

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 809 566**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

C12Q 1/70 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.12.2014 PCT/CN2014/094914**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.07.2015 WO15096763**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.12.2014 E 14875135 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.05.2020 EP 3087205**

54 Título: **Métodos y sistemas para la amplificación de ácidos nucleicos**

30 Prioridad:

25.12.2013 WO PCT/CN2013/090425

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

04.03.2021

73 Titular/es:

**COYOTE BIOSCIENCE CO., LTD. (100.0%)
Room 511, 5th Floor Chuangye Zhonglu 36,
Haidian
Beijing 100083, CN**

72 Inventor/es:

LI, XIANG

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 809 566 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

Métodos y sistemas para la amplificación de ácidos nucleicos

5 **Antecedentes**

Los métodos de amplificación de ácidos nucleicos permiten la amplificación seleccionada y la identificación de ácidos nucleicos de interés de una mezcla compleja, tal como una muestra biológica. Para detectar un ácido nucleico en una muestra biológica, la muestra biológica generalmente se procesa para aislar ácidos nucleicos de otros componentes de la muestra biológica y otros agentes que pueden interferir con el ácido nucleico y/o la amplificación. Tras el aislamiento del ácido nucleico de interés de la muestra biológica, el ácido nucleico de interés puede amplificarse, a través de, por ejemplo, métodos de amplificación conocidos en la técnica, tales como enfoques basados en ciclos térmicos (p. ej., reacción en cadena de la polimerasa (PCR)). Después de la amplificación del ácido nucleico de interés, los productos de amplificación pueden detectarse y los resultados de la detección interpretarse por un usuario final. La extracción de ácido nucleico de una muestra biológica antes de la amplificación del ácido nucleico, sin embargo, puede llevar mucho tiempo, dando como resultado una eficacia de tiempo reducida para el proceso en su conjunto.

Las pruebas en el punto de atención (POC) tienen el potencial de mejorar la detección y el abordaje de enfermedades infecciosas en entornos de recursos limitados con infraestructura de laboratorio deficientes, o en áreas remotas donde hay demoras en la recepción de resultados de laboratorio y posibles complicaciones para hacer el seguimiento de los pacientes. Las pruebas POC también podrían hacer que las instalaciones de atención médica de última generación sean más capaces de entregar resultados de muestra a respuesta a los pacientes durante una sola visita. Las ineficacias en los métodos y dispositivos de POC, sin embargo, limitan lo que se puede lograr. Por ejemplo, la preparación de ácidos nucleicos (p. ej., de un patógeno) a partir de tipos de muestras complejas (p. ej., muestras biológicas) implica personal altamente cualificado, en un espacio de laboratorio dedicado, para realizar manualmente múltiples etapas de procesamiento y pruebas posteriores, con informes de resultados que con frecuencia se producen horas o incluso días después.

Por lo tanto, existe una necesidad de métodos y dispositivos rápidos, y precisos para analizar ácidos nucleicos de tipos de muestras complejas. Dichos métodos y dispositivos pueden ser útiles, por ejemplo, en la realización de la detección rápida de muestra a respuesta y en el abordaje de enfermedades detectables a través de su ácido nucleico.

Sumario

La presente divulgación proporciona métodos y sistemas para la amplificación eficaz de ácidos nucleicos, tales como moléculas de ARN y ADN. El producto de ácido nucleico amplificado se puede detectar rápidamente y con buena sensibilidad.

En un aspecto, La divulgación proporciona un método para amplificar un ácido ribonucleico (ARN) diana presente en una muestra biológica obtenida directamente de un sujeto. En una realización, el método comprende: (a) proporcionar un recipiente de reacción que comprende la muestra biológica y los reactivos necesarios para llevar a cabo la amplificación con transcripción inversa en paralelo con la amplificación del ácido desoxirribonucleico (ADN), comprendiendo los reactivos (i) una transcriptasa inversa, (ii) una ADN polimerasa, y (iii) un conjunto de cebadores para el ARN diana, para obtener una mezcla de reacción; y (b) someter la mezcla de reacción en el recipiente de reacción a múltiples ciclos de una reacción de extensión con cebadores para generar un producto de ADN amplificado que sea indicativo de la presencia del ARN diana, comprendiendo cada ciclo (i) incubar la mezcla de reacción a una temperatura de desnaturalización durante una duración de la desnaturalización que es menor de o igual a 60 segundos, seguido de (ii) incubar la mezcla de reacción a una temperatura de elongación durante una duración de elongación menor o igual a 60 segundos, amplificando, de este modo, el ARN diana. En otra realización, el método comprende: (a) recibir la muestra biológica que se ha obtenido del sujeto; (a) proporcionar un recipiente de reacción que comprende la muestra biológica y los reactivos necesarios para llevar a cabo la amplificación con transcripción inversa y opcionalmente la amplificación del ácido desoxirribonucleico (ADN), comprendiendo los reactivos (i) una transcriptasa inversa y (ii) un conjunto de cebadores para el ARN diana, para obtener una mezcla de reacción; (c) someter la mezcla de reacción a múltiples ciclos de una reacción de extensión con cebadores para producir una cantidad detectable de producto de ADN amplificado que sea indicativo de la presencia del ARN diana en la muestra biológica; (d) detectar la cantidad de producto de ADN amplificado de (c); y enviar información sobre la cantidad de producto de ADN amplificado a un destinatario, en donde una cantidad de tiempo para completar (a) - (e) es menor o igual a aproximadamente 30 minutos. En algunas realizaciones, la cantidad de tiempo es menor de o igual a 20 minutos, menor de o igual a 10 minutos, o menor de o igual a 5 minutos.

En algunas realizaciones, los reactivos comprenden además un agente indicador que produce una señal detectable indicativa de la presencia del producto de ADN amplificado. En algunas realizaciones, la intensidad de la señal detectable es proporcional a la cantidad del producto de ADN amplificado o ARN diana. En algunas realizaciones, el agente indicador es un colorante. En algunas realizaciones, el conjunto de cebadores comprende uno o más cebadores. En algunas realizaciones, el conjunto de cebadores comprende un primer cebador para generar una cadena que es complementaria al ARN diana. En algunas realizaciones, el conjunto de cebadores comprende un

- segundo cebador para generar una cadena que es complementaria a un producto de ADN que es complementario a al menos una porción del ARN diana. En algunas realizaciones, el ARN diana es ARN vírico. En algunas realizaciones, el ARN vírico es patogénico para el sujeto. En algunas realizaciones, el ARN vírico se selecciona del grupo que consiste en VIH I, VIH II, virus del Ébola, virus del dengue, ortomixovirus, hepevirus y/o virus de la hepatitis A, B, C (p. 5 ej., Virus ARN-HCV blindado), D y E.
- En algunas realizaciones, el recipiente de reacción comprende un cuerpo y una tapa. En algunas realizaciones, la tapa es extraíble. En algunas realizaciones, el recipiente de reacción adopta un formato de punta de pipeta. En algunas realizaciones, el recipiente de reacción es parte de una serie de recipientes de reacción. En algunas realizaciones, la parte del recipiente de reacción de una serie de recipientes de reacción es dirigible de manera individual mediante un dispositivo de manipulación de fluidos. En algunas realizaciones, el recipiente de reacción comprende dos o más zonas térmicas. En algunas realizaciones, el recipiente de reacción está sellado, opcionalmente herméticamente sellado.
- En algunas realizaciones, la temperatura de desnaturalización es de aproximadamente 90 °C a 100 °C, o de aproximadamente 92 °C a 95 °C. En algunas realizaciones, la temperatura de elongación es de aproximadamente 35 °C a 72 °C, o de aproximadamente 45 °C a 65 °C. En algunas realizaciones, la duración de la desnaturalización es menor de o igual a 30 segundos. En algunas realizaciones, la duración de la elongación es menor de o igual a 30 segundos.
- En algunas realizaciones, el ARN diana no se ha sometido a concentración antes de proporcionar un recipiente de reacción que comprende la muestra biológica y los reactivos necesarios para llevar a cabo la amplificación con transcripción inversa en paralelo con la amplificación del ácido desoxirribonucleico (ADN). En algunas realizaciones, la muestra biológica no se ha sometido a extracción de ARN al proporcionar un recipiente de reacción que comprende la muestra biológica y los reactivos necesarios para llevar a cabo la amplificación con transcripción inversa en paralelo con la amplificación del ácido desoxirribonucleico (ADN). En algunas realizaciones, el método comprende además la etapa de añadir un agente de lisis al recipiente de reacción antes o durante el suministro de un recipiente de reacción que comprende la muestra biológica y los reactivos necesarios para llevar a cabo la amplificación con transcripción inversa en paralelo con la amplificación del ácido desoxirribonucleico (ADN). En algunas realizaciones, el agente de lisis comprende un tampón. En algunas realizaciones, el ARN diana se libera de la muestra biológica durante uno o más ciclos de la reacción de extensión con cebadores.
- En algunas realizaciones, la muestra biológica es un fluido biológico del sujeto. En algunas realizaciones, la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en aliento, sangre, orina, heces, saliva, líquido cefalorraquídeo y sudor.
- En algunas realizaciones, la amplificación de ADN es a través de la reacción en cadena de la polimerasa. En algunas realizaciones, la reacción en cadena de la polimerasa es una reacción en cadena de la polimerasa anidada. En algunas realizaciones, la amplificación de ADN es amplificación lineal. En algunas realizaciones, la amplificación produce una cantidad detectable de producto de ADN indicativo de la presencia del ARN diana en la muestra biológica a un valor de umbral de ciclo (Ct, por sus siglas en inglés) de menos de 50, menos de 40, menos de 30, menos de 20, menos de 10 o menos de 5. En algunas realizaciones, la amplificación produce una cantidad detectable de producto de ADN indicativo de la presencia del ARN diana en la muestra biológica en un período de tiempo de 30 minutos o menos, 20 minutos o menos, o 10 minutos o menos. En algunas realizaciones, la amplificación no está basada en emulsión.
- En algunas realizaciones, el destinatario es un médico tratante, una compañía farmacéutica, o el sujeto. En algunas realizaciones, someter la mezcla de reacción a múltiples ciclos de una reacción de extensión con cebadores para producir una cantidad detectable de producto de ADN amplificado que sea indicativo de la presencia del ARN diana en la muestra biológica se realiza en 30 ciclos o menos, 20 ciclos o menos, o 10 ciclos o menos. En algunas realizaciones, detectar es detectar ópticamente, detectar electrostáticamente o detectar electroquímicamente. En algunas realizaciones, el método comprende proporcionar un recipiente de reacción que comprende la muestra biológica y los reactivos necesarios para llevar a cabo la amplificación con transcripción inversa y la amplificación del ácido desoxirribonucleico (ADN).
- En algunas realizaciones, la información se envía como un informe. En algunas realizaciones, el informe es un informe electrónico. En algunas realizaciones, la información se envía a una pantalla electrónica.
- En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para amplificar un ácido ribonucleico diana presente en una muestra biológica obtenida directamente de un sujeto. El método comprende: (a) proporcionar un recipiente de reacción que comprende la muestra biológica y los reactivos necesarios para llevar a cabo la amplificación del ácido nucleico, comprendiendo los reactivos (i) una polimerasa de ácido desoxirribonucleico (ADN) y opcionalmente una transcriptasa inversa, y (ii) un conjunto de cebadores para el ácido nucleico diana, para obtener una mezcla de reacción; y (b) someter la mezcla de reacción en el recipiente de reacción a una pluralidad de series de reacciones de extensión con cebadores para generar producto amplificado que sea indicativo de la presencia del ácido nucleico diana en la muestra biológica, comprendiendo cada serie dos o más ciclos de (i) incubar la mezcla de reacción en una condición de desnaturalización caracterizada por una temperatura de desnaturalización y una duración de la desnaturalización, seguido de (ii) incubar la mezcla de reacción en una condición de elongación caracterizada por una temperatura de elongación y una duración de elongación, en donde una serie individual difiere de al menos otra serie

individual de la pluralidad con respecto a la condición de desnaturalización y/o la condición de elongación.

En algunas realizaciones, el ácido nucleico diana es un ácido ribonucleico. En algunas realizaciones, los reactivos son necesarios para llevar a cabo la amplificación con transcripción inversa en paralelo con la amplificación del ácido desoxirribonucleico. En algunas realizaciones, el producto amplificado es un producto de ácido desoxirribonucleico amplificado. En algunas realizaciones, la muestra biológica no se purifica en (a). En algunas realizaciones, el método comprende además someter el ácido nucleico diana a una o más condiciones de desnaturalización antes de (b). En algunas realizaciones, las una o más condiciones de desnaturalización se seleccionan de un perfil de temperatura de desnaturalización y un agente de desnaturalización.

En algunas realizaciones, la muestra biológica se diluye. Esto puede ayudar a minimizar las inhibiciones. En algunas realizaciones, la muestra biológica se concentra. Esto puede ayudar a aumentar o mejorar la sensibilidad.

En algunas realizaciones, el método comprende además someter el ácido nucleico diana a una o más condiciones de desnaturalización entre una primera serie y una segunda serie de la pluralidad de series de reacciones de extensión con cebadores. En algunas realizaciones, las series individuales difieren con respecto a al menos cualquiera, al menos dos cualquiera, al menos tres cualquiera, o al menos cuatro cualquiera de la tasa de aumento entre la temperatura de desnaturalización y la temperatura de elongación, temperatura de desnaturalización, duración de la desnaturalización, temperatura de elongación y duración de elongación. En algunas realizaciones, las series individuales difieren con respecto a la tasa de aumento entre la temperatura de desnaturalización y la temperatura de elongación, temperatura de desnaturalización, duración de la desnaturalización, temperatura de elongación y duración de elongación.

En algunas realizaciones, la pluralidad de series de reacciones de extensión con cebadores comprende una primera serie y una segunda serie, comprendiendo la primera serie más de diez ciclos, comprendiendo cada ciclo de la primera serie (i) incubar la mezcla de reacción a aproximadamente 92 °C-95 °C durante no más de 30 segundos, seguido de (ii) incubar la mezcla de reacción a aproximadamente 35 °C-65 °C durante no más de 1 minuto, comprendiendo la segunda serie más de diez ciclos, comprendiendo cada ciclo de la segunda serie (i) incubar la mezcla de reacción a aproximadamente 92 °C-95 °C durante no más de 30 segundos, seguido de (ii) incubar la mezcla de reacción a aproximadamente 40 °C-60 °C durante no más de 1 minuto.

En algunas realizaciones, la pluralidad de series de las reacciones de extensión con cebadores produce una cantidad detectable de producto amplificado que es indicativa de la presencia del ácido nucleico diana en la muestra biológica con un valor de umbral de ciclo más bajo en comparación con una serie única de reacciones de extensión con cebadores en condiciones de desnaturalización y de elongación comparables. En algunas realizaciones, el método comprende adicionalmente, antes de (b), precalentar la muestra biológica a una temperatura de precalentamiento de 90 °C a 100 °C durante una duración de precalentamiento de no más de 10 minutos, 2 minutos o 1 minuto. En algunas realizaciones, la temperatura de precalentamiento es de 92 °C a 95 °C. En algunas realizaciones, la duración del precalentamiento no es más de aproximadamente 30 segundos.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un sistema para amplificar un ácido ribonucleico (ARN) diana presente en una muestra biológica obtenida directamente de un sujeto. En una realización, los sistemas comprenden: (a) un módulo de entrada que recibe una solicitud del usuario para amplificar el ARN diana en la muestra biológica; (b) un módulo de amplificación que, en respuesta a la solicitud del usuario: recibe, en un vaso de reacción, una mezcla de reacción que comprende la muestra biológica y los reactivos necesarios para llevar a cabo la amplificación con transcripción inversa en paralelo con la amplificación del ácido desoxirribonucleico (ADN), comprendiendo los reactivos (i) una transcriptasa inversa, (ii) una ADN polimerasa, y (iii) un conjunto de cebadores para el ARN diana; y somete la mezcla de reacción en el recipiente de reacción a múltiples ciclos de una reacción de extensión con cebadores para generar un producto de ADN amplificado que sea indicativo de la presencia del ARN diana, comprendiendo cada ciclo (i) incubar la mezcla de reacción a una temperatura de desnaturalización durante una duración de la desnaturalización que es menor o igual a 60 segundos, seguido de (ii) incubar la mezcla de reacción a una temperatura de elongación durante una duración de elongación menor o igual a 60 segundos, amplificando, de este modo, el ARN diana; y (c) un módulo de salida operativamente acoplado al módulo de amplificación, en donde el módulo de salida envía información sobre el ARN diana o el producto de ADN a un destinatario.

En otra realización, el sistema comprende (a) un módulo de entrada que recibe una solicitud del usuario para amplificar el ARN diana en la muestra biológica; (b) un módulo de amplificación que, en respuesta a la solicitud del usuario: (i) recibe, en un vaso de reacción, una mezcla de reacción que comprende la muestra biológica que se ha obtenido del sujeto y los reactivos necesarios para llevar a cabo la amplificación con transcripción inversa y, opcionalmente, la amplificación del ácido desoxirribonucleico (ADN), comprendiendo los reactivos (1) una transcriptasa inversa y (2) un conjunto de cebadores para el ARN diana; y (ii) somete la mezcla de reacción a múltiples ciclos de una reacción de extensión con cebadores para producir una cantidad detectable de producto de ADN amplificado que sea indicativo de la presencia del ARN diana en la muestra biológica; (iii) detecta la cantidad de producto de ADN amplificado de (iii); y (iv) envía información sobre la cantidad de producto de ADN amplificado a un destinatario, en donde una cantidad de tiempo para completar (i) - (iv) es menor o igual a aproximadamente 30 minutos; y (c) un módulo de salida operativamente acoplado al módulo de amplificación, en donde el módulo de salida transmite la información a un destinatario. En algunas realizaciones, el módulo de salida es una pantalla electrónica. En algunas realizaciones, la

pantalla electrónica comprende una interfaz de usuario. En algunas realizaciones, el módulo de salida es una interfaz de comunicación operativamente acoplada a una red informática.

5 En otro aspecto, la divulgación proporciona un sistema para amplificar un ácido nucleico diana presente en una muestra biológica obtenida directamente de un sujeto. El sistema comprende: (a) un módulo de entrada que recibe una solicitud del usuario para amplificar el ácido nucleico diana en la muestra biológica; (b) un módulo de amplificación que, en respuesta a la solicitud del usuario: recibe, en un vaso de reacción, una mezcla de reacción que comprende la muestra biológica y los reactivos necesarios para llevar a cabo la amplificación del ácido nucleico, comprendiendo los reactivos (i) una ADN polimerasa y opcionalmente una transcriptasa inversa, y (ii) un conjunto de cebadores para el ácido nucleico diana; y somete la mezcla de reacción en el recipiente de reacción a una pluralidad de series de reacciones de extensión con cebadores para generar un producto amplificado que sea indicativo de la presencia del ácido nucleico diana en la muestra biológica, comprendiendo cada serie dos o más ciclos de (i) incubar la mezcla de reacción en una condición de desnaturalización caracterizada por una temperatura de desnaturalización y una duración de la desnaturalización, seguido de (ii) incubar la mezcla de reacción en una condición de elongación caracterizada por una temperatura de elongación y una duración de elongación, en donde una serie individual difiere de al menos otra serie individual de la pluralidad con respecto a la condición de desnaturalización y/o la condición de elongación; y (c) un módulo de salida operativamente acoplado al módulo de amplificación, en donde el módulo de salida envía información sobre el ácido nucleico o el producto de ADN a un destinatario.

20 En otro aspecto, la divulgación proporciona un medio legible por ordenador que comprende código ejecutable de máquina que, al ser ejecutados por uno o más procesadores informáticos, implementa un método para amplificar un ácido ribonucleico (ARN) diana presente en una muestra biológica obtenida directamente de un sujeto. En una realización, el método comprende: (a) proporcionar un recipiente de reacción que comprende la muestra biológica y los reactivos necesarios para llevar a cabo la amplificación con transcripción inversa en paralelo con la amplificación del ácido desoxirribonucleico (ADN), comprendiendo los reactivos (i) una transcriptasa inversa, (ii) una ADN polimerasa, y (iii) un conjunto de cebadores para el ARN diana, para obtener una mezcla de reacción; y (b) someter la mezcla de reacción en el recipiente de reacción a múltiples ciclos de una reacción de extensión con cebadores para generar un producto de ADN amplificado que sea indicativo de la presencia del ARN diana, comprendiendo cada ciclo (i) incubar la mezcla de reacción a una temperatura de desnaturalización durante una duración de la desnaturalización que es menos de o igual a 60 segundos, seguido de (ii) incubar la mezcla de reacción a una temperatura de elongación durante una duración de elongación menor o igual a 60 segundos, amplificando, de este modo, el ARN diana.

