña aspiración de volumen (p. ej., 50  $\mu$ l) para verificar que la GSS no interfiere con la punta desechable. Después de completar la pequeña aspiración de volumen, la punta desechable se retira hasta un punto por encima de la superficie del líquido.
- Usando la misma punta desechable, se detecta la superficie del líquido y se lleva a cabo una aspiración de seguimiento parcial de volumen (p. ej., 450  $\mu$ l para lograr 1 ml) de esa localización. Después de completar la primera aspiración de volumen parcial, el líquido contenido en la punta desechable se transfiere a un tubo de reacción para las etapas siguientes de extracción de ácido nucleico.
- Estas etapas se repiten para obtener el volumen total de transferencia de la muestra.

2. Los ejemplos de ADNasas que degradan eficazmente ADN cuando se utilizan junto con los métodos y composiciones de la presente invención cuando se añaden a los ácidos nucleicos extraídos (sin impactar negativamente en la detección de ARN) en ausencia de tampones de reacción de ADNasa específicos y que no necesitan inactivarse ni con la introducción de reactivos ni con temperaturas elevadas son:

- Promega (Madison, WI) RQ1 ADNasa libre de ARNasa (N.º Cat M6101); 2U/reacción; Temperatura ambiente; 30 minutos.
- Ambion (Grand Island, NY) ADNasa I (libre de ARNasa) (N.º Cat AM2222); 2U/reacción; Temperatura ambiente; 30 minutos.
- Roche (Basilea, Suiza) ADNasa I recombinante, libre de ARNasa (N.º Cat 04716728001); 20U/reacción; Temperatura ambiente; 30 minutos.
- Otras ADNasas adecuadas pueden ser conocidas y ser identificadas por un experto con conocimientos normales en la técnica utilizando los métodos descritos en el presente documento sin experimentación excesiva. La presente invención no se limita a cualquier ADNasa específica siempre que cumpla con los estándares mencionados en esta memoria descriptiva. Los ensayos descritos en las figuras a continuación son solo ejemplos y no tienen el objetivo de limitar la invención a cualquier ADNasa en particular o a cualquier

método de detección.

Véase en la Figura 1 una ADNasa que elimina eficazmente el ADN y no impacta negativamente en las señales de ARN. La Figura 1 muestra los ácidos nucleicos eluidos extraídos de gotas de sangre seca positivas para VIH tratadas con ADNasa antes de combinarse con los reactivos de PCR (líneas discontinuas) en comparación con el control (sin tratamiento de ADNasa, líneas discontinuas). Los ácidos nucleicos fueron sometidos a un ensayo de PCR en tiempo real de beta globina para obtener la señal de ADN de beta globina y una RT-PCR en tiempo real del VIH-1 para las señales de ARN del VIH y del CI. a) Señal de ADN de beta globina, para demostrar la eficacia del tratamiento con ADNasa; b) señal de ARN del VIH, para demostrar el impacto del tratamiento con ADNasa, c) señal de ARN del CI, para demostrar el impacto del tratamiento con ADNasa. Condiciones usadas para el tratamiento con ADNasa: Ambion ADNasa 1 (libre de ARNasa) (N.º Cat AM2222); 2U/reacción; temperatura ambiente; 30 minutos.

Véase en la Figura 2 una ADNasa que no elimina eficazmente el ADN y no impacta negativamente en las señales de ARN. La Figura 2 muestra los ácidos nucleicos eluidos extraídos de gotas de sangre seca positivas para VIH tratadas con ADNasa antes de combinarse con los reactivos de PCR (líneas discontinuas) en comparación con el control (sin tratamiento de ADNasa, líneas discontinuas). Los ácidos nucleicos fueron sometidos a un ensayo de PCR en tiempo real de beta globina para obtener la señal de ADN de beta globina y una RT-PCR en tiempo real del VIH-1 para las señales de ARN del VIH y del CI. a) Señal de ADN de beta globina, para demostrar la eficacia del tratamiento con ADNasa; b) señal de ARN del VIH, para demostrar el impacto del tratamiento con ADNasa, c) señal de ARN del CI, para demostrar el impacto del tratamiento con ADNasa. Condiciones usadas para el tratamiento con ADNasa: New England Biolabs ADNasa I (libre de ARNasa) (N.º Cat MO303S); 2U/reacción; temperatura ambiente; 30 minutos.

Véase en la Figura 3 una ADNasa que elimina eficazmente el ADN e impacta negativamente en las señales de ARN. La Figura 3 muestra los ácidos nucleicos eluidos extraídos de gotas de sangre seca positivas para VIH tratadas con ADNasa antes de combinarse con los reactivos de PCR (líneas discontinuas) en comparación con el control (sin tratamiento de ADNasa, líneas discontinuas). Los ácidos nucleicos fueron sometidos a un ensayo de PCR en tiempo real de beta globina para obtener la señal de ADN de beta globina y una RT-PCR en tiempo real del VIH-1 para las señales de ARN del VIH y del CI. a) Señal de ADN de beta globina, para demostrar la eficacia del tratamiento con ADNasa; b) señal de ARN del VIH, para demostrar el impacto del tratamiento con ADNasa, c) señal de ARN del CI, para demostrar el impacto del tratamiento con ADNasa. Condiciones usadas para el tratamiento con ADNasa: Sigma-Aldrich ADNasa 1 (calidad de amplificación) (N.º Cat AMPD1); 2U/reacción; temperatura ambiente; 30 minutos.