35 En otra realización, el método comprende: (a) recibir la muestra biológica que se ha obtenido del sujeto; (a) proporcionar un recipiente de reacción que comprende la muestra biológica y los reactivos necesarios para llevar a cabo la amplificación con transcripción inversa y opcionalmente la amplificación del ácido desoxirribonucleico (ADN), comprendiendo los reactivos (i) una transcriptasa inversa y (ii) un conjunto de cebadores para el ARN diana, para obtener una mezcla de reacción; (c) someter la mezcla de reacción a múltiples ciclos de una reacción de extensión con cebadores para producir una cantidad detectable de producto de ADN amplificado que sea indicativo de la presencia del ARN diana en la muestra biológica; (d) detectar la cantidad de producto de ADN de (c); y (e) enviar información sobre la cantidad de producto de ADN a un destinatario, en donde una cantidad de tiempo para completar (a) - (e) es menor o igual a aproximadamente 30 minutos.

45 En otro aspecto, la divulgación proporciona un medio legible por ordenador que comprende código ejecutable de máquina que, al ser ejecutados por uno o más procesadores informáticos, implementa un método para amplificar un ácido nucleico diana presente en una muestra biológica obtenida directamente de un sujeto. En una realización, el método comprende (a) proporcionar un recipiente de reacción que comprende la muestra biológica y los reactivos necesarios para llevar a cabo la amplificación del ácido nucleico, comprendiendo los reactivos (i) una ADN polimerasa y opcionalmente una transcriptasa inversa, y (ii) un conjunto de cebadores para el ácido nucleico diana, para obtener una mezcla de reacción; y (b) someter la mezcla de reacción en el recipiente de reacción a una pluralidad de series de reacciones de extensión con cebadores para generar producto amplificado a partir del ácido nucleico diana, comprendiendo cada serie dos o más ciclos de (i) incubar la mezcla de reacción en una condición de desnaturalización caracterizada por una temperatura de desnaturalización y una duración de la desnaturalización, seguido de (ii) incubar la mezcla de reacción en una condición de elongación caracterizada por una temperatura de elongación y una duración de elongación, en donde una serie individual difiere de al menos otra serie individual de la pluralidad con respecto a la condición de desnaturalización y/o la condición de elongación.

60 Un aspecto adicional de la divulgación proporciona un sistema para amplificar un ácido nucleico diana en una muestra biológica obtenida de un sujeto. El sistema puede comprender una pantalla de visualización electrónica que comprende una interfaz de usuario que muestra un elemento gráfico al que puede acceder un usuario para ejecutar un protocolo de amplificación para amplificar el ácido nucleico diana en la muestra biológica. El sistema también puede comprender un procesador informático acoplado a la pantalla de visualización electrónica y programado para ejecutar el protocolo de amplificación tras la selección del elemento gráfico por parte del usuario. El protocolo de amplificación puede comprender someter una mezcla de reacción que comprende la muestra biológica y los reactivos necesarios para realizar la amplificación del ácido nucleico a una pluralidad de series de reacciones de extensión con cebadores para generar un producto amplificado que sea indicativo de la presencia del ácido nucleico diana en la muestra biológica. Cada serie de reacciones de extensión con cebadores puede incluir dos o más ciclos de incubación de la

mezcla de reacción en una condición de desnaturalización caracterizada por una temperatura de desnaturalización y una duración de la desnaturalización, seguido de incubación de la mezcla de reacción en una condición de elongación caracterizada por una temperatura de elongación y una duración de elongación. Una serie individual puede diferir de al menos otra serie individual de la pluralidad con respecto a la condición de desnaturalización y/o la condición de elongación.

En algunas realizaciones, el protocolo de amplificación puede comprender además seleccionar un conjunto de cebadores para el ácido nucleico diana. En algunas realizaciones, los reactivos pueden comprender una polimerasa de ácido desoxirribonucleico (ADN), una transcriptasa inversa opcional y un conjunto de cebadores para el ácido nucleico diana. En algunas realizaciones, la interfaz de usuario puede mostrar una pluralidad de elementos gráficos. Cada uno de los elementos gráficos puede asociarse con un protocolo de amplificación dado entre una pluralidad de protocolos de amplificación. En algunas realizaciones, cada uno de los elementos gráficos puede estar asociado con una enfermedad. Un protocolo de amplificación dado entre la pluralidad de protocolos de amplificación puede dirigirse a analizar la presencia de la enfermedad en el sujeto. En algunas realizaciones, la enfermedad puede estar asociada con un virus tal como, por ejemplo, un virus de ARN o un virus de ADN. En algunas realizaciones, el virus puede seleccionarse del grupo que consiste en el virus de inmunodeficiencia humana I (VIH I), virus de inmunodeficiencia humana II (VIH II), un ortomixovirus, virus del Ébola, virus del dengue, virus de la gripe, hepevirus, virus de la hepatitis A, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, virus de la hepatitis D, virus de la hepatitis E, virus de la hepatitis G, virus de Epstein-Barr, virus de la mononucleosis, citomegalovirus, virus del SARS, virus de la fiebre del Nilo occidental, virus de la polio, virus del sarampión, virus del herpes simple, virus de la viruela, adenovirus y virus de la varicela. En algunas realizaciones, el virus de la gripe se puede seleccionar del grupo que consiste en el virus H1N1, virus H3N2, virus H7N9 y virus H5N1. En algunas realizaciones, el adenovirus puede ser adenovirus tipo 55 (ADV55) o adenovirus tipo 7 (ADV7). En algunas realizaciones, el virus de la hepatitis C puede ser un virus de ARN de hepatitis C (ARN-VHC) blindado. En algunas realizaciones, la enfermedad puede estar asociada con una bacteria patógena (p. ej., *Mycobacterium tuberculosis*) o un protozoo patógeno (p. ej., *Plasmodium*).

En algunas realizaciones, el ácido nucleico diana puede estar asociado con una enfermedad. En algunas realizaciones, el protocolo de amplificación puede dirigirse a analizar la presencia de la enfermedad basándose en la presencia del producto amplificado. En algunas realizaciones, la enfermedad puede estar asociada con un virus tal como, por ejemplo, un virus de ARN o un virus de ADN. En algunas realizaciones, el virus puede seleccionarse del grupo que consiste en el virus de inmunodeficiencia humana I (VIH I), virus de inmunodeficiencia humana II (VIH II), un ortomixovirus, virus del Ébola, virus del dengue, virus de la gripe, hepevirus, virus de la hepatitis A, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, virus de la hepatitis D, virus de la hepatitis E, virus de la hepatitis G, virus de Epstein-Barr, virus de la mononucleosis, citomegalovirus, virus del SARS, virus de la fiebre del Nilo occidental, virus de la polio, virus del sarampión, virus del herpes simple, virus de la viruela, adenovirus y virus de la varicela. En algunas realizaciones, el virus de la gripe se puede seleccionar del grupo que consiste en el virus H1N1, Virus H3N2, Virus H7N9 y virus H5N1. En algunas realizaciones, el adenovirus puede ser adenovirus tipo 55 (ADV55) o adenovirus tipo 7 (ADV7). En algunas realizaciones, el virus de la hepatitis C puede ser un virus de ARN de hepatitis C (ARN-VHC) blindado. En algunas realizaciones, la enfermedad puede estar asociada con una bacteria patógena (p. ej., *Mycobacterium tuberculosis*) o un protozoo patógeno (p. ej., *Plasmodium*).

Aspectos y ventajas adicionales de la presente divulgación serán fácilmente evidentes para los expertos en esta materia a partir de la siguiente descripción detallada, en donde solo se muestran y describen realizaciones ilustrativas de la presente divulgación. Como se comprenderá, la presente divulgación es capaz de otras y diferentes realizaciones, y sus diversos detalles son capaces de modificaciones en varios aspectos obvios, todo sin apartarse de la divulgación. Por consiguiente, los dibujos y la divulgación han de considerarse de naturaleza ilustrativa y no restrictiva.

Breve descripción de los dibujos

Las nuevas características de la invención se exponen con particularidad en las reivindicaciones adjuntas. Se obtendrá una mejor comprensión de las características y ventajas de la presente invención haciendo referencia a la siguiente descripción detallada que expone realizaciones ilustrativas, en la que se utilizan los principios de la invención, y los dibujos adjuntos (también "Figura" y "Fig." en el presente documento), de los que:

La **Figura 1** es un esquema que representa un sistema de ejemplo.

Las **Fig. 2A** y **2B** son gráficos que representan resultados de ejemplos de reacciones de amplificación de ácidos nucleicos descritas en el Ejemplo 1.

Las **Fig. 3A** y **3B** son gráficos que representan resultados de ejemplos de reacciones de amplificación de ácidos nucleicos descritas en el Ejemplo 1.

Las **Fig. 4A** y **4B** son gráficos que representan resultados de ejemplos de reacciones de amplificación de ácidos nucleicos descritas en el Ejemplo 2.

La **Fig. 5** es un gráfico que representa los resultados de ejemplos de reacciones de amplificación de ácidos nucleicos descritas en el Ejemplo 3.

Las **Fig. 6A** y **6B** son gráficos que representan resultados de ejemplos de reacciones de amplificación de ácidos nucleicos descritas en el Ejemplo 4.

Las **Fig. 7A y 7B** son gráficos que representan resultados de ejemplos de reacciones de amplificación de ácidos nucleicos descritas en el Ejemplo 4.

Las **Fig. 8A y 8B** son gráficos que representan resultados de ejemplos de reacciones de amplificación de ácidos nucleicos descritas en el Ejemplo 4.

5 Las **Fig. 9A y 9B** son gráficos que representan resultados de ejemplos de reacciones de amplificación de ácidos nucleicos descritas en el Ejemplo 4.

Las **Fig. 10A y 10B** son gráficos que representan resultados de ejemplos de reacciones de amplificación de ácidos nucleicos descritas en el Ejemplo 4.

10 La **Fig. 11** es un gráfico que representa los resultados de ejemplos de reacciones de amplificación de ácidos nucleicos descritas en el Ejemplo 5.

La **Fig. 12** es un gráfico que representa los resultados de ejemplos de reacciones de amplificación de ácidos nucleicos descritas en el Ejemplo 5.

La **Fig. 13** es un gráfico que representa los resultados de ejemplos de reacciones de amplificación de ácidos nucleicos descritas en el Ejemplo 7.

15 La **Fig. 14** es un gráfico que representa los resultados de ejemplos de reacciones de amplificación de ácidos nucleicos descritas en el Ejemplo 9.

Las **Fig. 15A y 15B** son gráficos que representan resultados de ejemplos de reacciones de amplificación de ácidos nucleicos descritas en el Ejemplo 10.

20 Las **Fig. 16A y 16B** son gráficos que representan resultados de ejemplos de reacciones de amplificación de ácidos nucleicos descritas en el Ejemplo 10.

La **Fig. 17** es un gráfico que representa los resultados de las reacciones de amplificación de ácidos nucleicos descritas en el Ejemplo 11.

La **Fig. 18** es un gráfico que representa los resultados de las reacciones de amplificación de ácidos nucleicos descritas en el Ejemplo 12.

25 Las **Fig. 19A y 19B** son gráficos que representan resultados de reacciones de amplificación de ácidos nucleicos descritas en el Ejemplo 13.

La **Fig. 20** es un gráfico que representa los resultados de las reacciones de amplificación de ácidos nucleicos descritas en el Ejemplo 14.

30 La **Fig. 21** es un gráfico que representa los resultados de las reacciones de amplificación de ácidos nucleicos descritas en el Ejemplo 15.

Las **Fig. 22A y 22B** son gráficos que representan resultados de reacciones de amplificación de ácidos nucleicos descritas en el Ejemplo 17.

Las **Fig. 23A, Fig. 23B y Fig. 23C** son gráficos que representan resultados de reacciones de amplificación de ácidos nucleicos descritas en el Ejemplo 18.

35 Las **Fig. 24A y 24B** son gráficos que representan resultados de reacciones de amplificación de ácidos nucleicos descritas en el Ejemplo 19.

Las **Fig. 25A y 25B** son gráficos que representan resultados de reacciones de amplificación de ácidos nucleicos descritas en el Ejemplo 19.

40 Las **Fig. 26A y 26B** son gráficos que representan resultados de reacciones de amplificación de ácidos nucleicos descritas en el Ejemplo 20.

La **Fig. 27** es un gráfico que representa los resultados de las reacciones de amplificación de ácidos nucleicos descritas en el Ejemplo 21.

La **Fig. 28A** es un esquema de una pantalla electrónica de ejemplo que tiene una interfaz de usuario de ejemplo.

45 La **Fig. 28B** es un esquema de una pantalla electrónica de ejemplo que tiene una interfaz de usuario de ejemplo.

Descripción detallada

50 Aunque diversas realizaciones de la invención se han mostrado y descrito en el presente documento, será obvio para los expertos en la materia que tales realizaciones se proporcionan solamente a modo de ejemplo. Se pueden producir numerosas variaciones, cambios y sustituciones para los expertos en la materia sin apartarse de la invención. Debería entenderse que se pueden emplear diversas alternativas a las realizaciones de la invención descritas en el presente documento.

55 Como se usa en la memoria descriptiva y las reivindicaciones, la forma singular "un", "una", "el" y "la" incluyen referencias plurales a menos que el contexto indique claramente otra cosa. Por ejemplo, la expresión "una célula" incluye una pluralidad de células, incluyendo mezclas de las mismas.

60 Tal como se usa en el presente documento, los términos "amplificar" y "amplificación" se usan indistintamente y generalmente se refieren a generar una o más copias o "producto amplificado" de un ácido nucleico. La expresión "amplificación de ADN" generalmente se refiere a generar una o más copias de una molécula de ADN o "producto de ADN amplificado". La expresión "amplificación con transcripción inversa" generalmente se refiere a la generación de ácido desoxirribonucleico (ADN) a partir de una plantilla de ácido ribonucleico (ARN) a través de la acción de una transcriptasa inversa.

65 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "umbral de ciclo" o "Ct" (por sus siglas en inglés), generalmente se refiere al ciclo durante el termociclado en el que un aumento en una señal detectable debido

al producto amplificado alcanza un nivel estadísticamente significativo por encima de la señal de fondo.

Tal como se usa en el presente documento, los términos "desnaturalizar" y "desnaturalización" se usan indistintamente y generalmente se refieren al desenrollado total o parcial de la estructura helicoidal de un ácido nucleico bicatenario y, en algunos casos, al desenrollado de la estructura secundaria de un ácido nucleico monocatenario. La desnaturalización puede incluir la inactivación de la(s) pared(es) celular(s) de un patógeno o la cubierta de un virus, y la inactivación de la(s) proteína(s) de los inhibidores. Las condiciones en las cuales se puede producir la desnaturalización incluyen una "temperatura de desnaturalización" que generalmente se refiere a una temperatura a la cual se permite que se produzca la desnaturalización y una "duración de la desnaturalización" que generalmente se refiere a una cantidad de tiempo asignado para que se produzca la desnaturalización.

Tal como se usa en el presente documento, el término "elongación" generalmente se refiere a la incorporación de nucleótidos a un ácido nucleico en una forma dirigida por plantilla. La elongación se puede producir a través de la ayuda de una enzima, tal como, por ejemplo, una polimerasa o transcriptasa inversa. Las condiciones en las cuales se puede producir la elongación incluyen una "temperatura de elongación" que generalmente se refiere a una temperatura a la cual se permite que se produzca la elongación y una "duración de la elongación" que generalmente se refiere a una cantidad de tiempo asignado para que se produzca la elongación.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "ácido nucleico" generalmente se refiere a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, ya sea desoxirribonucleótidos (dNTP) o ribonucleótidos (rNTP), o análogos de los mismos. Los ácidos nucleicos pueden tener cualquier estructura tridimensional y pueden realizar cualquier función, conocida o desconocida. Ejemplos no limitantes de ácidos nucleicos incluyen ADN, ARN, regiones codificantes o no codificantes de un gen o fragmento génico, loci (locus) definidos a partir del análisis de enlace, exones, intrones, ARN mensajero (ARNm), ARN de transferencia, ARN ribosómico, ARN de interferencia pequeño (ARNip), ARN de horquilla corta (ARNhc), microARN (miARN), ribozimas, ADNc, ácidos nucleicos recombinantes, ácidos nucleicos ramificados, plásmidos, vectores, ADN aislado de cualquier secuencia, ARN aislado de cualquier secuencia, sondas de ácido nucleico y cebadores. Un ácido nucleico puede comprender uno o más nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y análogos de nucleótidos. Si están presentes, se pueden hacer modificaciones de la estructura de los nucleótidos antes o después del ensamblaje del ácido nucleico. La secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico puede interrumpirse por componentes no nucleótidos. Un ácido nucleico puede modificarse adicionalmente después de la polimerización, tal como por conjugación o unión con un agente indicador.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "reacción de extensión con cebadores" generalmente se refiere a la desnaturalización de un ácido nucleico bicatenario, unión de un cebador a una o ambas cadenas del ácido nucleico desnaturalizado, seguido por la elongación de los cebadores.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "mezcla de reacción" generalmente se refiere a una composición que comprende reactivos necesarios para completar la amplificación de ácidos nucleicos (p. ej., amplificación de ADN, amplificación de ARN), con ejemplos no limitantes de dichos reactivos que incluyen conjuntos de cebadores que tienen especificidad por el ARN diana o el ADN diana, ADN producido a partir de la transcripción inversa de ARN, una ADN polimerasa, una transcriptasa inversa (p. ej., para la transcripción inversa de ARN), tampones adecuados (incluidos los tampones zwitteriónicos), cofactores (p. ej., cationes divalentes y monovalentes), dNTP y otras enzimas (p. ej., uracilo-ADN glicosilasa (UNG, por sus siglas en inglés)), etc.). En algunos casos, las mezclas de reacción también pueden comprender uno o más agentes indicadores.

Tal como se usa en el presente documento, un "agente indicador" generalmente se refiere a una composición que produce una señal detectable, cuya presencia o ausencia puede usarse para detectar la presencia de producto amplificado.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "ácido nucleico diana" generalmente se refiere a una molécula de ácido nucleico en una población inicial de moléculas de ácidos nucleicos que tiene una secuencia de nucleótidos cuya presencia, cantidad y/o secuencia o cambios en uno o más de estos, se desea determinar. Un ácido nucleico diana puede ser cualquier tipo de ácido nucleico, incluyendo ADN, ARN y análogos de los mismos. Tal como se usa en el presente documento, un "ácido ribonucleico diana (ARN)" generalmente se refiere a un ácido nucleico diana que es ARN. Tal como se usa en el presente documento, un "ácido desoxirribonucleico (ADN) diana" generalmente se refiere a un ácido nucleico diana que es ADN.

Tal como se usa en el presente documento, el término "sujeto", generalmente se refiere a una entidad o un medio que tiene información genética comprobable o detectable. Un sujeto puede ser una persona o un individuo. Un sujeto puede ser un vertebrado, tal como, por ejemplo, un mamífero. Ejemplos no limitantes de mamíferos incluyen murinos, simios, seres humanos, animales de granja, animales de deporte y mascotas. Otros ejemplos de temas incluyen comida, plantas, suelo y agua.

En un aspecto, La divulgación proporciona un método para amplificar un ácido ribonucleico (ARN) diana presente en una muestra biológica obtenida directamente de un sujeto. El método comprende: (a) proporcionar un recipiente de reacción que comprende la muestra biológica y los reactivos necesarios para llevar a cabo la amplificación con

transcripción inversa en paralelo con la amplificación del ácido desoxirribonucleico (ADN), comprendiendo los reactivos (i) una transcriptasa inversa, (ii) una ADN polimerasa, y (iii) un conjunto de cebadores para el ARN diana, para obtener una mezcla de reacción; y (b) someter la mezcla de reacción en el recipiente de reacción a múltiples ciclos de una reacción de extensión con cebadores para generar un producto de ADN amplificado que sea indicativo de la presencia del ARN diana, comprendiendo cada ciclo (i) incubar la mezcla de reacción a una temperatura de desnaturalización durante una duración de la desnaturalización que es menos de o igual a 60 segundos, seguido de (ii) incubar la mezcla de reacción a una temperatura de elongación durante una duración de elongación menor o igual a 60 segundos, amplificando, de este modo, el ARN diana.

En otro aspecto, La divulgación proporciona un método para amplificar un ácido ribonucleico (ARN) diana presente en una muestra biológica obtenida directamente de un sujeto. El método comprende: (a) recibir la muestra biológica que se ha obtenido del sujeto; (a) proporcionar un recipiente de reacción que comprende la muestra biológica y los reactivos necesarios para llevar a cabo la amplificación con transcripción inversa y opcionalmente la amplificación del ácido desoxirribonucleico (ADN), comprendiendo los reactivos (i) una transcriptasa inversa y (ii) un conjunto de cebadores para el ARN diana, para obtener una mezcla de reacción; (c) someter la mezcla de reacción a múltiples ciclos de una reacción de extensión con cebadores para producir una cantidad detectable de producto de ADN amplificado que sea indicativo de la presencia del ARN diana en la muestra biológica; (d) detectar la cantidad de producto de ADN amplificado de (c); y (e) enviar información sobre la cantidad de producto de ADN amplificado a un destinatario, en donde una cantidad de tiempo para completar (a) - (e) es menor o igual a aproximadamente 30 minutos.

En un aspecto, la divulgación proporciona un método para amplificar un ácido ribonucleico diana presente en una muestra biológica obtenida directamente de un sujeto. El método comprende: (a) proporcionar un recipiente de reacción que comprende la muestra biológica y los reactivos necesarios para llevar a cabo la amplificación del ácido nucleico, comprendiendo los reactivos (i) una polimerasa de ácido desoxirribonucleico (ADN) y opcionalmente una transcriptasa inversa, y (ii) un conjunto de cebadores para el ácido nucleico diana, para obtener una mezcla de reacción; y (b) someter la mezcla de reacción en el recipiente de reacción a una pluralidad de series de reacciones de extensión con cebadores para generar producto amplificado que sea indicativo de la presencia del ácido nucleico diana en la muestra biológica, comprendiendo cada serie dos o más ciclos de (i) incubar la mezcla de reacción en una condición de desnaturalización caracterizada por una temperatura de desnaturalización y una duración de la desnaturalización, seguido de (ii) incubar la mezcla de reacción en una condición de elongación caracterizada por una temperatura de elongación y una duración de elongación, en donde una serie individual difiere de al menos otra serie individual de la pluralidad con respecto a la condición de desnaturalización y/o la condición de elongación.

En cualquiera de los diversos aspectos, se amplifica el ácido nucleico de una muestra biológica obtenida de un sujeto. En algunos casos, la muestra biológica se obtiene directamente del sujeto. Una muestra biológica obtenida directamente de un sujeto generalmente se refiere a una muestra biológica que no se ha procesado después de obtenerse del sujeto, con la excepción de cualquier medio utilizado para recoger la muestra biológica del sujeto para su posterior procesamiento. Por ejemplo, la sangre se obtiene directamente de un sujeto accediendo al sistema circulatorio del sujeto, extrayendo la sangre del sujeto (p. ej., a través de una aguja) e introduciendo la sangre extraída en un receptáculo. El receptáculo puede comprender reactivos (p. ej., anticoagulantes) de modo que la muestra de sangre sea útil para análisis adicionales. En otro ejemplo, se puede usar un hisopo para acceder a las células epiteliales en una superficie orofaríngea del sujeto. Después de obtener la muestra biológica del sujeto, el hisopo que contiene la muestra biológica puede ponerse en contacto con un fluido (p. ej., un tampón) para recoger el fluido biológico del hisopo.

En algunas realizaciones, una muestra biológica no se ha purificado cuando se proporciona en un recipiente de reacción. En algunas realizaciones, el ácido nucleico de una muestra biológica no se ha extraído cuando la muestra biológica se proporciona a un recipiente de reacción. Por ejemplo, el ARN o ADN en una muestra biológica puede no extraerse de la muestra biológica cuando se proporciona la muestra biológica a un recipiente de reacción. Por otra parte, en algunas realizaciones, un ácido nucleico diana (p. ej., un ARN diana o ADN diana) presente en una muestra biológica puede no concentrarse antes de proporcionar la muestra biológica a un recipiente de reacción.

Cualquier muestra biológica adecuada que comprenda ácido nucleico puede obtenerse de un sujeto. Una muestra biológica puede ser materia sólida (p. ej., tejido biológico) o puede ser un fluido (p. ej., un fluido biológico). En general, un fluido biológico puede incluir cualquier fluido asociado con organismos vivos. Ejemplos no limitantes de una muestra biológica incluyen sangre (o componentes de la sangre, p. ej., glóbulos blancos, glóbulos rojos, plaquetas) obtenidas de cualquier ubicación anatómica (p. ej., tejido, sistema circulatorio, médula ósea) de un sujeto, células obtenidas de cualquier ubicación anatómica de un sujeto, piel, corazón, pulmón, riñón, aliento, médula ósea, deposición, semen, fluido vaginal, fluidos intersticiales derivados de tejido tumoral, mama, páncreas, líquido cefalorraquídeo, tejido, frotis faríngeo, biopsia, líquido placentario, líquido amniótico, hígado, músculo, músculo liso, vejiga, vesícula biliar, colon, intestino, cerebro, fluidos de cavidades, esputo, pus, microbiota, meconio, leche materna, próstata, esófago, tiroides, suero, saliva, orina, fluido gástrico y digestivo, lágrimas, líquidos oculares, sudor, mucosidad, cerumen, aceite, secreciones glandulares, líquido espinal, cabello, uñas, células de piel, plasma, hisopo nasal o lavado nasofaríngeo, líquido espinal, sangre de cordón umbilical, fluidos enfáticos y/u otras excreciones o tejidos corporales.

Se puede obtener una muestra biológica de un sujeto por cualquier medio conocido en la técnica. Ejemplos no limitantes de los medios para obtener una muestra biológica directamente de un sujeto incluyen el acceso al sistema circulatorio (p. ej., por vía intravenosa o intraarterial a través de una jeringa u otra aguja), recoger una muestra biológica secretada (p. ej., heces, orina, esputo, saliva, etc.), quirúrgicamente (p. ej., biopsia), hisopado (p. ej., hisopo bucal, hisopo orofaríngeo), pipeteando y respirando. Por otra parte, se puede obtener una muestra biológica de cualquier parte anatómica de un sujeto donde se encuentre la muestra biológica deseada.

En cualquiera de los diversos aspectos, un ácido nucleico diana se amplifica para generar un producto amplificado. Un ácido nucleico diana puede ser un ARN diana o un ADN diana. En los casos en que el ácido nucleico diana es un ARN diana, el ARN diana puede ser cualquier tipo de ARN, incluyendo los tipos de ARN descritos en otra parte del presente documento. En algunas realizaciones, el ARN diana es ARN vírico. En algunas realizaciones, el ARN vírico puede ser patógeno para el sujeto. Ejemplos no limitantes de ARN vírico patógeno incluyen el virus de inmunodeficiencia humana I (VIH I), virus de inmunodeficiencia humana II (VIH II), ortomixovirus, virus del Ébola, virus del dengue, virus de la gripe (p. ej., H1N1, H3N2, H7N9 o H5N1), hepesvirus, virus de la hepatitis A, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C (p. ej., virus ARN-VHC blindado), virus de la hepatitis D, virus de la hepatitis E, virus de la hepatitis G, virus de Epstein-Barr, virus de la mononucleosis, citomegalovirus, virus del SARS, virus de la fiebre del Nilo occidental, virus de la polio y virus del sarampión.

En los casos en que el ácido nucleico diana es un ADN diana, el ADN diana puede ser cualquier tipo de ADN, incluyendo los tipos de ADN descritos en otra parte del presente documento. En algunas realizaciones, el ADN diana es ADN vírico. En algunas realizaciones, el ADN vírico puede ser patógeno para el sujeto. Ejemplos no limitantes de virus de ADN incluyen el virus del herpes simple, viruela, adenovirus (p. ej., Adenovirus tipo 55, Adenovirus tipo 7) y Varicella virus (p. ej., Varicela). En algunos casos, un ADN diana puede ser un ADN bacteriano. El ADN bacteriano puede ser de una bacteria patógena para el sujeto tal como, por ejemplo, *Mycobacterium tuberculosis* - una bacteria que se sabe que causa tuberculosis. En algunos casos, un ADN diana puede ser un ADN de un protozoo patógeno, tal como, p. ej. uno o más protozoos del tipo *Plasmodium* que puede causar malaria.

En cualquiera de los diversos aspectos de la presente divulgación, se proporciona una muestra biológica obtenida de un sujeto con reactivos necesarios para la amplificación de ácidos nucleicos en un recipiente de reacción para obtener una mezcla de reacción. Se puede usar cualquier recipiente de reacción adecuado. En algunas realizaciones, un recipiente de reacción comprende un cuerpo que puede incluir una superficie interior, una superficie exterior, un final abierto y un final cerrado opuesto. En algunas realizaciones, un recipiente de reacción puede comprender una tapa. La tapa se puede configurar para poner en contacto el cuerpo en su extremo abierto, de modo que cuando se hace contacto, el extremo abierto del recipiente de reacción se cierra. En algunos casos, la tapa está asociada permanentemente con el recipiente de reacción de manera que permanece fijada al recipiente de reacción en configuraciones abiertas y cerradas. En algunos casos, la tapa es extraíble, de manera que cuando el recipiente de reacción está abierto, la tapa se separa del recipiente de reacción. En algunas realizaciones, un recipiente de reacción puede estar sellado, opcionalmente herméticamente sellado.

Un recipiente de reacción puede ser de tamaño, forma, peso y configuración variados. En algunos ejemplos, un recipiente de reacción puede ser redondo u ovalado con forma tubular. En algunas realizaciones, un recipiente de reacción puede tener forma rectangular, cuadrada, diamante, circular, elíptica o triangular. Un recipiente de reacción puede tener forma regular o forma irregular. En algunas realizaciones, el extremo cerrado de un recipiente de reacción puede tener una superficie cónica, redondeada o plana. Ejemplos no limitantes de tipos de un recipiente de reacción incluyen un tubo, un pocillo, un tubo capilar, un cartucho, una cubeta, un tubo de centrífuga o una punta de pipeta. Los recipientes de reacción pueden construirse de cualquier material adecuado con ejemplos no limitantes de tales materiales que incluyen vidrios, metales, plásticos y combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones, un recipiente de reacción es parte de una serie de recipientes de reacción. Una serie de recipientes de reacción puede ser particularmente útil para automatizar métodos y/o procesar simultáneamente múltiples muestras. Por ejemplo, un recipiente de reacción puede ser un pocillo de una placa de micropocillos compuesta por varios pocillos. En otro ejemplo, un recipiente de reacción puede mantenerse en un pocillo de un bloque térmico de un termociclador, en donde el bloque del ciclo térmico comprende múltiples pocillos, cada uno capaz de recibir un recipiente de muestra. Una matriz compuesta por recipientes de reacción puede comprender cualquier número apropiado de recipientes de reacción. Por ejemplo, una matriz puede comprender al menos 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 35, 48, 96, 144, 384 o más recipientes de reacción. Una parte del recipiente de reacción de una serie de recipientes de reacción también puede ser dirigible individualmente mediante un dispositivo de manipulación de fluidos, de manera que el dispositivo de manipulación de fluidos pueda identificar correctamente un recipiente de reacción y dispensar materiales fluidos apropiados en el recipiente de reacción. Los dispositivos de manipulación de fluidos pueden ser útiles para automatizar la adición de materiales fluidos a los recipientes de reacción.

En algunas realizaciones, un recipiente de reacción puede comprender múltiples zonas térmicas. Las zonas térmicas dentro de un recipiente de reacción se pueden lograr exponiendo diferentes regiones del recipiente de reacción a diferentes condiciones de ciclos de temperatura. Por ejemplo, un recipiente de reacción puede comprender una zona térmica superior y una zona térmica inferior. La zona térmica superior puede ser capaz de recibir una muestra biológica y reactivos necesarios para obtener una mezcla de reacción para la amplificación de ácidos nucleicos. La mezcla de

reacción se puede someter a un primer protocolo de termociclado. Después de un número deseado de ciclos, por ejemplo, la mezcla de reacción puede filtrarse lentamente, pero de forma continua desde la zona térmica superior a la zona térmica inferior. En la zona térmica inferior, la mezcla de reacción se somete después a un número deseado de ciclos de un segundo protocolo de termociclado diferente al de la zona térmica superior. Dicha estrategia puede ser particularmente útil cuando se usa PCR anidada para amplificar el ADN. En algunas realizaciones, se pueden crear zonas térmicas dentro de un recipiente de reacción con la ayuda de materiales de estratificación termosensibles dentro de los recipientes de reacción. En dichos casos, el calentamiento de los materiales de estratificación termosensibles puede usarse para liberar mezclas de reacción de una zona térmica a la siguiente. En algunas realizaciones, el recipiente de reacción comprende 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más zonas térmicas.

En algunas realizaciones, un recipiente de reacción que comprende zonas térmicas se puede usar para procesar una muestra biológica antes de la amplificación de ácidos nucleicos. Por ejemplo, se puede añadir un agente de lisis a una primera zona térmica de un recipiente de reacción antes de añadir una muestra biológica y los reactivos necesarios para la amplificación de ácidos nucleicos. Cuando la muestra biológica y los reactivos se añaden al recipiente de reacción que comprende el agente de lisis, se obtiene una mezcla de reacción capaz de lisar especies (p. ej., células o partículas víricas) dentro del producto biológico. De manera alternativa, se puede añadir un agente de lisis a la primera zona térmica de la mezcla de reacción simultáneamente con la muestra biológica y los reactivos. Someter la primera zona térmica a condiciones de temperatura adecuadas para la acción del agente de lisis puede usarse para lisar células y partículas víricas en la muestra biológica en la primera zona térmica, de manera que los ácidos nucleicos en la muestra biológica se liberan en la mezcla de reacción. Después de la lisis, se puede permitir entonces, que la mezcla de reacción entre en una segunda zona térmica del recipiente de reacción para la amplificación del ácido nucleico liberado, usando los métodos de amplificación descritos en el presente documento.

En los casos en que se desea un agente de lisis, se puede usar cualquier agente de lisis adecuado conocido en la técnica, incluyendo agentes de lisis disponibles comercialmente. Ejemplos no limitantes de agentes de lisis incluyen Tris-HCl, EDTA, detergentes (p. ej., Triton X-100, SDS), lisozima, glucolasa, proteinasa E, endolisinas víricas, exolysinszymolose, liticasa, proteinasa K, endolisinas y exolisinas de bacteriófagos, endolisinas del bacteriófago PM2, endolisinas del bacteriófago PBSX de *B. subtilis*, endolisinas de los profagos de *Lactobacillus* Lj928, Lj965, bacteriófago 15 Phiadh, endolisina del bacteriófago Cp-1 de *Streptococcus pneumoniae*, lisina de peptidoglucano bifuncional del bacteriófago B30 de *Streptococcus agalactiae*, endolisinas y exolisinas de bacterias profágicas, endolisinas de bacteriófagos de *Listeria*, holin-endolisina, genes de lisis celular 20, holWMY del fago varphiWMY de *Staphylococcus wameri* M, ly5WMY del fago varphiWMY de *Staphylococcus wameri* M y combinaciones de los mismos. En algunos casos, un tampón puede comprender un agente de lisis (p. ej., un tampón de lisis). Un ejemplo de un tampón de lisis es el hidróxido de sodio (NaOH).

Se puede usar cualquier tipo de reacción de amplificación de ácidos nucleicos conocida en la técnica para amplificar un ácido nucleico diana y generar un producto amplificado. Por otra parte, la amplificación de un ácido nucleico puede ser lineal, exponencial o una combinación de los mismos. La amplificación puede estar basada en emulsión o puede estar basada en no emulsión. Ejemplos no limitantes de métodos de amplificación de ácidos nucleicos incluyen transcripción inversa, extensión con cebadores, reacción en cadena de la polimerasa, reacción en cadena de la ligasa, amplificación dependiente de helicasa, amplificación asimétrica, amplificación en círculo rodante y amplificación de desplazamiento múltiple (MDA, por sus siglas en inglés). En algunas realizaciones, el producto amplificado puede ser ADN. En los casos en que se amplifica un ARN diana, el ADN puede obtenerse por transcripción inversa del ARN y la posterior amplificación del ADN puede usarse para generar un producto de ADN amplificado. El producto de ADN amplificado puede ser indicativo de la presencia del ARN diana en la muestra biológica. En casos donde el ADN se amplifica, se puede emplear cualquier método de amplificación de ADN conocido en la técnica. Ejemplos no limitantes de métodos de amplificación de ADN incluyen la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), variantes de PCR (p. ej., PCR en tiempo real, PCR específica de alelo, PCR de ensamblaje, PCR asimétrica, PCR digital, PCR en emulsión, PCR con marcación, PCR dependiente de helicasa, PCR anidada, PCR de inicio en caliente, PCR inversa, PCR específica de metilación, PCR minicebador, PCR múltiple, PCR anidada, PCR de extensión solapante, PCR térmica de entrelazado asimétrico, PCR touchdown) y reacción en cadena de la ligasa (LCR, por sus siglas en inglés). En algunos casos, la amplificación de ADN es lineal. En algunos casos, la amplificación de ADN es exponencial. En algunos casos, la amplificación de ADN se logra con PCR anidada, que puede mejorar la sensibilidad de la detección de productos de ADN amplificados.

En diversos aspectos, las reacciones de amplificación de ácidos nucleicos descritas en el presente documento pueden realizarse en paralelo. En general, las reacciones de amplificación paralelas son reacciones de amplificación que se producen en el mismo recipiente de reacción y al mismo tiempo. Pueden realizarse reacciones de amplificación de ácidos nucleicos en paralelo, por ejemplo, incluyendo reactivos necesarios para cada reacción de amplificación de ácidos nucleicos en un recipiente de reacción para obtener una mezcla de reacción y sometiendo la mezcla de reacción a las condiciones necesarias para cada reacción de amplificación de ácidos nucleicos. Por ejemplo, la amplificación con transcripción inversa y la amplificación del ADN pueden realizarse en paralelo, proporcionando reactivos necesarios para que se formen ambos métodos de amplificación en un recipiente de reacción para obtener una mezcla de reacción y sometiendo la mezcla de reacción a condiciones adecuadas para conducir ambas reacciones de amplificación. El ADN generado a partir de la transcripción inversa del ARN puede amplificarse en paralelo para generar un producto de ADN amplificado. Cualquier número adecuado de reacciones de amplificación de ácidos

nucleicos puede realizarse en paralelo. En algunos casos, se llevan a cabo al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más reacciones de amplificación de ácidos nucleicos en paralelo.

5 Una ventaja de realizar reacciones de amplificación de ácidos nucleicos en paralelo puede incluir transiciones rápidas entre reacciones de amplificación de ácidos nucleicos acopladas. Por ejemplo, un ácido nucleico diana (p. ej., ARN diana, ADN diana) puede extraerse o liberarse de una muestra biológica durante las fases de calentamiento de la amplificación de ácidos nucleicos en paralelo. En el caso de un ARN diana, por ejemplo, la muestra biológica que comprende el ARN diana puede calentarse y el ARN diana liberarse de la muestra biológica. El ARN diana liberado puede comenzar inmediatamente la transcripción inversa (a través de la amplificación con transcripción inversa) para producir ADN complementario. El ADN complementario se puede amplificar después inmediatamente, a menudo en el orden de segundos. Los tiempos cortos entre la liberación de un ARN diana de una muestra biológica y la transcripción inversa del ARN diana al ADN complementario pueden ayudar a minimizar los efectos de los inhibidores en la muestra biológica que pueden impedir la transcripción inversa y/o la amplificación del ADN.

15 En cualquiera de los diversos aspectos, se pueden utilizar conjuntos de cebadores dirigidos a un ácido nucleico diana para conducir la reacción de amplificación del ácido nucleico. Los conjuntos de cebadores generalmente comprenden uno o más cebadores. Por ejemplo, un conjunto de cebadores puede comprender aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más cebadores. En algunos casos, un conjunto de cebadores o puede comprender cebadores dirigidos a diferentes productos amplificados o diferentes reacciones de amplificación de ácidos nucleicos. Por ejemplo, un conjunto de cebadores puede comprender un primer cebador necesario para generar una primera cadena de producto de ácido nucleico que sea complementaria al menos a una porción del ácido nucleico diana y un segundo cebador complementario al producto de cadena de ácido nucleico necesario para generar una segunda cadena de producto de ácido nucleico que es complementaria a al menos una porción de la primera cadena de producto de ácido nucleico.

25 Por ejemplo, un conjunto de cebadores puede dirigirse a un ARN diana. El conjunto de cebadores puede comprender un primer cebador que se puede usar para generar una primera cadena de producto de ácido nucleico que es complementaria a al menos una porción del ARN diana. En el caso de una reacción de transcripción inversa, la primera cadena de producto de ácido nucleico puede ser ADN. El conjunto de cebadores también puede comprender un segundo cebador que puede usarse para generar una segunda cadena de producto de ácido nucleico que es complementaria a al menos una porción de la primera cadena de producto de ácido nucleico. En el caso de una reacción de transcripción inversa realizada en paralelo con la amplificación de ADN, la segunda cadena de producto de ácido nucleico puede ser una cadena de producto de ácido nucleico (p. ej., ADN) que es complementaria a una cadena de ADN generada a partir de una plantilla de ARN.