3. Los ejemplos de ADNasas que degradan eficazmente el ADN en la reacción de PCR (sin impactar negativamente en la detección del ARN) cuando la ADNasa se ha introducido en los reactivos de PCR antes de la exposición a los ácidos nucleicos extraídos o cuando se introduce durante la formación de la reacción de PCR son:

- Promega RQ1 ADNasa libre de ARNasa (N.º Cat M6101); 2U/reacción; Temperatura ambiente; 10 minutos
- Ambion ADNasa I (libre de ARNasa) (N.º Cat AM2222); 2U/reacción; Temperatura ambiente; 30 minutos
- Otras ADNasas pueden ser conocidas por un experto con conocimientos normales en la técnica y pueden identificarse utilizando los métodos descritos en el presente documento sin experimentación excesiva. La presente invención no se limita a cualquier ADNasa específica siempre que cumpla con los estándares mencionados en esta memoria descriptiva. Los ensayos descritos en las figuras a continuación son solo ejemplos y no tienen el objetivo de limitar la invención a cualquier ADNasa en particular.

Véase en la Figura 4 una ADNasa que elimina eficazmente el ADN y no impacta negativamente en las señales de ARN. En la Figura 4, la ADNasa se añadió a los reactivos de PCR que posteriormente se combinaron con la mezcla maestra de PCR (línea discontinua). Como el control, no se añadió ADNasa a los reactivos de PCR (línea continua). Los ácidos nucleicos extraídos se sometieron a un ensayo con la mezcla maestra de PCR, donde la señal de ADN de beta globina y se detectaron las señales de ARN del VIH y del CI. a) Señal de ADN de beta globina, para demostrar la eficacia del tratamiento con ADNasa; b) señal de ARN del VIH, para demostrar el impacto del tratamiento con ADNasa, c) señal de ARN del CI, para demostrar el impacto del tratamiento con ADNasa. Condiciones usadas para el tratamiento con ADNasa: Promega RQ1 ADNasa libre de ARNasa (N.º Cat M6101); 2U/reacción; temperatura ambiente; 10 minutos.

Abbott ha proporcionado un protocolo de la técnica anterior. Este protocolo se optimizó para el modo abierto inicial de CV del VIH-1 de GSS. El protocolo de modo abierto inicial se optimizó al modo abierto actual y para el desarrollo del producto CE. La Tabla 2, presentada a continuación, muestra las diferencias entre el protocolo de la técnica anterior, el protocolo de modo abierto inicial y el protocolo mejorado. Las letras "CE" son la abreviatura de la frase francesa "Conformité Européene", que literalmente significa "Conformidad Europea".

**Tabla 2** Diferencias entre el protocolo de la técnica anterior, el protocolo de modo abierto inicial y el protocolo mejorado.

	Protocolo de la técnica anterior	Optimización del modo abierto inicial de la GSS	Optimización adicional para el producto CE
<b>Número de GSS por muestra</b>	2	1	1
<b>Volumen de sangre por GSS</b>	50 µl	70 µl	70 µl
<b>Tampón de tratamiento de la GSS</b>	1,7 ml de tampón <i>mlysis</i> (GITC 4,66M; Tween 20 10 %; Trizma 100 mM, pH 7,8)	1,3 ml de tampón <i>mWash 1</i> (GITC 3,5M; Tween 20 5 %; KOAc 50 mM, pH 6,0)	1,3 ml de tampón <i>mWash 1</i> (GITC 3,5M; Tween 20 5 %; KOAc 50 mM, pH 6,0)
<b>Número de tubos de muestra por GSS</b>	2 (incluyendo un tubo de tratamiento de GSS y un tubo de entrada de muestra en el sistema <i>m2000sp</i> )	1 (tubo de entrada de la muestra en el sistema <i>m2000sp</i> )	1 (tubo de entrada de la muestra en el sistema <i>m2000sp</i> )
<b>Número de muestras por ciclo de m2000</b>	48	96	96
<b>Condición de elución de la GSS</b>	Temperatura ambiente 20 minutos con mezcla intermitente	Temperatura ambiente 20 minutos con mezcla intermitente	55 °C durante 30 minutos
<b>Transferencia automatizada del eluato de GSS</b>	No	Sí	Sí
<b>Tratamiento con ADNasa</b>	No	Sí	No
<b>Volumen de la adición del tampón de lisis en la etapa de lisis celular</b>	0,8 ml x 3	0,8 ml x 3	0,8 ml x 2 (para reducir el arrastre de GITC provocando los errores 4450 /4442)
<b>Adición del CI</b>	750 µl de CI por frasco de tampón de lisis	500 µl de CI por frasco de tampón de lisis	750 µl de CI por frasco de tampón de lisis
<b>Parámetro de PCR</b>	El ajuste de volumen de PCR (como un parámetro de los ciclos térmicos) es el mismo que el volumen de PCR real (100 µl)	El ajuste volumen de PCR (como parámetro de los ciclos térmicos) es un valor inferior al volumen de PCR real (25 µl frente a 100 µl)	El ajuste volumen de PCR (como parámetro de los ciclos térmicos) es un valor inferior al volumen de PCR real (25 µl frente a 100 µl)
<b>Reducción de los datos</b>	Corte de reactividad de la PCR mayor (MR 0,07)	Corte de reactividad de la PCR menor (MR 0,03)	Corte de reactividad de la PCR menor (MR 0,03)
<b>Sensibilidad (nivel diana asociado con una probabilidad de detección del 95 %)</b>	~ 2500 copias/ml	~ 1000 copias/ml	~ 800 copias/ml