35 Cuando se desee, se puede usar cualquier número adecuado de conjuntos de cebadores. Por ejemplo, se pueden usar aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más conjuntos de cebadores. Cuando se usan múltiples conjuntos de cebadores, uno o más conjuntos de cebadores pueden corresponder cada uno a una reacción de amplificación de ácidos nucleicos particular o producto amplificado.

40 En algunas realizaciones, se utiliza una ADN polimerasa. Se puede usar cualquier ADN polimerasa adecuada, incluyendo ADN polimerasas disponibles comercialmente. Una ADN polimerasa generalmente se refiere a una enzima que es capaz de incorporar nucleótidos a una hebra de ADN de una manera unida a la plantilla. Ejemplos no limitantes de ADN polimerasas incluyen polimerasa Taq, polimerasa Tth, polimerasa Tli, polimerasa Pfu, polimerasa VENT, polimerasa DEEPVENT, polimerasa EX-Taq, polimerasa LA-Taq, polimerasas Expand, polimerasa Sso, polimerasa Poc, polimerasa Pab, polimerasa Mth, polimerasa Pho, polimerasa ES4, polimerasa Tru, polimerasa Tac, polimerasa Tne, polimerasa Tma, polimerasa Tih, polimerasa Tfi, polimerasas Taq platinum, polimerasa Hi-Fi, polimerasa TBR, polimerasa Tfl, polimerasa Pfutubo, polimerasa Pyrobest, polimerasa Pwo, polimerasa KOD, polimerasa Bst, polimerasa Sac, fragmento de Klenow y variantes, productos modificados y derivados de las mismas. Para determinadas polimerasas de arranque en caliente, puede ser necesaria una etapa de desnaturalización a 94 °C -95 °C durante 2 minutos a 10 minutos, que puede cambiar el perfil térmico basado en diferentes polimerasas.

55 En algunas realizaciones, se utiliza una transcriptasa inversa. Se puede utilizar cualquier transcriptasa inversa adecuada. Una transcriptasa inversa generalmente se refiere a una enzima que es capaz de incorporar nucleótidos a una cadena de ADN, cuando está unida a una plantilla de ARN. Ejemplos no limitantes de transcriptasas inversas incluyen la transcriptasa inversa de VIH-1, transcriptasa inversa de M-MLV, transcriptasa inversa de AMV, transcriptasa inversa de la telomerasa y variantes, productos modificados y derivados de las mismas.

60 En diversos aspectos, las reacciones de extensión con cebadores se utilizan para generar producto amplificado. Las reacciones de extensión con cebadores generalmente comprenden un ciclo de incubación de una mezcla de reacción a una temperatura de desnaturalización durante una duración de desnaturalización e incubación de una mezcla de reacción a una temperatura de elongación durante una duración de elongación.

65 Las temperaturas de desnaturalización pueden variar dependiendo de, por ejemplo, la muestra biológica particular analizada, la fuente particular de ácido nucleico diana (p. ej., partícula vírica, bacterias) en la muestra biológica, los reactivos utilizados y/o las condiciones de reacción deseadas. Por ejemplo, una temperatura de desnaturalización puede ser de aproximadamente 80 °C a aproximadamente 110 °C. En algunos ejemplos, una temperatura de

desnaturalización puede ser de aproximadamente 90 °C a aproximadamente 100 °C. En algunos ejemplos, una temperatura de desnaturalización puede ser de aproximadamente 90 °C a aproximadamente 97 °C. En algunos ejemplos, una temperatura de desnaturalización puede ser de aproximadamente 92 °C a aproximadamente 95 °C. En otros ejemplos más, una temperatura de desnaturalización puede ser de aproximadamente 80 °, 81 °C, 82 °C, 83 °C, 84 °C, 85 °C, 86 °C, 87 °C, 88 °C, 89 °C, 90 °C, 91 °C, 92 °C, 93 °C, 94 °C, 95 °C, 96 °C, 97 °C, 98 °C, 99 °C u 100 °C.

Las duraciones de desnaturalización pueden variar dependiendo de, por ejemplo, la muestra biológica particular analizada, la fuente particular de ácido nucleico diana (p. ej., partícula vírica, bacterias) en la muestra biológica, los reactivos utilizados y/o las condiciones de reacción deseadas. Por ejemplo, una duración de desnaturalización puede ser menor o igual a 300 segundos, 240 segundos, 180 segundos, 120 segundos, 90 segundos, 60 segundos, 55 segundos, 50 segundos, 45 segundos, 40 segundos, 35 segundos, 30 segundos, 25 segundos, 20 segundos, 15 segundos, 10 segundos, 5 segundos, 2 segundos o 1 segundo. Por ejemplo, una duración de desnaturalización puede no ser superior a 120 segundos, 90 segundos, 60 segundos, 55 segundos, 50 segundos, 45 segundos, 40 segundos, 35 segundos, 30 segundos, 25 segundos, 20 segundos, 15 segundos, 10 segundos, 5 segundos, 2 segundos o 1 segundo.

Las temperaturas de elongación pueden variar dependiendo de, por ejemplo, la muestra biológica particular analizada, la fuente particular de ácido nucleico diana (p. ej., partícula vírica, bacterias) en la muestra biológica, los reactivos utilizados y/o las condiciones de reacción deseadas. Por ejemplo, una temperatura de elongación puede ser de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 80 °C. En algunos ejemplos, una temperatura de elongación puede ser de aproximadamente 35 °C a aproximadamente 72 °C. En algunos ejemplos, una temperatura de elongación puede ser de aproximadamente 45 °C a aproximadamente 65 °C. En algunos ejemplos, una temperatura de elongación puede ser de aproximadamente 35 °C a aproximadamente 65 °C. En algunos ejemplos, una temperatura de elongación puede ser de aproximadamente 40 °C a aproximadamente 60 °C. En algunos ejemplos, una temperatura de elongación puede ser de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 60 °C. En otros ejemplos más, una temperatura de elongación puede ser de unos 35 °, 36 °C, 37 °C, 38 °C, 39 °C, 40 °C, 41 °C, 42 °C, 43 °C, 44 °C, 45 °C, 46 °C, 47 °C, 48 °C, 49 °C, 50 °C, 51 °C, 52 °C, 53 °C, 54 °C, 55 °C, 56 °C, 57 °C, 58 °C, 59 °C, 60 °C, 61 °C, 62 °C, 63 °C, 64 °C, 65 °C, 66 °C, 67 °C, 68 °C, 69 °C, 70 °C, 71 °C, 72 °C, 73 °C, 74 °C, 75 °C, 76 °C, 77 °C, 78 °C, 79 °C u 80 °C.

Las duraciones de elongación pueden variar dependiendo de, por ejemplo, la muestra biológica particular analizada, la fuente particular de ácido nucleico diana (p. ej., partícula vírica, bacterias) en la muestra biológica, los reactivos utilizados y/o las condiciones de reacción deseadas. Por ejemplo, una duración de elongación puede ser menor o igual a 300 segundos, 240 segundos, 180 segundos, 120 segundos, 90 segundos, 60 segundos, 55 segundos, 50 segundos, 45 segundos, 40 segundos, 35 segundos, 30 segundos, 25 segundos, 20 segundos, 15 segundos, 10 segundos, 5 segundos, 2 segundos o 1 segundo. Por ejemplo, una duración de elongación puede no ser superior a 120 segundos, 90 segundos, 60 segundos, 55 segundos, 50 segundos, 45 segundos, 40 segundos, 35 segundos, 30 segundos, 25 segundos, 20 segundos, 15 segundos, 10 segundos, 5 segundos, 2 segundos o 1 segundo.

En cualquiera de los diversos aspectos, se pueden realizar múltiples ciclos de una reacción de extensión con cebadores. Se puede realizar cualquier número adecuado de ciclos. Por ejemplo, el número de ciclos realizados puede ser inferior a aproximadamente 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10 o 5 ciclos. El número de ciclos realizados puede depender de, por ejemplo, el número de ciclos (p. ej., valor de umbral de ciclo (Ct)) necesario para obtener un producto amplificado detectable (p. ej., una cantidad detectable de producto de ADN amplificado que es indicativo de la presencia de un ARN diana en una muestra biológica). Por ejemplo, el número de ciclos necesarios para obtener un producto amplificado detectable (p. ej., una cantidad detectable de producto de ADN que sea indicativo de la presencia de un ARN diana en una muestra biológica) puede ser inferior a aproximadamente 100 ciclos, 75 ciclos, 70 ciclos, 65 ciclos, 60 ciclos, 55 ciclos, 50 ciclos, 40 ciclos, 35 ciclos, 30 ciclos, 25 ciclos, 20 ciclos, 15 ciclos, 10 ciclos o 5 ciclos. Por otra parte, en algunas realizaciones, se puede obtener una cantidad detectable de un producto amplificado (p. ej., una cantidad detectable de producto de ADN que sea indicativa de la presencia de un ARN diana en una muestra biológica) a un valor de umbral de ciclo (Ct) inferior a 100, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10 o 5.

El tiempo durante el cual la amplificación produce una cantidad detectable de producto amplificado indicativa de la presencia de un ácido nucleico diana amplificado puede variar dependiendo de la muestra biológica de la que se obtuvo el ácido nucleico diana, las reacciones particulares de amplificación de ácidos nucleicos a realizar, y el número particular de ciclos de reacción de amplificación deseado. Por ejemplo, la amplificación de un ácido nucleico diana puede producir una cantidad detectable de producto amplificado indicativa de la presencia del ácido nucleico diana en un período de tiempo de 120 minutos o menos; 90 minutos o menos; 60 minutos o menos; 50 minutos o menos; 45 minutos o menos; 40 minutos o menos; 35 minutos o menos; 30 minutos o menos; 25 minutos o menos; 20 minutos o menos; 15 minutos o menos; 10 minutos o menos; o 5 minutos o menos.

En algunas realizaciones, la amplificación de un ARN diana puede producir una cantidad detectable de producto de ADN amplificado indicativa de la presencia del ARN diana en un período de tiempo de 120 minutos o menos; 90 minutos o menos; 60 minutos o menos; 50 minutos o menos; 45 minutos o menos; 40 minutos o menos; 35 minutos o menos; 30 minutos o menos; 25 minutos o menos; 20 minutos o menos; 15 minutos o menos; 10 minutos o menos; o 5 minutos o menos.

En algunas realizaciones, una mezcla de reacción puede someterse a una pluralidad de series de reacciones de extensión con cebadores. Una serie individual de la pluralidad puede comprender múltiples ciclos de una reacción de extensión con cebadores particular, caracterizada, por ejemplo, por condiciones particulares de desnaturalización y elongación como se describe en otra parte del presente documento. Generalmente, cada serie individual difiere de al menos otra serie individual en la pluralidad con respecto a, por ejemplo, una condición de desnaturalización y/o condición de elongación. Una serie individual puede diferir de otra serie individual en una pluralidad de series, por ejemplo, con respecto a uno cualquiera, dos, tres, o los cuatro de temperatura de desnaturalización, duración de la desnaturalización, temperatura de elongación y duración de la elongación. Por otra parte, una pluralidad de series puede comprender cualquier número de series individuales tales como, por ejemplo, al menos aproximadamente o aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más series individuales.

Por ejemplo, una pluralidad de series de reacciones de extensión con cebadores puede comprender una primera serie y una segunda serie. La primera serie, por ejemplo, puede comprender más de diez ciclos de una reacción de extensión con cebadores, donde cada ciclo de la primera serie comprende (i) incubar una mezcla de reacción de aproximadamente 92 °C a aproximadamente 95 °C durante no más de 30 segundos seguido de (ii) incubar la mezcla de reacción de aproximadamente 35 °C a aproximadamente 65 °C durante no más de aproximadamente un minuto. La segunda serie, por ejemplo, puede comprender más de diez ciclos de una reacción de extensión con cebadores, donde cada ciclo de la segunda serie comprende (i) incubar la mezcla de reacción de aproximadamente 92 °C a aproximadamente 95 °C durante no más de 30 segundos seguido de (ii) incubar la mezcla de reacción de aproximadamente 40 °C a aproximadamente 60 °C durante no más de aproximadamente 1 minuto. En este ejemplo en particular, la primera y segunda serie difieren en su condición de temperatura de elongación. El ejemplo, sin embargo, no pretende ser limitante ya que podría usarse cualquier combinación de diferentes condiciones de elongación y desnaturalización.

En algunas realizaciones, el tiempo de aumento (es decir, el tiempo que tarda el termociclador en pasar de una temperatura a otra) y/o la tasa de aumento pueden ser factores importantes en la amplificación. Por ejemplo, la temperatura y el tiempo durante los cuales la amplificación produce una cantidad detectable de producto amplificado indicativa de la presencia de un ácido nucleico diana puede variar dependiendo de la tasa de aumento y/o el tiempo de aumento. La tasa de aumento puede afectar las temperaturas y los tiempos utilizados para la amplificación.

En algunos casos, el tiempo de aumento y/o la tasa de aumento pueden ser diferentes entre ciclos. En algunas situaciones, sin embargo, el tiempo de aumento y/o la tasa de aumento entre ciclos puede ser el mismo. El tiempo de aumento y/o la tasa de aumento se pueden ajustar basándose en las muestras que se están procesando.

En algunas situaciones, se puede determinar el tiempo de aumento entre diferentes temperaturas, por ejemplo, basándose en la naturaleza de la muestra y las condiciones de reacción. La temperatura y el tiempo de incubación exactos también se pueden determinar basándose en la naturaleza de la muestra y las condiciones de reacción. En algunas realizaciones, se puede procesar una sola muestra (p. ej., sometida a condiciones de amplificación) varias veces utilizando múltiples ciclos térmicos, difiriendo cada ciclo térmico, p. ej., por el tiempo de aumento, temperatura y/o tiempo de incubación. Entonces se puede elegir el ciclo térmico mejor u óptimo para esa muestra en particular. Esto proporciona un método sólido y eficaz para adaptar los ciclos térmicos a la muestra o combinación de muestras específicas que se están analizando.

En algunas realizaciones, un ácido nucleico diana puede someterse a una condición de desnaturalización antes del inicio de una reacción de extensión con cebadores. En el caso de una pluralidad de series de reacciones de extensión con cebadores, el ácido nucleico diana puede someterse a una condición de desnaturalización antes de ejecutar la pluralidad de series o puede someterse a una condición de desnaturalización entre series de la pluralidad. Por ejemplo, el ácido nucleico diana puede estar sometido a una condición de desnaturalización entre una primera serie y una segunda serie de una pluralidad de series. Ejemplos no limitantes de tales condiciones de desnaturalización incluyen un perfil de temperatura de desnaturalización (p. ej., una o más temperaturas de desnaturalización) y un agente de desnaturalización.

Una ventaja de llevar a cabo una pluralidad de series de reacción de extensión con cebadores puede ser que, cuando se compara con una serie única de reacciones de extensión con cebadores en condiciones de desnaturalización y elongación comparables, la pluralidad de enfoques en serie produce una cantidad detectable de producto amplificado que es indicativa de la presencia de un ácido nucleico diana en una muestra biológica con un valor de umbral de ciclo más bajo. El uso de una pluralidad de series de reacciones de extensión con cebadores puede reducir tales valores umbral de ciclo en al menos aproximadamente o aproximadamente un 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% en comparación con una serie única en condiciones de desnaturalización y elongación comparables.

En algunas realizaciones, se puede precalentar una muestra biológica antes de realizar una reacción de extensión con cebadores. La temperatura (por ejemplo, una temperatura de precalentamiento) a la que se precalienta una muestra biológica y la duración (por ejemplo, la duración del precalentamiento) pueden variar dependiendo de, por ejemplo, la muestra biológica particular a analizar. En algunos ejemplos, una muestra biológica puede precalentarse durante no

más de aproximadamente 60 minutos, 50 minutos, 40 minutos, 30 minutos, 25 minutos, 20 minutos, 15 minutos, 10 minutos, 9 minutos, 8 minutos, 7 minutos, 6 minutos, 5 minutos, 4 minutos, 3 minutos, 2 minutos, 1 minuto, 45 segundos, 30 segundos, 20 segundos, 15 segundos, 10 segundos o 5 segundos. En algunos ejemplos, una muestra biológica puede precalentarse a una temperatura de aproximadamente 80 °C a aproximadamente 110 °C. En algunos ejemplos, una muestra biológica puede precalentarse a una temperatura de aproximadamente 90 °C a aproximadamente 100 °C. En algunos ejemplos, una muestra biológica puede precalentarse a una temperatura de aproximadamente 90 °C a aproximadamente 97 °C. En algunos ejemplos, una muestra biológica puede precalentarse a una temperatura de aproximadamente 92 °C a aproximadamente 95 °C. En otros ejemplos más, una muestra biológica puede precalentarse a una temperatura de aproximadamente 80 °, 81 °C, 82 °C, 83 °C, 84 °C, 85 °C, 86 °C, 87 °C, 88 °C, 89 °C, 90 °C, 91 °C, 92 °C, 93 °C, 94 °C, 95 °C, 96 °C, 97 °C, 98 °C, 99 °C u 100 °C.

En algunas realizaciones, los reactivos necesarios para realizar la amplificación de ácidos nucleicos, incluyendo los reactivos necesarios para la conducción de la amplificación de ácidos nucleicos en paralelo también puede incluir un agente indicador que produce una señal detectable cuya presencia o ausencia es indicativa de la presencia de un producto amplificado. La intensidad de la señal detectable puede ser proporcional a la cantidad de producto amplificado. En algunos casos, donde el producto amplificado se genera de un tipo diferente de ácido nucleico que el ácido nucleico diana inicialmente amplificado, la intensidad de la señal detectable puede ser proporcional a la cantidad de ácido nucleico diana inicialmente amplificado. Por ejemplo, en el caso de amplificar un ARN diana a través de la transcripción inversa en paralelo y la amplificación del ADN obtenido de la transcripción inversa, los reactivos necesarios para ambas reacciones también pueden comprender un agente indicador que puede producir una señal detectable que sea indicativa de la presencia del producto de ADN amplificado y/o el ARN diana amplificado. La intensidad de la señal detectable puede ser proporcional a la cantidad del producto de ADN amplificado y/o el ARN diana original amplificado. El uso de un agente indicador también permite métodos de amplificación en tiempo real, incluyendo PCR en tiempo real para amplificación de ADN.

Los agentes indicadores pueden estar vinculados con ácidos nucleicos, incluidos productos amplificados, por medios covalentes o no covalentes. Ejemplos no limitantes de medios no covalentes incluyen interacciones iónicas, fuerzas de Van der Waals, interacciones hidrófobas, enlaces de hidrógeno y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, los agentes indicadores pueden unirse a los reactivos iniciales y pueden usarse cambios en los niveles de agente indicador para detectar el producto amplificado. En algunas realizaciones, los agentes indicadores solo pueden ser detectables (o no detectables) a medida que progresa la amplificación de ácidos nucleicos. En algunas realizaciones, se puede usar un colorante ópticamente activo (p. ej., un colorante fluorescente) como se puede usar como agente indicador. Ejemplos no limitantes de colorantes incluyen SYBR verde, SYBR azul, DAPI, yoduro de propidio, Hoeste, SYBR oro, bromuro de etidio, acridinas, proflavina, naranja de acridina, acriflavina, fluorcoumanina, elipticina, daunomicina, cloroquina, distamicina D, cromomicina, homidio, mitramicina, polipiridilos de rutenio, antramicina, fenantridinas y acridinas, bromuro de etidio, yoduro de propidio, yoduro de hexidio, dihidroetidio, etidio homodímero-1 y -2, etidio monoazida y ACMA, Hoechst 33258, Hoechst 33342, Hoechst 34580, DAPI, naranja de acridina, 7-AAD, actinomicina D, LDS751, hidroxistilbamidina, SYTOX Azul, SYTOX Verde, SYTOX Naranja, POPO-1, POPO-3, YOYO-1, YOYO-3, TOTO-1, TOTO-3, JOJO-1, LOLO-1, BOBO-1, BOBO-3, PO-PRO-1, PO-PRO-3, BO-PRO-1, BO-PRO-3, TO-PRO-1, TO-PRO-3, TO-PRO-5, JO-PRO-1, LO-PRO-1, YO-PRO-1, YO-PRO-3, PicoGreen, OliGreen, RiboGreen, SYBR Oro, SYBR Verde I, SYBR Verde II, SYBR DX, SYTO-40, -41, -42, -43, -44, -45 (azul), SYTO-13, -16, -24, -21, -23, -12, -11, -20, -22, -15, -14, -25 (verde), SYTO-81, -80, -82, -83, -84, -85 (naranja), SYTO-64, -17, -59, -61, -62, -60, -63 (rojo), fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC, por sus siglas en inglés), tetrametilrodamina isotiocianato (TRITC, por sus siglas en inglés), rodamina, tetrametilrodamina, R-ficoeritrina, Cy-2, Cy-3, Cy-3,5, Cy-5, Cy5.5, , Cy-7, Rojo Texas, Phar-Rojo, alofocianina (APC, por sus siglas en inglés), Sybr Verde I, Sybr Verde II, Sybr Oro, CellTracker Verde, 7-AAD, etidio homodímero I, etidio homodímero II, etidio homodímero III, bromuro de etidio, umbeliferona, eosina, proteína fluorescente verde, eritrosina, cumarina, metil cumarina, pireno, verde malaquita, estilbena, amarillo lucifer, cascade blue, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo, complejos de lantánidos fluorescentes, tales como los que incluyen europio y terbio, carboxitetracloro fluoresceína, 5 y/o 6-carboxifluoresceína (FAM), 5-(o 6-) yodoacetamidofluoresceína, 5-([2 (y 3)-5-(Acetilmercapto) -succinil]amino) fluoresceína (SAMSA-fluoresceína), cloruro de sulfonilo de lisamina rodamina B, 5 y/o 6 carboxirrodamina (ROX), 7-amino-metil-cumarina, ácido 7-amino-4-metilcumarin-3-acético (AMCA), fluoróforos BODIPY, sal trisódica del ácido 8-metoxipiren-1,3,6-trisulfónico, 3,6-disulfonato-4-amino-naftalimida, ficobiliproteínas, colorantes AlexaFluor 350, 405, 430, 488, 532, 546, 555, 568, 594, 610, 633, 635, 647, 660, 680, 700, 750 y 790, colorantes DyLight 350, 405, 488, 550, 594, 633, 650, 680, 755 y 800 u otros fluoróforos.

En algunas realizaciones, un agente indicador puede ser una sonda oligonucleotídica de específica de secuencia que es ópticamente activa cuando hibrida con un producto amplificado. Debido a la unión específica de secuencia de la sonda al producto amplificado, el uso de sondas oligonucleotídicas puede aumentar la especificidad y la sensibilidad de detección. Una sonda puede estar unida a cualquiera de los agentes indicadores ópticamente activos (p. ej., colorantes) descritos en el presente documento y también puede incluir un desactivador capaz de bloquear la actividad óptica de un colorante asociado. Ejemplos no limitantes de sondas que pueden ser útiles como agentes indicadores incluyen sondas TaqMan, sondas TaqMan Tamara, sondas TaqMan MGB o sondas Lion.

En algunas realizaciones y donde un agente indicador puede ser una sonda oligonucleotídica de ARN esta incluye un colorante ópticamente activo (p. ej., colorante fluorescente) y un desactivador colocado adyacente en la sonda. La

proximidad del colorante con el inhibidor puede bloquear la actividad óptica del colorante. La sonda puede unirse a una secuencia diana a amplificar. Tras la ruptura de la sonda con la actividad exonucleasa de una ADN polimerasa durante la amplificación, el desactivador y el colorante se separan, y el colorante libre recupera su actividad óptica que puede detectarse posteriormente.

5 En algunas realizaciones, un agente indicador puede ser una baliza molecular. Una baliza molecular incluye, por ejemplo, un desactivador unido en un extremo de un oligonucleótido en una conformación de horquilla. En el otro extremo del oligonucleótido hay un colorante ópticamente activo, tal como, por ejemplo, un colorante fluorescente. En la configuración de horquilla, el colorante ópticamente activo y el desactivador se acercan lo suficientemente cerca como para que el desactivador sea capaz de bloquear la actividad óptica del colorante. Al hibridar con producto amplificado, sin embargo, el oligonucleótido asume una conformación lineal e hibrida con una secuencia diana en el producto amplificado. La linealización del oligonucleótido da como resultado la separación del colorante ópticamente activo y el desactivador, de manera que la actividad óptica se restablece y puede detectarse. La especificidad de secuencia de la baliza molecular para una secuencia diana en el producto amplificado puede mejorar la especificidad y la sensibilidad de detección.

En algunas realizaciones, un agente indicador puede ser una especie radiactiva. Ejemplos no limitantes de especies radiactivas incluyen ^{14}C , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , Tc99m, ^{35}S o ^3H .

20 En algunas realizaciones, un agente indicador puede ser una enzima que es capaz de generar una señal detectable. La señal detectable puede producirse por la actividad de la enzima con su sustrato o un sustrato particular en el caso de que la enzima tenga múltiples sustratos. Ejemplos no limitantes de enzimas que pueden usarse como agentes indicadores incluyen fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante, I^2 -galactosidasa, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, acetilcolinesterasa y luciferasa.

25 En diversos aspectos, se puede detectar producto amplificado (p. ej., producto de ADN amplificado, producto de ARN amplificado). La detección de producto amplificado, incluyendo ADN amplificado, puede lograrse con cualquier método de detección adecuado conocido en la técnica. El tipo particular de método de detección utilizado puede depender, por ejemplo, en el producto amplificado particular, el tipo de recipiente de reacción utilizado para la amplificación, otros reactivos en una mezcla de reacción, si se incluyó o no un agente indicador en una mezcla de reacción, y si se utilizó un agente indicador, el tipo particular de uso del agente indicador. Ejemplos no limitantes de métodos de detección incluyen detección óptica, detección espectroscópica, detección electrostática, detección electroquímica y similares. Los métodos de detección óptica incluyen, pero sin limitación, fluorimetría y absorbancia de luz UV-vis. Los métodos de detección espectroscópica incluyen, pero sin limitación, espectrometría de masas, espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) y espectroscopía infrarroja. Los métodos de detección electrostática incluyen, pero sin limitación, técnicas basadas en gel, tal como, por ejemplo, electroforesis en gel. Los métodos de detección electroquímica incluyen, pero sin limitación, detección electroquímica del producto amplificado después de la separación por cromatografía de líquidos de alto rendimiento de los productos amplificados.

40 En cualquiera de los diversos aspectos, el tiempo necesario para completar los elementos de un método puede variar dependiendo de las etapas particulares del método. Por ejemplo, una cantidad de tiempo para completar los elementos de un método puede ser de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 120 minutos. En otros ejemplos, una cantidad de tiempo para completar los elementos de un método puede ser de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 60 minutos. En otros ejemplos, una cantidad de tiempo para completar los elementos de un método puede ser de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 30 minutos. En otros ejemplos, una cantidad de tiempo para completar los elementos de un método puede ser menor que o igual a 120 minutos, menor que o igual a 90 minutos, menor que o igual a 75 minutos, menor que o igual a 60 minutos, menor que o igual a 45 minutos, menor que o igual a 40 minutos, menor que o igual a 35 minutos, menor que o igual a 30 minutos, menor que o igual a 25 minutos, menor que o igual a 20 minutos, menor que o igual a 15 minutos, menos de o igual a 10 minutos, o menos de o igual a 5 minutos.

55 En algunas realizaciones, la información sobre la presencia y/o una cantidad de producto amplificado (p. ej., producto de ADN amplificado) puede enviarse a un destinatario. La información con respecto al producto amplificado puede enviarse a través de cualquier medio adecuado conocido en la técnica. En algunas realizaciones, dicha información se puede proporcionar verbalmente a un destinatario. En algunas realizaciones, dicha información puede proporcionarse en un informe. Un informe puede incluir cualquier número de elementos deseados, con ejemplos no limitantes que incluyen información respecto al sujeto (p. ej., sexo, edad, raza, estado de salud, etc.) datos en bruto, datos procesados (p. ej., pantallas gráficas (p. ej., figuras, gráficos, tablas de datos, sumarios de datos), valores de umbral de ciclo determinados, cálculo de la cantidad inicial de polinucleótido diana), conclusiones sobre la presencia del ácido nucleico diana, información de diagnóstico, información de pronóstico, información de enfermedades, y similares, y combinaciones de los mismos. El informe se puede proporcionar como un informe impreso (p. ej., una copia impresa) o se puede proporcionar como un informe electrónico. En algunas realizaciones, incluidos los casos en que se proporciona un informe electrónico, dicha información puede enviarse a través de una pantalla electrónica (p. ej., una pantalla de visualización electrónica), tal como un monitor o televisión, una pantalla operativamente vinculada con una unidad utilizada para obtener el producto amplificado, una pantalla de tableta, una pantalla de dispositivo móvil y similares. Tanto los informes impresos como los electrónicos pueden almacenarse en archivos o

en bases de datos, respectivamente, de modo que sean accesibles para compararlos con futuros informes.

Por otra parte, se puede transmitir un informe al destinatario en una ubicación local o remota utilizando cualquier medio de comunicación adecuado que incluya, por ejemplo, una conexión de red, una conexión inalámbrica o una conexión a internet. En algunas realizaciones, se puede enviar un informe al dispositivo del destinatario, tal como un ordenador personal, teléfono, tableta u otro dispositivo. El informe se puede ver en línea, guardado en el dispositivo del destinatario o impreso. Un informe también se puede transmitir por cualquier otro medio adecuado para transmitir información, con ejemplos no limitantes que incluyen enviar por correo un informe impreso para su recepción y/o revisión por parte del destinatario.

Por otra parte, dicha información puede enviarse a diversos tipos de destinatarios. Ejemplos no limitantes de dichos destinatarios incluyen el sujeto del que se obtuvo la muestra biológica, un médico, un médico que trata al sujeto, un monitor clínico para un ensayo clínico, una enfermera, un investigador, un técnico de laboratorio, un representante de una compañía farmacéutica, una compañía de atención médica, una empresa de biotecnología, un hospital, una organización de ayuda humana, un administrador de atención médica, un sistema electrónico (p. ej., uno o más ordenadores y/o uno o más servidores de ordenador que almacenan, por ejemplo, los registros médicos de un sujeto), un trabajador de salud pública, otro personal médico y otras instalaciones médicas.

En un aspecto, la divulgación proporciona un sistema que implementa un método de acuerdo con cualquiera de los métodos aquí descritos. En otro aspecto, la divulgación proporciona un sistema para amplificar un ácido ribonucleico (ARN) diana presente en una muestra biológica obtenida directamente de un sujeto. El sistema comprende: (a) un módulo de entrada que recibe una solicitud del usuario para amplificar el ARN diana en la muestra biológica; (b) un módulo de amplificación que, en respuesta a la solicitud del usuario: recibe, en un vaso de reacción, una mezcla de reacción que comprende la muestra biológica y los reactivos necesarios para llevar a cabo la amplificación con transcripción inversa en paralelo con la amplificación del ácido desoxirribonucleico (ADN), comprendiendo los reactivos (i) una transcriptasa inversa, (ii) una ADN polimerasa, y (iii) un conjunto de cebadores para el ARN diana; y somete la mezcla de reacción en el recipiente de reacción a múltiples ciclos de una reacción de extensión con cebadores para generar un producto de ADN amplificado que sea indicativo de la presencia del ARN diana, comprendiendo cada ciclo (i) incubar la mezcla de reacción a una temperatura de desnaturalización durante una duración de la desnaturalización que es menos de o igual a 60 segundos, seguido de (ii) incubar la mezcla de reacción a una temperatura de elongación durante una duración de elongación menor o igual a 60 segundos, amplificando, de este modo, el ARN diana; y (c) un módulo de salida operativamente acoplado al módulo de amplificación, en donde el módulo de salida envía información sobre el ARN diana o el producto de ADN a un destinatario.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un sistema para amplificar un ácido ribonucleico (ARN) diana presente en una muestra biológica obtenida directamente de un sujeto. El sistema comprende: (a) un módulo de entrada que recibe una solicitud del usuario para amplificar el ARN diana en la muestra biológica; (b) un módulo de amplificación que, en respuesta a la solicitud del usuario: (i) recibe, en un vaso de reacción, una mezcla de reacción que comprende la muestra biológica que se ha obtenido del sujeto y los reactivos necesarios para llevar a cabo la amplificación con transcripción inversa y, opcionalmente, la amplificación del ácido desoxirribonucleico (ADN), comprendiendo los reactivos (1) una transcriptasa inversa y (2) un conjunto de cebadores para el ARN diana; y (ii) somete la mezcla de reacción a múltiples ciclos de una reacción de extensión con cebadores para producir una cantidad detectable de producto de ADN amplificado que sea indicativo de la presencia del ARN diana en la muestra biológica; (iii) detecta la cantidad de producto de ADN amplificado de (iii); y (iv) envía información sobre la cantidad de producto de ADN amplificado a un destinatario, en donde una cantidad de tiempo para completar (i) - (iv) es menor o igual a aproximadamente 30 minutos; y (c) un módulo de salida operativamente acoplado al módulo de amplificación, en donde el módulo de salida transmite la información a un destinatario.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un sistema para amplificar un ácido nucleico diana presente en una muestra biológica obtenida directamente de un sujeto. El sistema comprende: (a) un módulo de entrada que recibe una solicitud del usuario para amplificar el ARN diana en la muestra biológica; (b) un módulo de amplificación que, en respuesta a la solicitud del usuario: recibe, en un vaso de reacción, una mezcla de reacción que comprende la muestra biológica y los reactivos necesarios para llevar a cabo la amplificación del ácido nucleico, comprendiendo los reactivos (i) una ADN polimerasa y opcionalmente una transcriptasa inversa, y (ii) un conjunto de cebadores para el ácido nucleico diana; y somete la mezcla de reacción en el recipiente de reacción a una pluralidad de series de reacciones de extensión con cebadores para generar un producto amplificado que sea indicativo de la presencia del ácido nucleico diana en la muestra biológica, comprendiendo cada serie dos o más ciclos de (i) incubar la mezcla de reacción en una condición de desnaturalización caracterizada por una temperatura de desnaturalización y una duración de la desnaturalización, seguido de (ii) incubar la mezcla de reacción en una condición de elongación caracterizada por una temperatura de elongación y una duración de elongación, en donde una serie individual difiere de al menos otra serie individual de la pluralidad con respecto a la condición de desnaturalización y/o la condición de elongación; y (c) un módulo de salida operativamente acoplado al módulo de amplificación, en donde el módulo de salida envía información sobre el ARN diana o el producto de ADN a un destinatario.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un sistema para amplificar un ácido ribonucleico diana en una muestra biológica obtenida directamente de un sujeto. El sistema puede incluir una pantalla de visualización electrónica que

tiene una interfaz de usuario que muestra un elemento gráfico al que puede acceder un usuario para ejecutar un protocolo de amplificación para amplificar el ácido nucleico diana en la muestra biológica. El sistema también puede incluir un procesador informático (que incluye cualquier dispositivo adecuado que tenga un procesador informático como se describe en otra parte del presente documento) acoplado a la pantalla de visualización electrónica y programado para ejecutar el protocolo de amplificación tras la selección del elemento gráfico por parte del usuario. El protocolo de amplificación puede comprender someter una mezcla de reacción que comprende la muestra biológica y los reactivos necesarios para llevar la amplificación de ácido nucleico a una pluralidad de series de reacciones de extensión con cebadores para generar un producto amplificado. El producto amplificado puede ser indicativo de la presencia del ácido nucleico diana en la muestra biológica. Por otra parte, cada serie de reacciones de extensión con cebadores puede comprender dos o más ciclos de incubación de la mezcla de reacción en una condición de desnaturalización que está caracterizada por una temperatura de desnaturalización y una duración de la desnaturalización, seguido de incubación de la mezcla de reacción en una condición de elongación que está caracterizada por una temperatura de elongación y una duración de elongación. Una serie individual puede diferir de al menos otra serie individual de la pluralidad con respecto a la condición de desnaturalización y/o la condición de elongación.

En algunas realizaciones, el ácido nucleico diana puede estar asociado con una enfermedad. La enfermedad puede estar, por ejemplo, asociada con un virus de ARN o un virus de ADN. Se proporcionan ejemplos de virus en otra parte del presente documento. En algunas realizaciones, la enfermedad puede estar asociada con una bacteria patógena (p. ej., *Mycobacterium tuberculosis*) o un protozoo patógeno (p. ej., *Plasmodium* como en la Malaria), incluyendo ejemplos de tales patógenos descritos en otra parte del presente documento. En algunas realizaciones, el protocolo de amplificación puede dirigirse a analizar la presencia de dicha enfermedad basándose en la presencia del producto amplificado.

En algunos casos, una interfaz de usuario puede ser una interfaz gráfica de usuario. Por otra parte, una interfaz de usuario puede incluir uno o más elementos gráficos. Los elementos gráficos pueden incluir imágenes y/o información textual, tal como fotos, iconos y texto. Los elementos gráficos pueden tener varios tamaños y orientaciones en la interfaz de usuario. Asimismo, una pantalla de visualización electrónica puede ser cualquier pantalla electrónica adecuada que incluya los ejemplos descritos en otra parte del presente documento. Ejemplos no limitantes de pantallas de visualización electrónica incluyen un monitor, una pantalla de dispositivo móvil, una pantalla de ordenador portátil, una televisión, una pantalla de sistema de videojuegos portátil y una pantalla de calculadora. En algunas realizaciones, una pantalla de visualización electrónica puede incluir una pantalla táctil (p. ej., una pantalla táctil capacitiva o resistiva) de modo que los elementos gráficos que se muestran en una interfaz de usuario de la pantalla de visualización electrónica pueden seleccionarse mediante el toque del usuario con la pantalla de visualización electrónica.

En algunas realizaciones, el protocolo de amplificación puede incluir además seleccionar un conjunto de cebadores para el ácido nucleico diana. En dichos casos, el conjunto de cebadores puede ser un conjunto de cebadores específicamente diseñado para amplificar una o más secuencias de la molécula de ácido nucleico diana. En algunas realizaciones, el protocolo de amplificación puede incluir además seleccionar un agente indicador (p. ej., una sonda oligonucleotídica que comprende una especie ópticamente activa u otro tipo de agente indicador descrito en otra parte en el presente documento) que es específico para una o más secuencias de la molécula de ácido nucleico diana. Por otra parte, en algunas realizaciones, los reactivos pueden comprender cualquier reactivo adecuado necesario para la amplificación de ácidos nucleicos como se describe en otra parte del presente documento, tal como, por ejemplo, una polimerasa de ácido desoxirribonucleico (ADN), un conjunto de cebadores para el ácido nucleico diana y (opcionalmente) una transcriptasa inversa.

En algunas realizaciones, la interfaz de usuario puede mostrar una pluralidad de elementos gráficos. Cada uno de los elementos gráficos puede asociarse con un protocolo de amplificación dado entre una pluralidad de protocolos de amplificación. Cada uno de la pluralidad de protocolos de amplificación puede incluir una combinación diferente de series de reacción de extensión con cebadores. En algunos casos, no obstante, una interfaz de usuario puede mostrar una pluralidad de elementos gráficos asociados con el mismo protocolo de amplificación. Un ejemplo de una interfaz de usuario que tiene una pluralidad de elementos gráficos cada uno asociado con un protocolo de amplificación dado se muestra en la **Fig. 28A**. Como se muestra en la **Fig. 28A**, un ejemplo de pantalla de visualización electrónica **2800** asociada con un procesador informático incluye una interfaz de usuario **2801**. La interfaz de usuario **2801** incluye una pantalla de elementos gráficos **2802**, **2803** y **2804**. Cada uno de los elementos gráficos puede asociarse con un protocolo de amplificación particular (p. ej., "Prot. 1 "para elemento gráfico **2802**, "Prot. 2 "para elemento gráfico **2803** y "Prot. 4 "para elemento gráfico **2804**). Tras la selección del usuario (p. ej., toque del usuario cuando la pantalla de visualización electrónica **2800** incluye una pantalla táctil que tiene la interfaz de usuario) de un elemento gráfico particular, el protocolo de amplificación particular asociado con el elemento gráfico puede ejecutarse por un procesador informático asociado. Por ejemplo, cuando un usuario selecciona un elemento gráfico **2803**, se ejecuta la amplificación "Prot. 2 "por el procesador del ordenador asociado. Cuando solo se muestran tres elementos gráficos en la interfaz de usuario de ejemplo **2801** de la **Fig. 28A**, una interfaz de usuario puede tener cualquier número adecuado de elementos gráficos. Por otra parte, cuando cada elemento gráfico mostrado en la interfaz de usuario **2801** de la **Fig. 28A** está asociado con un solo protocolo de amplificación, cada elemento gráfico de una interfaz de usuario puede asociarse con uno o más protocolos de amplificación (p. ej., una serie de protocolos de amplificación) de manera que un procesador informático asociado ejecute una serie de protocolos de amplificación tras la interacción del usuario con el

elemento gráfico.