Los cambios en el ensayo tal como se detalla en la Tabla 2, tienen como resultado una enorme, inesperada y sorprendente mejora en comparación con el método de la técnica anterior. La Tabla 3 muestra la mayor sensibilidad lograda por el método de la presente invención. El nivel diana asociado con el 100 % de detección disminuyó desde 10.000 copias por ml en el ensayo de la técnica anterior hasta 2.000 copias por ml cuando se usan los métodos de la presente invención.

**Tabla 3** Véase en la tabla siguiente la comparación del protocolo de modo abierto (condición de elución de GSS TA 20 minutos) de la invención con el protocolo de la técnica anterior en cuanto a la sensibilidad de detección.

Nivel diana (copias/ml)	Número probado	Técnica anterior		Modo abierto	
		Número detectado	Porcentaje detectado	Número detectado	Porcentaje detectado
1.000.000	12	12	100	12	100
100.000	12	12	100	12	100
10.000	12	12	100	12	100
3.000	12	11	92	12	100
2.000	12	11	92	12	100
1.000	12	7	58	11	92
500	12	4	33	8	67
250	12	3	25	8	67

**Ejemplo 3**

**Estudios realizados para mejorar la sensibilidad y robustez del ensayo**

5 Con el ensayo en modo abierto inicial, aproximadamente 2-3 % de las muestras internas del estudio y > 5 % de las muestras externas del estudio presentaron los errores 4450 o 4442 del sistema *m2000rty*, por tanto, eran inválidas. Se determinó que la guanidina residual estaba asociada con una mayor frecuencia de inhibición y con los errores 4450 y 4442. El archivo de especificación de la aplicación de GSS del VIH-1 se modificó para reducir la cantidad y frecuencia del arrastre de guanidina. La reducción de la velocidad de retracción durante la eliminación de los  
 10 desechos reduce la dispersión de cualquier gota que quede en las puntas de pipeta. Dado que la muestra de GSS está presente en el tampón Wash 1 (tampón de elución de GSS) con 1 ml como entrada de muestra, el volumen del tampón de lisis en la reacción pudo reducirse desde 2400 hasta 1600 µl, reduciendo la cantidad de GITC presente en cada reacción. La eficacia del lavado se incrementó al incrementar el volumen de Wash 2 desde 700 hasta  
 15 750 µl. Al implementar estos cambios, se reduce la frecuencia de errores 4450 y 4442 hasta aproximadamente 0,2 % (datos no mostrados). Esta optimización mejoró significativamente la robustez del ensayo.

La sensibilidad del ensayo puede mejorarse aumentando la entrada de la muestra usando dos GSS (gota de sangre seca) de 70 µl por paciente para la prueba. Los datos de evaluación (datos no mostrados) sugirieron que, a una elución a temperatura ambiente, dos GSS comparadas con una GSS mejoraba la tasa de detección del VIH en el  
 20 extremo inferior. En la condición de elución de 55 °C durante 30 minutos, la mejora de la tasa de detección de concentración baja del VIH de dos GSS comparada con una GSS no fue tan distinta.