En algunas realizaciones, cada uno de los elementos gráficos y/o pueden estar asociados con una enfermedad, y un protocolo de amplificación dado entre la pluralidad de protocolos de amplificación puede estar dirigido a analizar una presencia de la enfermedad en el sujeto. Por lo tanto, en dichos casos, un usuario puede seleccionar un elemento gráfico para ejecutar un protocolo de amplificación (o una serie de protocolos de amplificación) para analizar una enfermedad en particular. En algunas realizaciones, la enfermedad puede estar asociada con un virus tal como, por ejemplo, cualquier virus de ARN o virus de ADN que incluya ejemplos de tales virus descritos en otra parte del presente documento. Ejemplos no limitantes de virus incluyen el virus de inmunodeficiencia humana I (VIH I), virus de inmunodeficiencia humana II (VIH II), un ortomixovirus, virus del Ébola, virus del dengue, virus de la gripe (p. ej., Virus H1N1, Virus H3N2, Virus H7N9 o virus H5N1), hepevirus, virus de la hepatitis A, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C (p. ej., virus de ARN de la hepatitis C (ARN-VHC) blindado), virus de la hepatitis D, virus de la hepatitis E, virus de la hepatitis G, virus de Epstein-Barr, virus de la mononucleosis, citomegalovirus, virus del SARS, virus de la fiebre del Nilo occidental, virus de la polio, virus del sarampión, virus del herpes simple, virus de la viruela, adenovirus (p. ej., adenovirus tipo 55 (ADV55), adenovirus tipo 7 (ADV7)) y virus de la Varicela. En algunas realizaciones, la enfermedad puede estar asociada con una bacteria patógena (p. ej., *Mycobacterium tuberculosis*) o un protozoo patógeno (p. ej., *Plasmodium* como en la Malaria), incluyendo ejemplos de tales patógenos descritos en otra parte del presente documento.

Un ejemplo de una interfaz de usuario que tiene una pluralidad de elementos gráficos cada uno asociado con un protocolo de amplificación dado se muestra en la **Fig. 28B**. Tal como se muestra en la **Fig. 28B**, un ejemplo de pantalla de visualización electrónica **2810** asociada con un procesador informático incluye una interfaz de usuario **2811**. La interfaz de usuario **2811** incluye una pantalla de elementos gráficos **2812**, **2813** y **2814**. Cada uno de los elementos gráficos se puede asociar con una enfermedad particular (p. ej., "Ébola" para el elemento gráfico **2812**, "H1N1" para el elemento gráfico **2813** y "Hep C" (Hepatitis C) para el elemento gráfico **2814**) es decir, a su vez, asociado con uno o más protocolos de amplificación dirigidos a la enfermedad particular. Tras la selección del usuario (p. ej., toque del usuario cuando la pantalla de visualización electrónica **2810** incluye una pantalla táctil que tiene la interfaz de usuario) con un elemento gráfico particular, los protocolos de amplificación particulares asociados con la enfermedad asociada con el elemento gráfico pueden ejecutarse por un procesador informático asociado. Por ejemplo, cuando un usuario interactúa con un elemento gráfico **2812**, el procesador informático asociado puede ejecutar uno o más protocolos de amplificación asociados con el análisis del virus del Ébola. Cuando solo se muestran tres elementos gráficos en la interfaz de usuario de ejemplo **2811** de la **Fig. 28B**, una interfaz de usuario puede tener cualquier número adecuado de elementos gráficos, correspondiendo cada uno a una enfermedad diferente. Por otra parte, cuando cada elemento gráfico mostrado en la interfaz de usuario **2811** de la **Fig. 28B** está asociado con una sola enfermedad, cada elemento gráfico de una interfaz de usuario puede asociarse con una o más enfermedades de manera que un procesador informático asociado ejecute una serie de protocolos de amplificación (p. ej., cada protocolo de amplificación individual dirigido a una enfermedad particular) tras la selección del elemento gráfico por parte del usuario. Por ejemplo, un elemento gráfico puede corresponder al virus Ébola y al virus H1N1 de tal manera que la selección del elemento gráfico da como resultado que un procesador informático asociado ejecute protocolos de amplificación tanto para el virus Ébola como para el virus H1N1.

En diversos aspectos, el sistema comprende un módulo de entrada que recibe una solicitud del usuario para amplificar un ácido nucleico diana (p. ej., ARN diana, ADN diana) presente en una muestra biológica obtenida directamente de un sujeto. Se puede usar cualquier módulo adecuado capaz de aceptar dicha solicitud de usuario. El módulo de entrada puede comprender, por ejemplo, un dispositivo que comprende uno o más procesadores. Ejemplos no limitantes de dispositivos que comprenden procesadores (p. ej., procesadores informáticos) incluyen un ordenador de escritorio, un ordenador portátil, una tableta (p. ej., iPad de Apple®, Samsung® Galaxy Tab), un teléfono móvil, un teléfono inteligente (p. ej., iPhone de Apple®, teléfono habilitado para Android®), un asistente digital personal (PDA, por sus siglas en inglés), una consola de videojuegos, una televisión, un dispositivo de reproducción de música (p. ej., iPod de Apple®), un dispositivo de reproducción de video, un buscapersonas y una calculadora. Los procesadores se pueden asociar con uno o más controladores, unidades de cálculo y/u otras unidades de un sistema informático, o se pueden implantar en el firmware según se desee. Si se implementa en el software, las rutinas (o programas) se pueden almacenar en cualquier memoria legible por ordenador, como en la memoria RAM, ROM, memoria flash, un disco magnético, un disco láser u otro medio de almacenamiento. Igualmente, este programa informático se puede suministrar a un dispositivo a través de cualquier método de suministro conocido que incluye, por ejemplo, a través de un canal de comunicación tal como una línea telefónica, internet, una intranet local, una conexión inalámbrica, etc., o a través de un medio transportable, tal como un disco legible por ordenador, unidad flash, etc. Las distintas etapas pueden implementarse como varios bloques, operaciones, herramientas, módulos o técnicas que, a su vez, pueden implementarse en hardware, firmware, software, o cualquier combinación de los mismos. Cuando se implementa en hardware, algunos o todos los bloques, operaciones, técnicas, etc. se pueden implementar en, por ejemplo, un circuito integrado personalizado (IC, por sus siglas en inglés), un circuito integrado específico de la aplicación (ASIC, por sus siglas en inglés), una matriz lógica programable de campo (FPGA, por sus siglas en inglés), una matriz lógica programable (PLA, por sus siglas en inglés), etc.

En algunas realizaciones, el módulo de entrada está configurado para recibir una solicitud del usuario para realizar la amplificación del ácido nucleico diana. El módulo de entrada puede recibir la solicitud del usuario directamente (p. ej.,

mediante un dispositivo de entrada como un teclado, ratón o pantalla táctil operada por el usuario) o indirectamente (p. ej., a través de una conexión por cable o inalámbrica, incluso a través de internet). A través de la electrónica de salida, el módulo de entrada puede proporcionar la solicitud del usuario al módulo de amplificación. En algunas realizaciones, un módulo de entrada puede incluir una interfaz de usuario (UI, por sus siglas en inglés), tal como una

5 interfaz gráfica de usuario (GUI, por sus siglas en inglés), que está configurada para permitir que un usuario proporcione una solicitud para amplificar el ácido nucleico diana. Una GUI puede incluir componentes textuales, gráficos y/o de audio. Se puede proporcionar una GUI en una pantalla electrónica, incluyendo la visualización de un dispositivo que comprende un procesador informático. Tal pantalla puede incluir una pantalla táctil resistiva o capacitiva.

10 Ejemplos no limitantes de usuarios incluyen el sujeto del que se obtuvo la muestra biológica, personal médico, profesionales clínicos (p. ej., doctores, enfermeras, técnicos de laboratorio), personal de laboratorio (p. ej., técnicos de laboratorio del hospital, científicos de investigación, científicos farmacéuticos), un monitor clínico para un ensayo clínico u otros en la industria del cuidado de la salud.

15 En diversos aspectos, el sistema comprende un módulo de amplificación para realizar una reacción de amplificación de ácidos nucleicos en el ácido nucleico diana o una porción del mismo, en respuesta a una solicitud del usuario recibida por el módulo de entrada. El módulo de amplificación puede ser capaz de ejecutar cualquiera de los métodos descritos en el presente documento y puede incluir cualquiera de los dispositivos de manipulación de fluidos, uno o

20 más termocicladores, medios para recibir uno o más recipientes de reacción (p. ej., pocillos de un bloque térmico de un termociclador), un detector (p. ej., detector óptico, detector espectroscópico, detector electroquímico) capaz de detectar productos amplificados y medios para enviar información (p. ej., datos sin procesar, datos procesados, o cualquier otro tipo de información descrita en el presente documento) con respecto a la presencia y/o cantidad de producto amplificado (p. ej., producto de ADN amplificado) a un destinatario. En algunos casos, el módulo de

25 amplificación puede comprender un dispositivo con un procesador informático como se describe en otra parte del presente documento y también puede ser capaz de analizar datos sin procesar de la detección, con la ayuda del software apropiado. Por otra parte, en algunas realizaciones, el módulo de amplificación puede comprender la electrónica de entrada necesaria para recibir instrucciones del módulo de entrada y puede comprender la electrónica de salida necesaria para comunicarse con el módulo de salida.

30 En algunas realizaciones, El módulo de amplificación puede automatizar una o más etapas para proporcionar materiales a un recipiente de reacción, amplificación de ácidos nucleicos, detección del producto amplificado y salida de información. En algunas realizaciones, la automatización puede comprender el uso de uno o más controladores de fluidos y software asociado. Se pueden utilizar varios sistemas de manipulación de fluidos disponibles comercialmente para ejecutar la automatización de dichos procesos. Ejemplos no limitantes de tales manipuladores de fluidos incluyen manipuladores de fluidos de Perkin-Elmer, Caliper Life Sciences, Tecan, Eppendorf, Apricot Design, y Velocidad 11.

35 En algunas realizaciones, un módulo de amplificación puede incluir un instrumento de detección en tiempo real. Ejemplos no limitantes de tales instrumentos incluyen un termociclador de PCR en tiempo real, sistema de detección de secuencias ABI PRISM® 7000, sistema de detección de secuencias ABI PRISM® 7700, sistema de PCR en tiempo real Applied Biosystems 7300, sistema de PCR en tiempo real Applied Biosystems 7500, sistema de PCR en tiempo real rápido Applied Biosystems 7900 HT (todo de Applied Biosystems); sistema LightCycler™ (Roche Diagnostics GmbH); sistema de PCR en tiempo real Mx3000P™, sistema de PCR en tiempo real Mx3005P™ y sistema de PCR cuantitativa multiplex Mx4000® (Stratagene, La Jolla, California); y sistema Smart Cycler (Cepheid, distribuido por

45 Fisher Scientific). En algunas realizaciones, un módulo de amplificación puede comprender otro instrumento automatizado tal como, por ejemplo, un sistema COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® (Roche Molecular Systems), un sistema TIGRIS DTS (Hologic Gen-Probe, San Diego, CA), un sistema PANTHER (Hologic Gen-Probe, San Diego, CA), un sistema BD MAX™ (Becton Dickinson), un sistema GeneXpert (Cepheid), un sistema Filmarray® (BioFire Diagnostics), un sistema iCubate, un sistema IDBox (Luminex), un sistema EncompassMDx™ (Rheonix), un sistema Liat™ Aanalyzer (IQuum), un sistema de plataforma de diagnóstico molecular de Biocartis, un sistema Enigma® ML (Enigma Diagnostics), un sistema T2Dx® (T2 Biosystems), un sistema Verigene® (NanoSphere), un sistema de diagnóstico de Great Basin, un sistema Unyvero™ (Curetis), un sistema PanNAT (Micronics) o un sistema Spartan™ RX (Spartan Bioscience).

50 En diversos aspectos, el sistema comprende un módulo de salida conectado operativamente al módulo de amplificación. En algunas realizaciones, el módulo de salida puede comprender un dispositivo con un procesador como se describe anteriormente para el módulo de entrada. El módulo de salida puede incluir dispositivos de entrada como se describe en el presente documento y/o puede comprender electrónica de entrada para la comunicación con el módulo de amplificación. En algunas realizaciones, el módulo de salida puede ser una pantalla electrónica, en algunos

60 casos, la pantalla electrónica comprende una UI. En algunas realizaciones, el módulo de salida es una interfaz de comunicación operativamente acoplada a una red informática como, p. ej., por ejemplo, la internet. En algunas realizaciones, el módulo de salida puede transmitir información a un destinatario en una ubicación local o remota utilizando cualquier medio de comunicación adecuado, incluyendo una red de ordenadores, una red inalámbrica, una intranet local o la internet. En algunas realizaciones, el módulo de salida es capaz de analizar los datos recibidos del

65 módulo de amplificación. En algunos casos, el módulo de salida incluye un generador de informes capaz de generar un informe y transmitir el informe a un destinatario, en donde el informe contiene cualquier información con respecto

a la cantidad y/o presencia de producto amplificado como se describe en otra parte del presente documento. En algunas realizaciones, el módulo de salida puede transmitir información automáticamente en respuesta a la información recibida del módulo de amplificación, tal como en forma de datos sin procesar o análisis de datos realizados por el software incluido en el módulo de amplificación. De manera alternativa, el módulo de salida puede transmitir información después de recibir instrucciones de un usuario. La información transmitida por el módulo de salida puede verse electrónicamente o imprimirse desde una impresora.

Uno o más del módulo de entrada, el módulo de amplificación y el módulo de salida pueden estar incluidos dentro del mismo dispositivo o pueden comprender uno o más de los mismos componentes. Por ejemplo, un módulo de amplificación también puede comprender un módulo de entrada, un módulo de salida, o ambos. En otros ejemplos, se puede incluir un dispositivo que comprende un procesador tanto en el módulo de entrada como en el módulo de salida. Un usuario puede usar el dispositivo para solicitar que se amplifique un ácido nucleico diana y también puede usarse como un medio para transmitir información respecto al producto amplificado a un destinatario. En algunos casos, un dispositivo que comprende un procesador puede incluirse en los tres módulos, de manera que el dispositivo que comprende un procesador también puede usarse para controlar, proporcionar instrucciones y recibir información de la instrumentación (p. ej., un termociclador, un detector, un dispositivo de manipulación de fluidos) incluido en el módulo de amplificación o en cualquier otro módulo.

Un sistema de ejemplo para amplificar un ácido nucleico diana de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento se representa en la **Figura 1**. El sistema comprende un ordenador **101** eso puede servir como parte de los módulos tanto de entrada como de salida. Un usuario entra en un recipiente de reacción. **102** que comprende una mezcla de reacción lista para la amplificación de ácido nucleico en el módulo de amplificación **104**. El módulo de amplificación comprende un termociclador **105** y un detector **106**. El módulo de entrada **107** comprende el ordenador **101** y dispositivos de entrada asociados **103** (p.ej, teclado, ratón, etc.) que pueden recibir la solicitud del usuario para amplificar un ácido nucleico diana en la mezcla de reacción. El módulo de entrada **107** comunica la solicitud del usuario al módulo de amplificación **104** y la amplificación de ácidos nucleicos comienza en el termociclador **105**. A medida que avanza la amplificación, el detector **106** del módulo de amplificación detecta producto amplificado. La información (p. ej., datos brutos obtenidos por el detector) con respecto al producto amplificado se transmite desde el detector **106** de vuelta al ordenador **101**, que también sirve como componente del módulo de salida **108**. El ordenador **101** recibe la información del módulo de amplificación **104**, realiza cualquier manipulación adicional a la información y después genera un informe que contiene la información procesada. Una vez que se genera el informe, el ordenador **101** transmite después el informe a su destinatario final **109** a través de una red informática (p. ej., una intranet, la internet) a través de la interfaz de red informática **110**, en formato de copia impresa a través de la impresora **111** o a través de la pantalla electrónica **112** operativamente vinculada al ordenador **101**. En algunos casos, la pantalla electrónica **112**

En un aspecto, la divulgación proporciona un medio legible por ordenador que comprende código ejecutable de máquina que, al ser ejecutados por uno o más procesadores, implementa un método de acuerdo con cualquiera de los métodos divulgados en el presente documento. En otro aspecto, la divulgación proporciona un medio legible por ordenador que comprende código ejecutable de máquina que, al ser ejecutados por uno o más procesadores informáticos, implementa un método para amplificar un ácido ribonucleico (ARN) diana presente en una muestra biológica obtenida directamente de un sujeto, comprendiendo el método: (a) proporcionar un recipiente de reacción que comprende la muestra biológica y los reactivos necesarios para llevar a cabo la amplificación con transcripción inversa en paralelo con la amplificación del ácido desoxirribonucleico (ADN), comprendiendo los reactivos (i) una transcriptasa inversa, (ii) una ADN polimerasa, y (iii) un conjunto de cebadores para el ARN diana, para obtener una mezcla de reacción; y (b) someter la mezcla de reacción en el recipiente de reacción a múltiples ciclos de una reacción de extensión con cebadores para generar un producto de ADN amplificado que sea indicativo de la presencia del ARN diana, comprendiendo cada ciclo (i) incubar la mezcla de reacción a una temperatura de desnaturalización durante una duración de la desnaturalización que es menos de o igual a 60 segundos, seguido de (ii) incubar la mezcla de reacción a una temperatura de elongación durante una duración de elongación menor o igual a 60 segundos, amplificando, de este modo, el ARN diana.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un medio legible por ordenador que comprende código ejecutable de máquina que, al ser ejecutados por uno o más procesadores informáticos, implementa un método para amplificar un ácido ribonucleico (ARN) diana presente en una muestra biológica obtenida directamente de un sujeto, comprendiendo el método: (a) recibir la muestra biológica que se ha obtenido del sujeto; (a) proporcionar un recipiente de reacción que comprende la muestra biológica y los reactivos necesarios para llevar a cabo la amplificación con transcripción inversa y opcionalmente la amplificación del ácido desoxirribonucleico (ADN), comprendiendo los reactivos (i) una transcriptasa inversa y (ii) un conjunto de cebadores para el ARN diana, para obtener una mezcla de reacción; (c) someter la mezcla de reacción a múltiples ciclos de una reacción de extensión con cebadores para producir una cantidad detectable de producto de ADN amplificado que sea indicativo de la presencia del ARN diana en la muestra biológica; (d) detectar la cantidad de producto de ADN de (c); y (e) enviar información sobre la cantidad de producto de ADN a un destinatario, en donde una cantidad de tiempo para completar (a) - (e) es menor o igual a aproximadamente 30 minutos.

En un aspecto, la divulgación proporciona un medio legible por ordenador que comprende código ejecutable de máquina que, al ser ejecutados por uno o más procesadores informáticos, implementa un método para amplificar un

ácido ribonucleico (ARN) diana presente en una muestra biológica obtenida de un sujeto, comprendiendo el método: (a) proporcionar un recipiente de reacción que comprende la muestra biológica y los reactivos necesarios para llevar a cabo la amplificación del ácido nucleico, comprendiendo los reactivos (i) una ADN polimerasa y opcionalmente una transcriptasa inversa, y (ii) un conjunto de cebadores para el ácido nucleico diana, para obtener una mezcla de reacción; y (b) someter la mezcla de reacción en el recipiente de reacción a una pluralidad de series de reacciones de extensión con cebadores para generar producto amplificado a partir del ácido nucleico diana, comprendiendo cada serie dos o más ciclos de (i) incubar la mezcla de reacción en una condición de desnaturalización caracterizada por una temperatura de desnaturalización y una duración de la desnaturalización, seguido de (ii) incubar la mezcla de reacción en una condición de elongación caracterizada por una temperatura de elongación y una duración de elongación, en donde una serie individual difiere de al menos otra serie individual de la pluralidad con respecto a la condición de desnaturalización y/o la condición de elongación.

El medio legible por ordenador puede tomar muchas formas, incluyendo, pero sin limitación, un medio de almacenamiento tangible (o no transitorio), un medio de onda portadora o un medio de transmisión físico. Los medios de almacenamiento no volátiles incluyen, por ejemplo, discos ópticos o magnéticos, tal como cualquiera de los dispositivos de almacenamiento en cualquier ordenador o similares, como los que se pueden usar para implementar las etapas de cálculo, las etapas de proceso, etc. Los medios de almacenamiento volátiles incluyen memoria dinámica, como la memoria principal de un ordenador. Los medios de transmisión tangibles incluyen cables coaxiales; cable de cobre y fibras ópticas, incluidos los cables que forman un bus dentro de un sistema informático. Los medios de transmisión de onda portadora pueden tomar la forma de señales eléctricas o electromagnéticas, u ondas acústicas o de luz, tales como las generadas durante las comunicaciones de datos por radiofrecuencia (RF) e infrarrojos (IR). Las formas comunes de medios legibles por ordenador incluyen p. ej.: un disquete, un disco flexible, disco duro, cinta magnética, cualquier otro medio magnético, un CD-ROM, DVD o DVD-ROM, cualquier otro medio óptico, tarjetas de papel perforadas, cualquier otro medio de almacenamiento físico con patrones de orificios, una RAM, una PROM y una EPROM, una FLASH-EPROM, cualquier otro chip o cartucho de memoria, una onda portadora que transmita datos o instrucciones, cables o enlaces que transporten dicha onda portadora, o cualquier otro medio desde el cual un ordenador pueda leer código y/o datos de programación. Muchas de estas formas de medios legibles por ordenador pueden estar implicadas en llevar una o más secuencias de una o más instrucciones a un procesador para su ejecución.

Ejemplos

Ejemplo 1: Amplificación y Detección de Ácidos Nucleicos en Muestras Víricas de Reserva y Muestras Biológicas

Se realizaron experimentos de amplificación y detección para comparar los resultados obtenidos de muestras víricas patrón y muestras biológicas. Las muestras biológicas que comprendían un patógeno vírico de ARN y las muestras patrón del patógeno vírico se sometieron a condiciones de amplificación, de manera que se amplificó el ARN del patógeno. Se realizó un conjunto de experimentos para cada uno de los virus de la gripe H3N2 y H1N1 (2007). Cada muestra biológica se obtuvo directamente de un sujeto a través de un hisopo orofaríngeo. Cada muestra vírica patrón se obtuvo como una dilución en serie de una solución de reserva que comprende el virus. Las concentraciones de H3N2 y H1N1 (2007) fueron 10^6 UI/ml. Para H5N1 y H1N1 (2007), las diluciones de 1/2, 1/20, 1/200, 1/2000 y 1/20000 se sometieron a amplificación. En cada conjunto experimental, También se sometió a amplificación un control negativo (p. ej., una muestra que no comprende ARN vírico).

Se combinaron cinco microlitros de cada muestra en un tubo de reacción de 25 μ l con los reactivos necesarios para realizar la transcripción inversa del ARN vírico y los reactivos necesarios para completar la amplificación del ADN complementario obtenido de la transcripción inversa (p. ej., amplificación en paralelo del ácido nucleico). Los reactivos necesarios para realizar la transcripción inversa y la amplificación del ADN se suministraron como una mezcla previa disponible comercialmente (p. ej., One-Step RT-PCR o el kit One-Step RT-qPCR de Qiagen) que comprende transcriptasas inversas (p. ej., transcriptasas Sensiscript y Omniscript), una ADN polimerasa (p. ej., ADN polimerasa HotStarTaq) y dNTP. Por otra parte, los tubos de reacción también incluyeron una sonda TaqMan que comprendían un colorante FAM para la detección del producto de ADN amplificado. Para generar un producto de ADN amplificado, cada mezcla de reacción se incubó de acuerdo con un protocolo de desnaturalización y condiciones de elongación que comprenden 5 min a 95 °C, seguido de 20 min a 45 °C, seguido de 2 minutos a 95 °C, y seguido de 40 ciclos de 5 segundos a 95 °C y 30 segundos a 55 °C en un termociclador de PCR en tiempo real. La detección del producto amplificado se produjo durante las incubaciones.

Los resultados de amplificación para H3N2 se representan gráficamente en la **Figura 2** (la **Fig. 2A** corresponde a las diversas muestras víricas patrón, la **Fig. 2B** corresponde a las muestras biológicas) y los resultados de amplificación para H1N1 (2007) se representan gráficamente en la **Fig. 3** (la **Fig. 3A** corresponde a las diversas muestras víricas patrón, la **Fig. 3B** corresponde a las muestras biológicas). La fluorescencia registrada del colorante FAM se representa gráficamente frente al número de ciclos.

Como se muestra en la **Fig. 2A**, cada una de las muestras víricas patrón de H3N2 mostró una señal detectable sobre el control negativo, con valores de Ct que oscilan entre 18 y 32. Tal como se muestra en la **Fig. 2B**, cada una de las

muestras biológicas víricas de H3N2 mostró una señal detectable sobre el control negativo, con valores de Ct que oscilan entre 29-35.

5 Como se muestra en la **Fig. 3A** y con la excepción de la dilución 1/20000, cada una de las muestras víricas patrón de H1N1 (2007) mostró una señal detectable sobre el control negativo, con valores de Ct que oscilan entre 24-35. Tal como se muestra en la **Fig. 3B**, cada una de las muestras biológicas de H1N1 (2007) mostró una señal detectable sobre el control negativo, con valores de Ct que oscilan entre 28-35.

10 En general, los datos mostrados en la **Figura 2** y **Fig. 3** indican que los virus probados podrían detectarse, a través de un producto de ADN amplificado, con buena sensibilidad, a concentraciones tan bajas como 50 UI/ml y en un intervalo de concentración de 4 unidades en escala logarítmica con valores de umbral de ciclo de no más de aproximadamente 40. Por otra parte, los datos también indican que la detección de ARN vírico obtenido de una muestra biológica obtenida de un sujeto también podría detectarse de manera similar.

15 **Ejemplo 2: Amplificación y Detección de Ácido Nucleico Vírico en Diferentes Sistemas Tampón**

Se realizaron experimentos de amplificación y detección para comparar los resultados obtenidos al usar diferentes sistemas tampón para la amplificación. Se realizó un conjunto de experimentos para dos sistemas tampón diferentes, S1 y S2. El tampón S1 incluía un agente tamponador zwitteriónico y BSA, y el tampón S2 incluía un agente tamponador zwitteriónico e hidróxido de sodio. Los experimentos para cada tampón se completaron utilizando un conjunto de muestras patrón de virus de la gripe H5N1 obtenidas como diluciones en serie de una solución de reserva que comprende el virus. La concentración de H5N1 fue de 10^6 UI/ml. Se sometieron a amplificación las diluciones de 1/2, 1/20, 1/200, 1/2000, 1/20000, 1/200000 y un control negativo.

25 Se combinaron cinco microlitros de cada muestra en un tubo de reacción de 25 μ l con los reactivos necesarios para realizar la transcripción inversa del ARN vírico y los reactivos necesarios para completar la amplificación del ADN complementario obtenido de la transcripción inversa (p. ej., amplificación en paralelo del ácido nucleico). Los reactivos necesarios para realizar la transcripción inversa y la amplificación del ADN incluían transcriptasas inversas, una ADN polimerasa, dNTP y el tampón S1 o S2 apropiado. Por otra parte, los tubos de reacción también incluyeron una sonda TaqMan que comprendían un colorante FAM para la detección del producto de ADN amplificado. Para generar un producto de ADN amplificado, cada mezcla de reacción incubada de acuerdo con un protocolo de desnaturalización y condiciones de elongación que comprenden 5 min a 95 °C, seguido de 20 min a 45 °C, seguido de 2 minutos a 95 °C, y seguido de 40 ciclos de 5 segundos a 95 °C y 30 segundos a 55 °C en un termociclador de PCR en tiempo real. La detección del producto amplificado se produjo durante las incubaciones.

35 Los resultados de amplificación para el sistema de tampón S1 se representan gráficamente en la **Fig. 4A** y los resultados de amplificación para el sistema de tampón S2 se representaron gráficamente en la **Fig. 4B**. La fluorescencia registrada del colorante FAM se representa gráficamente frente al número de ciclos.

40 Como se muestra en la **Fig. 4A** cada una de las muestras víricas patrón amplificadas en el sistema de tampón S1 mostró una señal detectable sobre el control negativo, con valores de Ct que oscilan entre 25 y 36. Tal como se muestra en la **Fig. 4B**, cada una de las muestras víricas patrón amplificadas en el tampón S2 mostró una señal detectable sobre el control negativo, con valores de Ct que oscilan entre 25-35.

45 En general, los datos mostrados en la **Fig. 4** indican que el virus probado podría detectarse, a través de un producto de ADN amplificado, con buena sensibilidad, a concentraciones tan bajas como 50 UI/ml y en un intervalo de concentración de 5 unidades en escala logarítmica con valores de umbral de ciclo de no más de aproximadamente 40. Por otra parte, los datos también indican que se pueden obtener resultados de amplificación similares con diferentes sistemas tampón.

50 **Ejemplo 3: Amplificación y Detección del Virus de la Hepatitis B HBV en Muestras de Plasma**

Se realizaron experimentos de amplificación para determinar la solidez de un método de amplificación para detectar ácido nucleico diana en una muestra biológica. Las muestras de plasma sanguíneo humano diluido que comprendían el virus de la hepatitis B (HBV, por sus siglas en inglés) a diversas concentraciones (p. ej., 50 unidades infecciosas por mililitro (UI/ml), 200 UI/ml, 2000 UI/ml, 20000 UI/ml) se sometieron cada una a reacciones de amplificación. El HBV es un virus de ADN que se replica a través de un intermediario de ARN. El HBV es detectable mediante PCR directa del virus de ADN. Se analizaron muestras múltiples (n = 2-4) para cada concentración además de muestras múltiples de un control negativo (p. ej., plasma que no comprende HBV).

60 2,5 μ l de cada muestra con los reactivos necesarios para realizar la transcripción inversa del ARN y los reactivos necesarios para completar la amplificación del ADN complementario obtenido de la transcripción inversa (p. ej., amplificación en paralelo del ácido nucleico) en un tubo de reacción de 50 μ l para obtener una mezcla de reacción. Los reactivos necesarios para realizar la transcripción inversa y la amplificación del ADN se suministraron como una mezcla previa disponible comercialmente (p. ej., One-Step RT-PCR o el kit One-Step RT-qPCR de Qiagen) que comprende transcriptasas inversas (p. ej., transcriptasas Sensiscript y Omniscript), una ADN polimerasa (p. ej., ADN

65

polimerasa HotStarTaq) y dNTP. Por otra parte, la mezcla también incluía una sonda TaqMan que comprendía un colorante FAM para la detección del producto de ADN amplificado. Además, la mezcla de reacción incluía un agente tamponante zwitteriónico y una enzima uracilo-ADN glicosilasa (UNG) para prevenir los efectos inhibidores de los inhibidores de amplificación encontrados en el plasma. Cada mezcla de reacción se incubó de acuerdo con un protocolo de desnaturalización y condiciones de elongación que comprenden 1 min a 94 °C, seguido de 10 min a 50 °C, seguido de 2 minutos a 94 °C, y seguido de 50 ciclos de 5 segundos a 94 °C y 35 segundos a 58 °C en un termociclador de PCR en tiempo real. La detección del producto amplificado se produjo durante las incubaciones.

Los resultados de la amplificación se representan gráficamente en la **Fig. 5** y los valores de Ct determinados se tabulan en la **Tabla 1**. Las unidades de fluorescencia relativa (UFR) registradas del colorante FAM se representan gráficamente frente al número de ciclos en la **Fig. 5**. Como se muestra en la **Fig.5 y Tabla 1**, el HBV podría detectarse en cada concentración probada con valores de umbral de ciclo que oscilan entre 28,99 y 39,39. En general, las muestras de mayor concentración correspondieron a valores de umbral de ciclo más bajos.

En general, los datos mostrados en la **Fig. 5 y Tabla 1** indican que se podría detectar el HBV, a través de un producto de ADN amplificado, con buena sensibilidad, a concentraciones tan bajas como 50 UI/ml (la más baja probada) con valores de umbral de ciclo de no más de aproximadamente 40. Mientras que la concentración más alta probada (20000 UI/ml) fue 400 veces más concentrada que la concentración más baja probada (50 UI/ml), los valores de umbral de ciclo fueron solo aproximadamente un 25 % más altos para concentraciones más bajas, indicando que el esquema de amplificación fue en general sólido.

Tabla 1: Resultados de Ct de los Experimentos del Ejemplo 3

N.º de muestra	UI/ml	Ct
1	2000	33,09
2	50	39,39
3	2,00E+04	29
4	2000	32,97
5	200	35,51
6	2000	33,07
7	2,00E+04	30,03
8	200	35,78
9	50	37,91
10	2,00E+04	29,37
11	200	35,73
12	2,00E+04	28,99

Ejemplo 4: Pre calentamiento de una Muestra Biológica antes de la Amplificación de Ácido Nucleico en la Muestra Biológica y Serie de Reacciones de Amplificación

Se realizaron experimentos de amplificación para determinar el efecto de precalentar una muestra biológica sobre la sensibilidad de la detección y también para determinar el efecto del uso de múltiples series de reacciones de amplificación sobre la sensibilidad de la detección.

Se prepararon veinte mezclas de reacción de 25 µl, con cada mezcla de reacción que comprende 1 µl de una especie patógena, reactivos necesarios para completar las reacciones de amplificación de ácido nucleico apropiadas (p. ej., transcripción inversa y amplificación de ADN para especies de ARN, y amplificación de ADN para especies de ADN), y una sonda TaqMan que comprendía un colorante FAM. Cuatro de las mezclas de reacción contenían H1N1 (2007) (es decir, un virus de ARN) cuatro de las mezclas de reacción contenían H3N2 (es decir, un virus de ARN), cuatro de las mezclas de reacción contenían H1N1 (2009), cuatro de las mezclas de reacción contenían tuberculosis (TB) (es decir, una muestra bacteriana) y cuatro de las mezclas de reacción contenían virus de la enfermedad Aleutiana (ADV) (es decir, un virus de ADN). Las especies patógenas H1N1(2007), H1N1(2009), H3N2 y ADV provenían de hisopos orofaríngeos obtenidos de sujetos. La TB se obtuvo de una reserva de bacterias.

Se utilizaron varias combinaciones de protocolos de pre calentamiento y amplificación que se resumen en la **Tabla 2**. Para la primera mezcla de reacción para cada especie patógena, la especie patógena se precalienta 10 minutos a 95 °C antes de añadirla a la mezcla de reacción. Después de la adición de las especies patógenas a la mezcla de reacción, la mezcla de reacción se incubó de acuerdo con un protocolo de desnaturalización y condiciones de elongación que comprenden 2 minutos a 95 °C seguido de 40 ciclos de 5 segundos a 95 °C y 30 segundos a 55 °C en un termociclador de PCR en tiempo real. La detección del producto amplificado se produjo durante las incubaciones. Estas mezclas de reacción se denominan mezclas PH-1.

Para la segunda mezcla de reacción para cada especie patógena, la especie patógena se precalienta 30 minutos a 50 °C antes de añadirla a la mezcla de reacción. Después de la adición de las especies patógenas a la mezcla de reacción, la mezcla de reacción se incubó de acuerdo con un protocolo de desnaturalización y condiciones de elongación que comprenden 2 minutos a 95 °C seguido de 40 ciclos de 5 segundos a 95 °C y 30 segundos a 55 °C en

un termociclador de PCR en tiempo real. La detección del producto amplificado se produjo durante las incubaciones. Estas mezclas de reacción se denominan mezclas PH-2.

Para la tercera mezcla de reacción para cada especie patógena, la especie patógena no se precalentó antes de añadirla a la mezcla de reacción. Estas mezclas de reacción se incubaron de acuerdo con un protocolo de desnaturalización y condiciones de elongación que comprenden 1 minuto a 95 °C, seguido de 10 minutos a 55 °C, seguido de 2 minutos a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 5 segundos a 95 °C y 30 segundos a 55 °C en un termociclador de PCR en tiempo real. La detección del producto amplificado se produjo durante las incubaciones. Estas mezclas de reacción se denominan mezclas PTC-1.

Para la cuarta mezcla de reacción para cada especie patógena, la especie patógena no se precalentó antes de añadirla a la mezcla de reacción. Estas mezclas de reacción se sometieron a un protocolo que comprende una pluralidad de series de reacciones de amplificación, comprendiendo cada serie múltiples ciclos de desnaturalización y condiciones de elongación. Las mezclas de reacción se incubaron de acuerdo con dicho protocolo que comprende 1 minuto a 95 °C, seguido de 10 ciclos de la Serie 1 (95 °C durante 5 segundos, 20 segundos de 60-50 °C, reduciendo 1 °C/ciclo, y 60 °C durante 10 segundos), seguido de 2 minutos a 95 °C durante 2 minutos, seguido de 40 ciclos de la Serie 2 (95 °C durante 5 segundos, 55 °C durante 30 segundos) en un termociclador de PCR en tiempo real. Las Serie 1 y Serie 2 difieren en su temperatura de elongación y duración de elongación. La detección del producto amplificado se produjo durante las incubaciones. Estas mezclas de reacción se denominan mezclas PTC-2.

Tabla 2: Condiciones Experimentales del Ejemplo 4

Tipo de Mezcla de Reacción	Protocolo
PH-1	95 °C 10 minutos de precalentamiento en especies patógenas antes de añadir a la mezcla de reacción, después 95 °C durante 2 minutos, (95 °C durante 5 segundos, 55 °C durante 30 segundos) x 40 ciclos
PH-2	50 °C 30 minutos de precalentamiento en patógeno antes de añadir a la mezcla de reacción, después 95 °C durante 2 minutos, (95 °C durante 5 segundos, 55 °C durante 30 segundos) x 40 ciclos
PTC-1	95 °C durante 1 minuto, 55 °C durante 10 minutos, después 95 °C durante 2 minutos, (95 °C durante 5 segundos, 55 °C durante 30 segundos) x 40 ciclos
PTC-2	95 °C durante 1 minuto, (95 °C durante 5 segundos, 60-50 °C, reduciendo 1 °C/ciclo, durante 20 segundos, 60 °C durante 10 segundos) x 10 ciclos, después 95 °C durante 2 minutos, (95 °C durante 5 segundos, 55 °C durante 30 segundos) x 40 ciclos

Los resultados de cada especie patógena se representan gráficamente en la **Fig. 6** (H1N1 (2007)), **Fig. 7** (H3N2), **Fig. 8** (H1N1 (2009)), **Fig. 9** (TB), y **Fig. 10** (ADV). El artículo **A** en cada **Fig. 6-10** representa los resultados obtenidos para las mezclas de reacción PH-1 y PH-2, mientras que el artículo **B** en cada **Fig. 6-10** representa los resultados obtenidos para la mezcla de reacción PTC-1 y PTC-2. Los valores de Ct determinados para cada experimento se resumen en la **Tabla 3**. No se pudieron determinar los valores de Ct para las mezclas de reacción de ADV PH-1 y PH-2, correspondientes con los datos mostrados en la **Fig. 10A**.

Según los datos mostrados en la **Tabla 3**, los valores de Ct fueron bastante similares entre las mezclas de reacción PH-1 y PH-2, indicando que una especie patógena (o muestra biológica que comprende una especie patógena) podría precalentarse en una variedad de condiciones para obtener una sensibilidad de detección similar. Por otra parte, las mezclas de reacción PTC-1 tenían valores de Ct similares a los determinados para las mezclas de reacción PH-1 y PH-2. Los protocolos PTC-1 y PH-1/PH-2 fueron similares, excepto que PTC-1 no incluyó una etapa de precalentamiento. Por lo tanto, una comparación de los datos de PTC-1 con los datos de PH-1/PH-2 indica que el precalentamiento de una especie patógena antes de proporcionarla a una mezcla de reacción puede no ser necesario para obtener resultados con buena sensibilidad. Sin embargo, en algunos casos con muestras de TB y ADV, el precalentamiento puede ser incluso peor que sin precalentamiento.

Sin embargo, para todas las especies patógenas probadas, los valores de PTC-2 Ct fueron más bajos que cualquiera de PH-1, PH-2 o PTC-1. Una comparación de los datos de PTC-1 y PTC-2 indica que someter las mezclas de reacción a una serie múltiple de reacciones de amplificación, con cada serie que comprende múltiples ciclos de desnaturalización y condiciones de elongación, puede mejorar la sensibilidad de la detección.

Tabla 3: Resultados de Ct de los Experimentos del Ejemplo 4

Tipo	Muestra	PH-1 (Ct)	PH-2 (Ct)	PTC-1 (Ct)	PTC-2 (Ct)
Virus de ARN	H1N1(2007)	27	30	28	22
Virus de ARN	H3N2	34	33	32	23
Virus de ARN	H1N1 (2009)	32	32	32	24
Bacterias de ADN	TB	34	32	26	20
Virus de ADN	ADV	-	-	36	30

Ejemplo 5: Muestras de Multiplexación

Se realizaron experimentos de amplificación y detección para comparar varios protocolos de amplificación y para determinar si se podía lograr la multiplexación. Las muestras biológicas que comprendían patógenos víricos de ARN (p. ej., H1N1 (2007), H1N1 (2009), H3N2) o ADN (p. ej., ADV, del bocavirus humano (HBoV) o patógenos bacterianos de ADN (p. ej., TB) se sometieron a diversas condiciones de amplificación. Cada muestra biológica se obtuvo directamente de un sujeto a través de un hisopo orofaríngeo, a excepción de las muestras de TB que provenían de una reserva de bacterias. Se combinó un microlitro de cada muestra en un tubo de reacción de 25 µl con los reactivos necesarios para llevar a cabo la amplificación de ácidos nucleicos y detectar el producto amplificado como se describe en el presente documento para obtener una mezcla de reacción.

Para evaluar las capacidades de multiplexación de un protocolo de amplificación, se incubaron tres mezclas de reacción, cada una compuesta por uno de H3N2, ADV, o una mezcla de H3N2 y ADV de acuerdo con un protocolo de amplificación que comprende 2 minutos a 94 °C, 20 min a 45 °C, 1 min a 94 °C, seguido de 50 ciclos de 5 segundos a 94 °C y 35 segundos a 55 °C en un termociclador de PCR en tiempo real. La detección del producto amplificado se produjo durante las incubaciones.