La sensibilidad del ensayo también puede mejorar aumentando la eficiencia de la elución. Se llevó a cabo una comparación directa de una elución a temperatura ambiente durante 20 minutos y una elución a 55 °C durante 30  
 25 minutos. Los resultados (Figura 5) sugirieron que el Ct (umbral de ciclo) y la MR (relación máxima) mejoraron significativamente al aumentar la temperatura hasta 55 °C durante 30 minutos. La temperatura de 55 °C y el tiempo se mantuvieron con una banda de guarda (Figuras 6 y 7 respectivamente). Los resultados (Figura 6) mostraron que las temperaturas por encima de 60 °C tienen como resultado valores de MR menores. En general, la MR más alta fue a 55 °C. La Figura 7 mostró que se requerían treinta minutos a 55 °C para una elución de la GSS más eficiente.  
 30 Después de la incubación a 55 °C durante 30 minutos, una incubación extra a temperatura ambiente hasta 24 horas no afectó a los resultados de la PCR. Además, se realizó una comparación del material de ARN recuperado de la GSS con sangre completa directamente enriquecida con el tampón de muestra entre la temperatura ambiente durante 20 minutos y a 55 °C durante 30 minutos. Los resultados mostraron que la condición de elución a 55 °C  
 35 aumentó la recuperación en aproximadamente el 10 % al compararse con la condición de elución a temperatura ambiente (Tabla 4). La agitación continua de la muestra de GSS en el tampón se combinó con la condición de elución de 55 °C. Los resultados mostraron una ligera mejora en la recuperación del VIH bajo a partir de la GSS; la mejora no fue estadísticamente significativa (datos no mostrados).

**Tabla 4.** Cálculo del % de recuperación en comparación con la sangre completa

Condición 1000 copias/ml	Ct medio	MR media	Promedio % de recuperación en comparación con la sangre completa (intervalo)
TA 20 min	27,79	0,160	44,9 (34,1-62,8)
55 °C 30 min	27,43	0,180	57,4 (43,3-70,4)
Condición 250 copias/ml	Ct medio	MR media	Promedio del % de recuperación en comparación con la sangre completa (intervalo)
TA 20 min	28,78	0,097	57,1 (40,6-68,9)
55 °C 30 min	28,59	0,103	66,1 (37,2-82,7)
Se observó una mejora de aproximadamente el 10 % en el porcentaje de recuperación en comparación con la sangre completa cuando la GSS se eluyó a 55 °C durante 30 minutos frente a temperatura ambiente durante 20 minutos.			

40 Se llevó a cabo una evaluación preliminar de la sensibilidad analítica para estimar la sensibilidad utilizando un panel de dilución del VIH-1 (panel lote N.º 2) a 55 °C durante 30 minutos de Garantía de la Calidad en Virología (VQA). También se probó usando VIH-1 inactivado de SeraCare que se cuantificó usando 3 lotes de calibradores. Los calibradores utilizados para la cuantificación se cuantificaron utilizando un panel de dilución del VIH-1 de VQA (panel  
 45 lote N.º 1). Los resultados se muestran en la Tabla 5. El LOD estimado es aproximadamente de 800 copias/ml.

**Tabla 5.** Estimación de la sensibilidad

Recurso del VIH	Copias de VIH/ml	Número probado	Número detectado	Porcentaje detectado	Logit LOD copias/ml	Probit LOD copias/ml
VQA 2	250	30	18	60	741	766
	500	30	24	80		
	1000	30	30	100		

(continuación)

Recurso del VIH	Copias de VIH/ml	Número probado	Número detectado	Porcentaje detectado	Logit LOD copias/ml	Probit LOD copias/ml
LAV VIH*	250	16	11	68,8	884	865
	500	16	15	93,8		
	1000	16	15	93,8		

\*VIH-1 inactivado de SeraCare que se cuantificó usando 3 lotes de calibrador, que se cuantificaron a partir de VQA1.

5 Actualmente hay múltiples tarjetas de papel comercialmente disponibles para GSS. Es importante demostrar que los rendimientos son comparables. Se llevó a cabo un estudio para realizar una comparación entre sí de las tarjetas de papel de GSS de 3 proveedores diferentes. Se utilizaron múltiples lotes de tarjetas de papel de las disponibles. Los resultados se resumen en la Tabla 6. El rendimiento basado en un Ct de concentración del VIH baja, la MR y la tasa de detección fueron similares. Las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

**Tabla 6. Comparación del papel de GSS de diferentes proveedores**

Cop VIH/ml	Tipo de papel/número de lote del proveedor	VIH promedio		Tasa de detección
		Ct	MR	
1000	Munktell TFN /LabMate lote 13-108-36	27,50	0,175	12/12
1000	Munktell TFN/Lasec lote 13-108-24	27,14	0,202	12/12
1000	Munktell TFN/Lasec lote 13-108-25	27,62	0,174	12/12
1000	Ahlström 226/Perkin Elmer lote 103649	27,11	0,189	11/11
1000	Whatman 903/GE Healthcare Lote 6933912	27,81	0,167	11/12
1000	Whatman 903/GE Healthcare Lote 6990814	27,41	0,174	12/12

10

**REIVINDICACIONES**

1. Un método automatizado para detectar ácidos nucleicos del VIH-1 en una muestra de sangre, comprendiendo el método:
- 5 a) proporcionar: i) una muestra de sangre que se sospecha infectada con VIH secada en un soporte sólido, ii) un tampón de elución, iii) un instrumento de preparación de las muestras automatizado, programable, iv) un instrumento de PCR automatizado, programable, v) ADNasa y vi) reactivos de PCR adecuados para la detección de ácidos nucleicos del VIH-1;
- 10 b) eluir la muestra de sangre del soporte sólido con el tampón de elución para crear una muestra eluida;
- c) cargar automáticamente la muestra eluida en el instrumento de preparación de las muestras automatizado, programable para la extracción y purificación posterior de ácidos nucleicos para crear una muestra procesada;
- d) cargar los reactivos de PCR en el instrumento de PCR automatizado, programable;
- 15 e) iniciar un programa automatizado para dispensar alícuotas de los reactivos de PCR en la muestra procesada;
- f) llevar a cabo la PCR en los ácidos nucleicos extraídos en la muestra procesada con el instrumento de PCR automatizado, programable;
- g) analizar los resultados de la PCR generados por el instrumento de PCR automatizado, programable para determinar si alguna muestra comprende ácidos nucleicos del VIH-1;
- 20 h) en donde, dicho tampón de elución comprende aproximadamente GITC 3,5 M, aproximadamente polisorbato 20 5 %, aproximadamente KOAc 50 mM a aproximadamente pH 6,0;
- i) en donde, opcionalmente, la ADNasa se añade a una o más de las muestras procesadas, los reactivos de PCR, o la reacción de PCR completa después de la adición de los reactivos de PCR a la muestra procesada.
2. El método de la reivindicación 1, en donde el método comprende adicionalmente controles negativos y positivos.
- 25 3. El método de la reivindicación 1, en donde la etapa b) dura alrededor de 20 minutos a temperatura ambiente.
4. El método de la reivindicación 3, en donde la etapa b) se realiza con mezclado intermitente suave.
- 30 5. El método de la reivindicación 1, en donde la etapa b) dura alrededor de 30 minutos a alrededor de 55 °C.
6. El método de la reivindicación 5, en donde la etapa b) se realiza con mezclado intermitente suave.
7. El método de la reivindicación 1, en donde dicho procedimiento automatizado está programado por comandos de software.
- 35 8. El método de la reivindicación 1, en donde la etapa i) se lleva a cabo y dicha ADNasa no requiere tampones de reacción de ADNasa específicos, es efectiva a temperatura ambiente o a las temperaturas utilizadas durante las etapas cíclicas de la PCR, degrada eficazmente el ADN en el periodo de tiempo de 30 minutos, no necesita inactivarse después de degradar eficazmente el ADN y no impacta negativamente en la detección de secuencias de ARN.
- 40 9. El método de la reivindicación 1, en donde dicho soporte sólido es papel de filtro.
- 45 10. El método de la reivindicación 1, en donde dicho ácido nucleico es ARN.
11. El método de la reivindicación 1, en donde dicho ácido nucleico es ADN pro-viral.

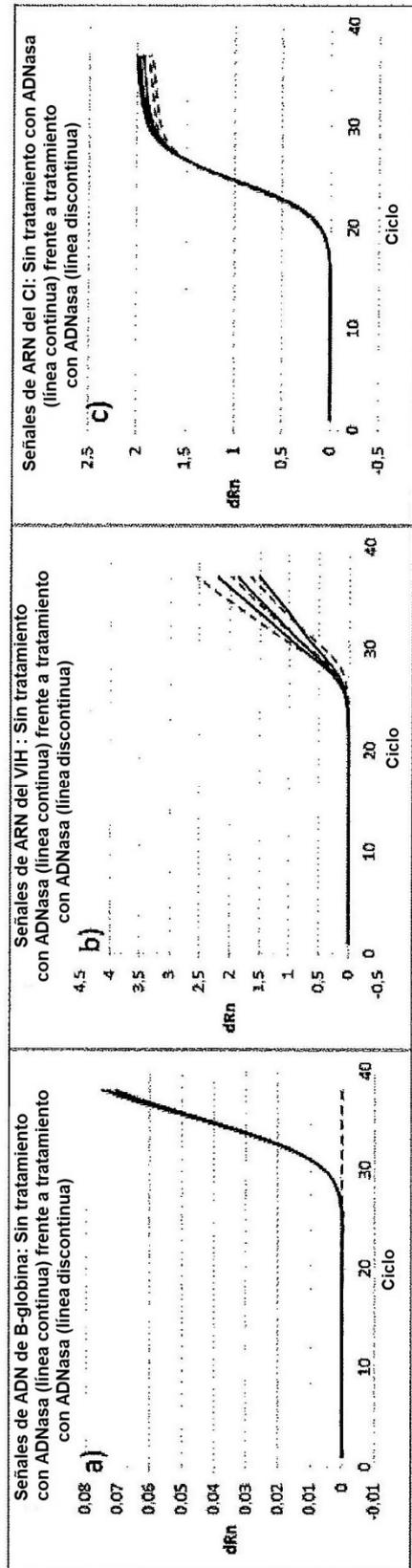


Figura 1

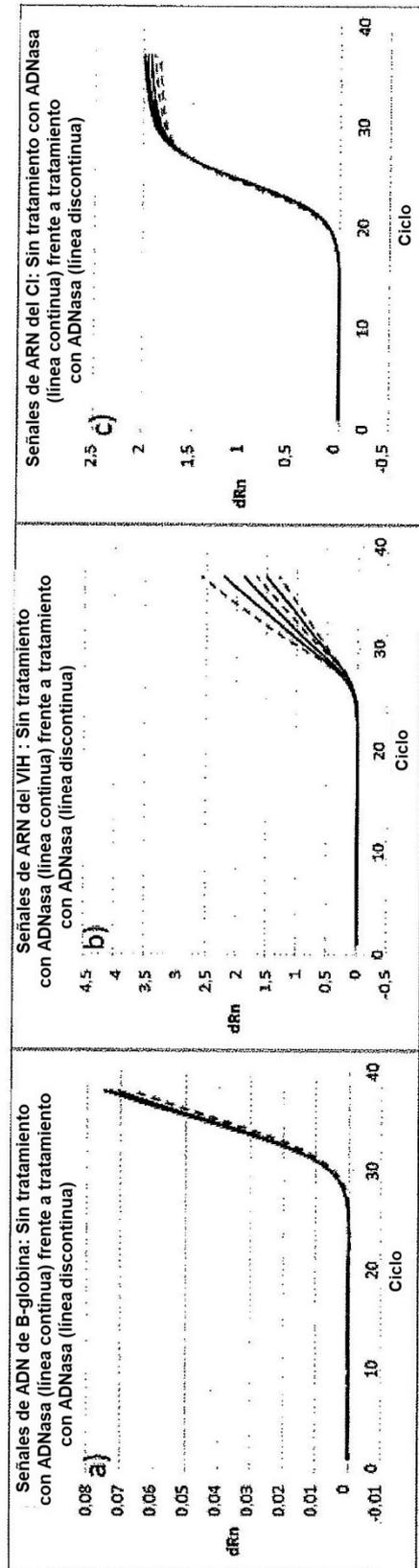


Figura 2

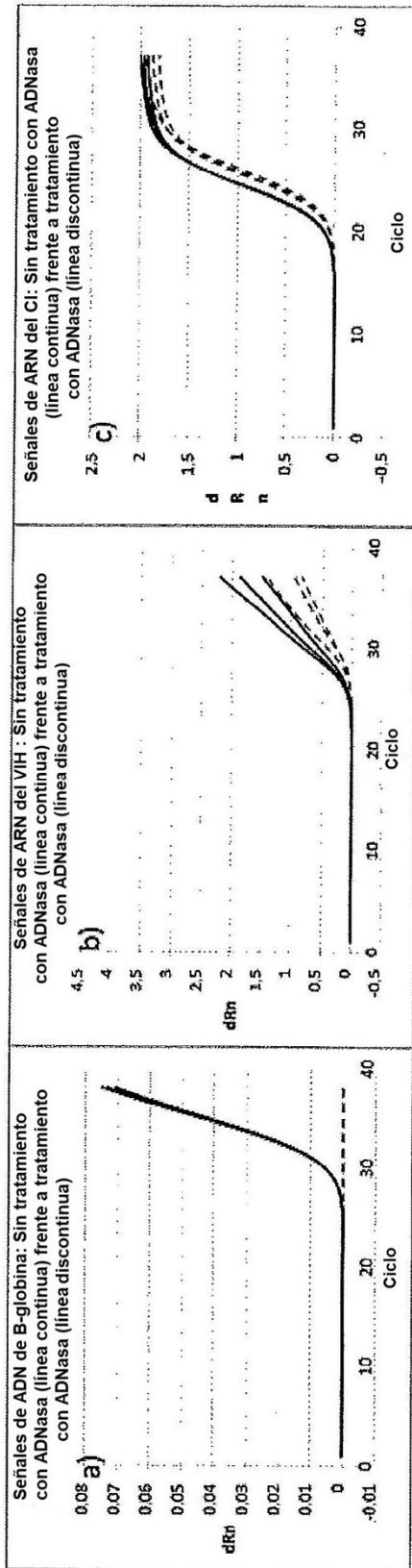


Figura 3

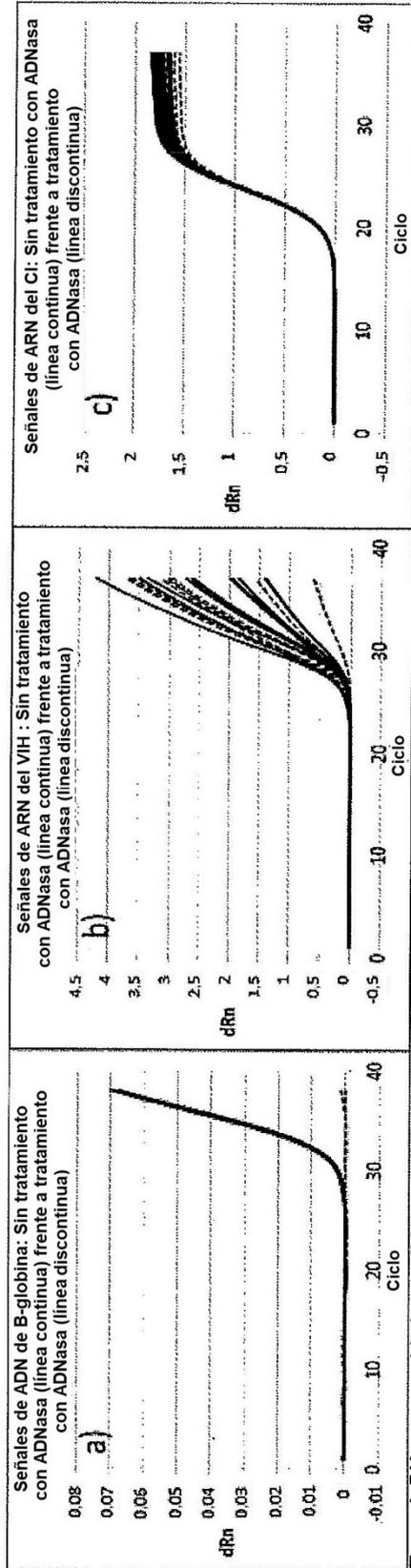
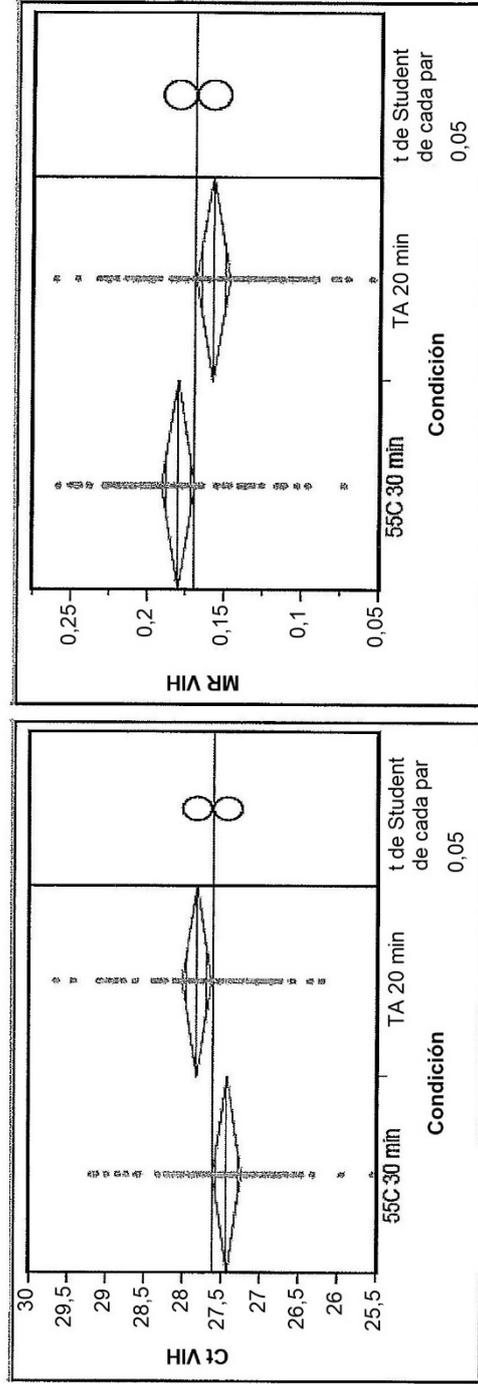


Figura 4

Comparación de las condiciones de elución de la GSS a 1000 copias/ml  
(55 °C 30 minutos frente a temperatura ambiente (TA) 20 minutos)

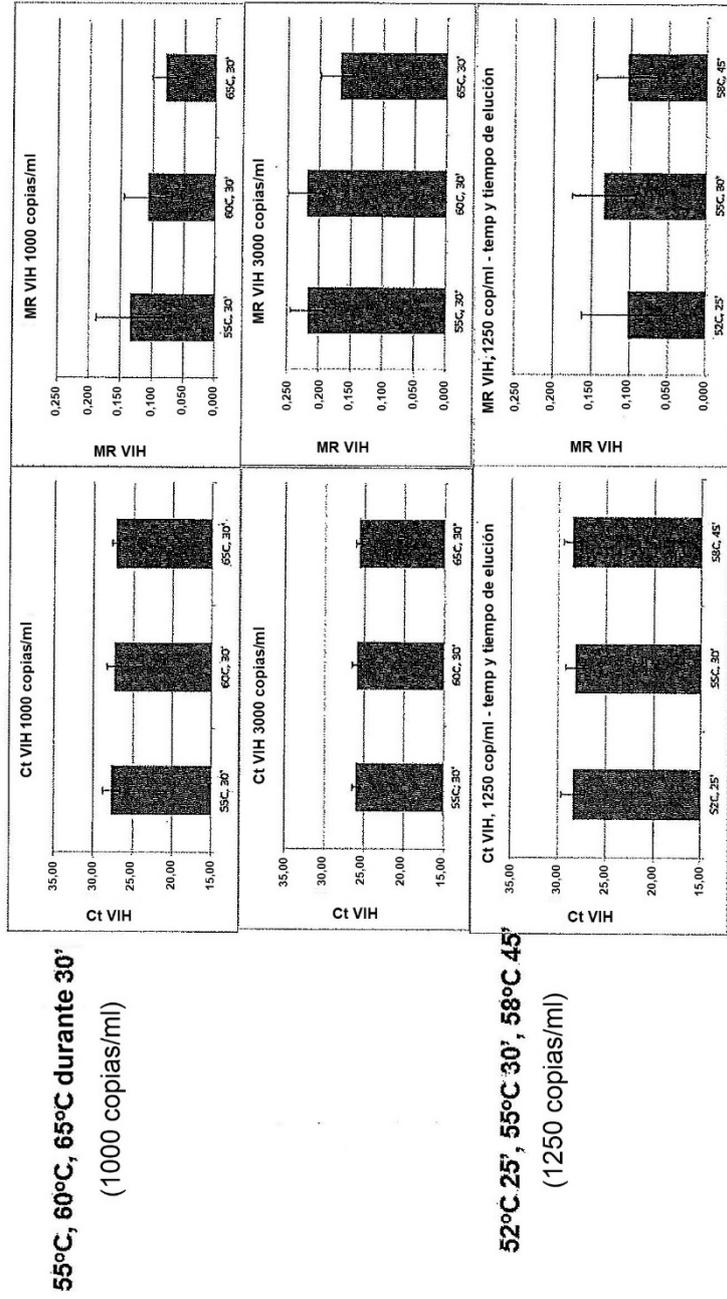


El Ct a 55 °C durante 30 min se produce antes que el Ct a temperatura ambiente durante 20 min. Existe una diferencia estadísticamente significativa.

La MR a 55 °C durante 30 min es mayor que la MR a temperatura ambiente durante 20 min. Existe una diferencia estadísticamente significativa.

Figura 5

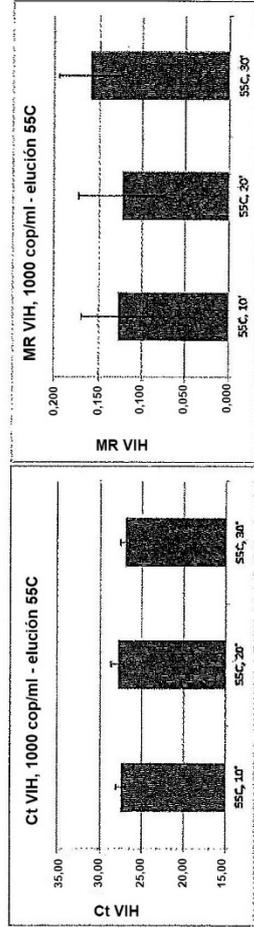
**Elución de la GSS a 55 °C durante 30 minutos  
con banda de guarda de la temperatura**



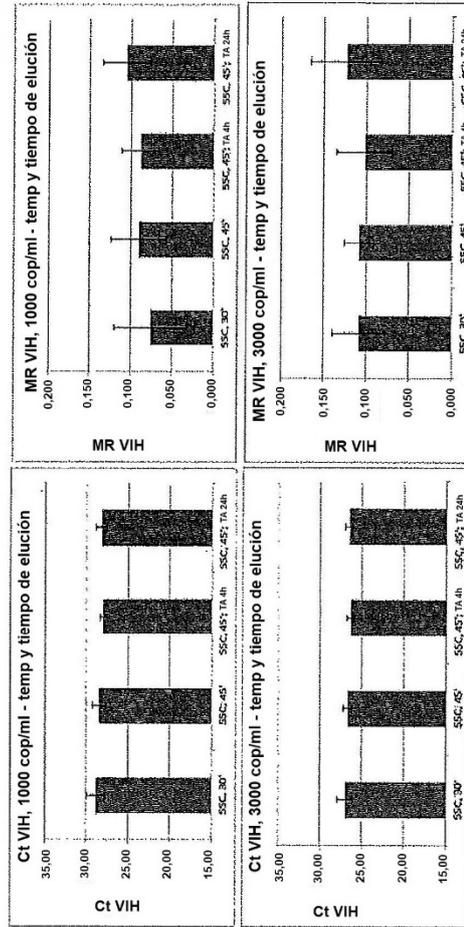
**Figura 6**

**Elución de la GSS a 55 °C durante 30 minutos  
con banda de guarda del tiempo**

**55°C durante 10, 20, 30 min**  
(100 copias/ml)



**55°C durante 30, 45 min y  
55°C 45' seguido de TA 4  
horas o 24 horas.**  
(1000-3000 copias/ml)



**Figura 7**