Los resultados de los experimentos se representan gráficamente en la Fig.11 y se muestran a continuación en la Tabla 4. Como se muestra en la Fig. 11, tanto H3N2 como TB podrían detectarse de manera similar cuando se combinan o en ausencia del otro. En ausencia de ADV, se registró un valor de Ct de 26,03 para la mezcla de reacción de H3N2 y en ausencia de H3N2, se registró un valor de Ct de 30,5 para la mezcla de reacción de ADV. Cuando ambos H3N2 y ADV se combinaron en una sola mezcla de reacción, se obtuvieron valores de Ct de 26 (H3N2) y 30 (ADV). Los valores de Ct fueron casi idénticos para la mezcla de reacción combinada en comparación con las mezclas de reacción de un solo componente. Los resultados indican que la multiplexación se puede lograr con buena sensibilidad y que se pueden detectar especies tanto de ARN como de ADN.

Tabla 4: Resultados del Experimento de Multiplexación H3N2 y ADV del Ejemplo 5

Tipo	Muestra	Ct
Virus de ARN	H3N2	26,03
Virus de ADN	ADV	30,5
Virus de ARN y ADN	H3N2 y ADV	26(H3N2) y 30(ADV)

En otro experimento para evaluar las capacidades de multiplexación de un protocolo de amplificación, se incubaron tres mezclas de reacción, cada una compuesta por uno de H3N2, TB, o una mezcla de H3N2 y TB de acuerdo con un protocolo de amplificación que comprende 2 minutos a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 5 segundos a 95 °C y 30 segundos a 55 °C en un termociclador de PCR en tiempo real. La detección del producto amplificado se produjo durante las incubaciones.

Los resultados de los experimentos se representan gráficamente en la Fig.12 y se muestra a continuación en la Tabla 5. Como se muestra en la Fig. 12, tanto H3N2 como TB podrían detectarse de manera similar cuando se combinan o en ausencia del otro. En ausencia de TB, se registró un valor de Ct de 32 para la mezcla de reacción de H3N2 y en ausencia de H3N2, se registró un valor de Ct de 32 para la mezcla de reacción de TB. Cuando ambos H3N2 y TB se combinaron en una sola mezcla de reacción, se obtuvieron valores de Ct de 29 (H3N2) y 30 (TB). Los valores de Ct fueron similares para la mezcla de reacción combinada en comparación con las mezclas de reacción de un solo componente. Los resultados indican que la multiplexación se puede lograr con buena sensibilidad y que tanto las especies de ARN como de ADN se pueden detectar en un esquema de multiplexación.

Tabla 5: Resultados del Experimento de Multiplexación de H3N2 y TB del Ejemplo 5

Tipo	Muestra	Ct
Virus de ARN	H3N2	32
Virus de ADN	TB	32
Virus de ARN y ADN	H3N2 y TB	29(H3N2) y 30(TB)

Ejemplo 6: Comparación de Múltiples Series de Reacciones de Amplificación

Se realizaron experimentos de amplificación y detección para comparar varios protocolos de amplificación que comprendían múltiples series de reacciones de amplificación. Las muestras biológicas que comprendían patógenos víricos de ARN (p. ej., H1N1 (2007), H1N1 (2009), H3N2) o ADN (p. ej., ADV, del bocavirus humano (HBoV) o patógenos bacterianos de ADN (p. ej., TB) se sometieron a diversas condiciones de amplificación. Cada muestra biológica se obtuvo directamente de un sujeto a través de un hisopo orofaríngeo, a excepción de las muestras de TB que provenían de una reserva de bacterias. Se combinó un microlitro de cada muestra en un tubo de reacción de 25 µl con los reactivos necesarios para llevar a cabo la amplificación de ácidos nucleicos y detectar el producto amplificado como se describe en el presente documento para obtener una mezcla de reacción.

En un conjunto de experimentos, las mezclas de amplificación se sometieron a un protocolo de amplificación que

comprende dos series de reacciones de amplificación, comprendiendo cada serie diferentes condiciones de desnaturalización y elongación. Se incubaron seis mezclas de reacción (dos que comprendían H3N2, dos que comprendían ADV, dos que comprendían HBoV) de acuerdo con un protocolo de amplificación que comprende 1 segundo a 94 °C, seguido de 11 ciclos de la Serie 1 (1 segundo a 94 °C y 10 segundos a 45 °C), seguido de 1 minuto a 95 °C, seguido de 40 ciclos de la Serie 2 (5 segundos a 95 °C y 30 segundos a 55 °C) en un termociclador de PCR en tiempo real. La detección del producto amplificado se produjo durante las incubaciones.

Los resultados de los experimentos se muestran a continuación en la **Tabla 6**. Como se muestra en la **Tabla 6**, los valores de Ct determinados oscilaron entre 8,35 y 23. Los resultados indican que los protocolos que comprendían múltiples series de reacciones de amplificación pueden ser útiles para lograr una buena sensibilidad. Por otra parte, los resultados también indican que tanto las especies de ARN como de ADN pueden detectarse con protocolos que comprenden múltiples series de reacciones de amplificación.

Tabla 6: Resultados del Experimento con H3N2, ADV y HBoV del Ejemplo 6

Tipo	Muestra	Ct
Virus de ARN	H3N2-1	17
Virus de ARN	H3N2-2	20
Virus de ADN	ADV-1	18,8
Virus de ADN	ADV-2	23
Virus de ADN	HBoV-1	8,35
Virus de ADN	HBoV-2	18,37

En otro conjunto de experimentos, las mezclas de amplificación se sometieron a un protocolo de amplificación que comprende tres series de reacciones de amplificación, las series difieren de las demás con respecto a su condición de desnaturalización y/o elongación. Se incubaron cinco mezclas de reacción (una que comprende sH1N1 (2007), una que comprende H3N2, una que comprende pH1N1 (2009), una que comprende ADV y una que comprende TB) de acuerdo con un protocolo de amplificación que comprende 1 minuto a 94 °C, seguido de 5 ciclos de la Serie 1 (5 segundos a 94 °C y 30 segundos a 60-50 °C disminuyeron 1 °C/ciclo), seguido de 5 ciclos de la Serie 2 (5 segundos a 94 °C y 30 segundos a 50 °C), seguido de 2 minutos a 95 °C, seguido de 40 ciclos de la Serie 3 (5 segundos a 95 °C y 30 segundos a 55 °C) en un termociclador de PCR en tiempo real. La detección del producto amplificado se produjo durante las incubaciones.

Los resultados de los experimentos se muestran a continuación en la **Tabla 7**. Como se muestra en la **Tabla 7**, los valores de Ct determinados oscilaron entre 20 y 30. Los resultados indican que los protocolos que comprendían múltiples series de reacciones de amplificación pueden ser útiles para lograr una buena sensibilidad. Por otra parte, los resultados también indican que tanto las especies de ARN como de ADN pueden detectarse con protocolos que comprenden múltiples series de reacciones de amplificación.

Tabla 7: Resultados del Experimento de sH1N1 (2007), H3N2, pH1N1(2009), ADV y TB del Ejemplo 6

Tipo	Muestra	Ct
Virus de ARN	sH1N1(2007)	22
Virus de ARN	H3N2	23
Virus de ARN	pH1N1(2009)	24
Virus de ADN	ADV	30
Bacterias de ADN	TB	20

Ejemplo 7: Comparación de Múltiples Series de Reacciones de Amplificación

Se realizaron experimentos de amplificación y detección para comparar varios protocolos de amplificación que comprendían múltiples series de reacciones de amplificación. Las muestras biológicas que comprendían H3N2 se sometieron a diversas condiciones de amplificación. Cada muestra biológica se obtuvo directamente de un sujeto a través de un hisopo orofaríngeo. Se combinó un microlitro de cada muestra en un tubo de reacción de 25 µl con los reactivos necesarios para llevar a cabo la amplificación de ácidos nucleicos y detectar el producto amplificado como se describe en el presente documento para obtener una mezcla de reacción.

Las mezclas de amplificación se sometieron a protocolos de amplificación, comprendiendo algunos una de las tres primeras series diferentes de reacciones de amplificación y la misma segunda serie, comprendiendo las tres primeras series condiciones de desnaturalización y elongación diferentes a las de la segunda serie. Cada una de las primeras series y la segunda serie comprendían múltiples ciclos. Se realizó otro experimento sin una primera serie, comprendiendo solo la segunda serie. En un termociclador de PCR en tiempo real, cada una de las cuatro mezclas de reacción que comprendían H3N2 se incubaron de acuerdo con uno de los protocolos de amplificación que se muestran a continuación en la **Tabla 8**:

Tabla 8: Protocolos Experimentales en el Ejemplo 7

Mezcla de Reacción	Protocolo
1	94 °C durante 1 minuto, (Serie 1A - 94 °C durante 1 segundo, 45 °C durante 2 minutos) x 5 ciclos, 95 °C durante 1 minuto, (Serie 2 - 95 °C durante 5 segundos, 55 °C durante 30 segundos) x 50 ciclos
2	80 °C durante 2 minutos, (Serie 1B - 80 °C durante 1 segundo, 45 °C durante 2 minutos) x 5 ciclos, 95 °C durante 1 minuto, (Serie 2 - 95 °C durante 5 segundos, 55 °C durante 30 segundos) x 50 ciclos
3	80 °C durante 2 minutos, 45 °C durante 30 minutos, 95 °C durante 1 minuto, (Serie 2 - 95 °C durante 5 segundos, 55 °C durante 30 segundos) x 50 ciclos
4	94 °C durante 1 segundo, (Serie 1C - 94 °C durante 1 segundo, 45 °C durante 30 segundos) x 50 ciclos, (Serie 2 - 95 °C durante 5 segundos, 55 °C durante 30 segundos) x 50 ciclos

Los resultados de los experimentos se representan gráficamente en la **Fig. 13** y se tabula a continuación en **Tabla 9**. Como se muestra en la **Fig. 13**, la mezcla de reacción 3 tenía el valor de Ct más alto (28,59). Las otras que comprendían series múltiples tuvieron valores más bajos que van desde 8,5 a 26,5. Los resultados indican que los protocolos que comprendían múltiples series de reacciones de amplificación pueden ser útiles para lograr una buena sensibilidad. Por otra parte, los resultados también indican que los protocolos que comprendían múltiples series de reacciones de amplificación pueden lograr una mejor sensibilidad en comparación con los protocolos con una sola serie.

Tabla 9: Resultados Experimentales del Ejemplo 7

Mezcla de Reacción	Ct
1	22,97
2	26,5
3	28,59
4	8,5

Ejemplo 8: Comparación de Múltiples Series de Reacciones de Amplificación

Se realizaron experimentos de amplificación y detección para comparar varios protocolos de amplificación que comprendían múltiples series de reacciones de amplificación. Las muestras biológicas que comprendían H3N2 se sometieron a diversas condiciones de amplificación. Cada muestra biológica se obtuvo directamente de un sujeto a través de un hisopo orofaríngeo. Se combinó un microlitro de cada muestra en un tubo de reacción de 25 µl con los reactivos necesarios para llevar a cabo la amplificación de ácidos nucleicos y detectar el producto amplificado como se describe en el presente documento para obtener una mezcla de reacción.

Las mezclas de amplificación se sometieron a protocolos de amplificación, comprendiendo algunos una de las seis primeras series diferentes de reacciones de amplificación y la misma segunda serie, comprendiendo las seis primeras series condiciones de desnaturalización y elongación diferentes a las de la segunda serie. Se realizaron otros seis experimentos sin una primera serie. En un termociclador de PCR en tiempo real, cada una de las doce mezclas de reacción que comprendían H3N2 se incubaron de acuerdo con uno de los protocolos de amplificación mostrados a continuación en la **Tabla 10**:

Tabla 10: Protocolos Experimentales en el Ejemplo 8

Mezcla de Reacción	Protocolo
1	95 °C durante 3 minutos, 45 °C durante 5 minutos, 95 °C durante 1 minuto, (Serie 2 - 95 °C durante 5 segundos, 55 °C durante 30 segundos) x 40 ciclos
2	95 °C durante 10 minutos, 45 °C durante 5 minutos, 95 °C durante 1 minuto, (Serie 2 - 95 °C durante 5 segundos, 55 °C durante 30 segundos) x 40 ciclos
3	95 °C durante 3 minutos, 45 °C durante 20 minutos, 95 °C durante 1 minuto, (Serie 2 - 95 °C durante 5 segundos, 55 °C durante 30 segundos) x 40 ciclos
4	95 °C durante 10 minutos, 45 °C durante 20 minutos, 95 °C durante 1 minuto, (Serie 2 - 95 °C durante 5 segundos, 55 °C durante 30 segundos) x 40 ciclos
5	95 °C durante 10 minutos, 45 °C durante 3 minutos, 95 °C durante 1 minuto, (Serie 2 - 95 °C durante 5 segundos, 55 °C durante 30 segundos) x 40 ciclos
6	45 °C durante 20 minutos, 95 °C durante 1 minuto, (Serie 2 - 95 °C durante 5 segundos, 55 °C durante 30 segundos) x 40 ciclos

(continuación)

Mezcla de Reacción	Protocolo
7	94 °C durante 2 minutos, (Serie 1A - 94 °C durante 1 segundo, 45 °C durante 10 segundos) x 10 ciclos, 95 °C durante 1 minuto, (Serie 2 - 95 °C durante 5 segundos, 55 °C durante 30 segundos) x 50 ciclos
8	94 °C durante 10 segundos, (Serie 1B - 94 °C durante 1 segundo, 45 °C durante 10 segundos) x 10 ciclos, 95 °C durante 1 minuto, (Serie 2 - 95 °C durante 5 segundos, 55 °C durante 30 segundos) x 50 ciclos
9	94 °C durante 2 minutos, (Serie 1C - 94 °C durante 10 segundos, 45 °C durante 20 segundos) x 10 ciclos, 95 °C durante 1 minuto, (Serie 2 - 95 °C durante 5 segundos, 55 °C durante 30 segundos) x 50 ciclos
10	94 °C durante 10 segundos, (Serie 1D - 94 °C durante 10 segundos, 45 °C durante 20 segundos) x 10 ciclos, 95 °C durante 1 minuto, (Serie 2 - 95 °C durante 5 segundos, 55 °C durante 30 segundos) x 50 ciclos
11	94 °C durante 2 minutos, (Serie 1E - 94 °C durante 30 segundos, 45 °C durante 60 segundos) x 10 ciclos, 95 °C durante 1 minuto, (Serie 2 - 95 °C durante 5 segundos, 55 °C durante 30 segundos) x 50 ciclos
12	94 °C durante 10 segundos, (Serie 1F - 94 °C durante 30 segundos, 45 °C durante 60 segundos) x 10 ciclos, 95 °C durante 1 minuto, (Serie 2 - 95 °C durante 5 segundos, 55 °C durante 30 segundos) x 50 ciclos

Los resultados de los experimentos se tabulan a continuación en la **Tabla 11**. Los valores de Ct oscilaron entre 14,53 y 27,28, con mezclas de reacción 2-5 que tienen producto no detectado. Hablando en general, las mezclas de reacción no sometidas a múltiples series de reacciones de amplificación no tenían producto detectable o tenían valores de Ct más altos que las mezclas de reacción sometidas a múltiples series de reacción de amplificación. Los resultados indican que los protocolos que comprendían múltiples series de reacciones de amplificación pueden ser útiles para lograr una buena sensibilidad. Por otra parte, los resultados también indican que los protocolos que comprendían múltiples series de reacciones de amplificación pueden lograr una mejor sensibilidad en comparación con los protocolos con una sola serie. En algunos casos, pueden ser necesarias múltiples series de reacciones de amplificación para producir cantidades detectables de producto amplificado.

Tabla 11: Resultados Experimentales del Ejemplo 8

Mezcla de Reacción	Ct
1	26,03
2	-
3	-
4	-
5	-
6	27,28
7	21,64
8	19,56
9	17,2
10	14,53
11	19,2
12	-

Ejemplo 9: Comparación de Resultados con Muestra Purificada y No Purificada

Se realizaron experimentos de amplificación y detección para comparar los resultados obtenidos con muestras purificadas y no purificadas. Las muestras biológicas purificadas y no purificadas que comprendían H1N1 se sometieron a un protocolo de amplificación. Cada muestra biológica se obtuvo directamente de un sujeto a través de un hisopo orofaríngeo. Se combinó un microlitro de cada muestra en un tubo de reacción de 25 µl con los reactivos necesarios para llevar a cabo la amplificación de ácidos nucleicos y detectar el producto amplificado como se describe en el presente documento para obtener una mezcla de reacción. Se generaron tres mezclas de reacción, comprendiendo dos de las mezclas de reacción una muestra purificada por una de purificación en columna o purificación magnética. La tercera mezcla de reacción comprendía muestra no purificada.

Las mezclas de reacción se incubaron de acuerdo con un protocolo de amplificación que comprende 2 minutos a 94 °C, 20 minutos a 45 °C, 1 minuto a 94 °C, seguido de 50 ciclos de 5 segundos a 94 °C y 35 segundos a 55 °C en un termociclador de PCR en tiempo real. La detección del producto amplificado se produjo durante las incubaciones.

Los resultados de los experimentos se representan gráficamente en la Fig. 14 y se muestran a continuación en la **Tabla 12**. Como se muestra en la **Tabla 12**, los valores de Ct determinados oscilaron entre 27 y 31 y fueron similares entre la muestra no purificada y la muestra purificada por diversos medios. Los resultados indican que la purificación

de las muestras puede no ser necesaria para lograr una sensibilidad de detección similar.

Tabla 12: Resultados Experimentales del Ejemplo 9

Tipo de Muestra	Ct
Purificación en Columna	31
Purificación con Cuentas Magnéticas	27
No purificada	28

5 Ejemplo 10: Análisis de Muestras de Sangre Total y Saliva

Se realizaron experimentos de amplificación y detección en muestras de sangre y saliva que contenían virus H3N2. Se probaron cuatro muestras diferentes. Dos muestras que comprendían cualquiera de las muestras de sangre total o saliva y dos muestras que comprendían una dilución de 10 veces (en PBS) de cualquiera de las muestras de sangre total o saliva. Cada una de las cuatro muestras se combinó con los reactivos necesarios para realizar la transcripción inversa del ARN vírico y los reactivos necesarios para completar la amplificación del ADN complementario obtenido de la transcripción inversa. Los reactivos necesarios para realizar la transcripción inversa y la amplificación del ADN se suministraron como una mezcla previa disponible comercialmente (p. ej., One-Step RT-PCR o el kit One-Step RT-qPCR de Takara) que comprende transcriptasas inversas (p. ej., transcriptasas Sensiscript y Omniscript), una ADN polimerasa (p. ej., ADN polimerasa HotStarTaq) y dNTP. Por otra parte, los tubos de reacción también incluyeron una sonda TaqMan que comprendían un colorante FAM para la detección del producto de ADN amplificado. Para generar un producto de ADN amplificado, cada mezcla de reacción se incubó de acuerdo con un protocolo de desnaturalización y condiciones de elongación que comprenden 20 minutos a 45 °C, seguido de 2 minutos a 94 °C, seguido de 42 ciclos de 5 segundos a 94 °C y 35 segundos a 55 °C en un termociclador de PCR en tiempo real. La detección del producto amplificado se produjo durante las incubaciones.

Los resultados de amplificación para H3N2 se representan gráficamente en la Fig. 15 (la Fig. 15A corresponde a sangre no diluida, la Fig. 15B corresponde a sangre diluida) y en la Fig. 16 (Fig. 16A corresponde a saliva no diluida, la Fig. 16B corresponde a saliva diluida). La fluorescencia registrada del colorante FAM se representa gráficamente frente al número de ciclos.

Como se muestra en las Fig. 15 y Fig. 16, tanto las mezclas de reacción de sangre y saliva diluidas como no diluidas mostraron una señal detectable, con valores de Ct que oscilan entre 24-33. Por lo tanto, los datos mostrados en las Fig. 15 y 16 indican que las muestras biológicas no diluidas podrían analizarse con buena sensibilidad, con valores de Ct de no más de aproximadamente 40. Por otra parte, los datos también indican que, en casos donde la dilución de la muestra es necesaria para el análisis, el producto amplificado también puede detectarse de manera similar. En algunos casos, si los inhibidores de las muestras son demasiado, la dilución puede ser otra forma de eliminar la inhibición de la muestra, por ejemplo, sangre completa.

35 Ejemplo 11: PCR anidada

Los experimentos de amplificación y detección se realizan en muestras que contienen virus H1N1. Se prueban ocho muestras. Cada muestra incluye reserva de virus H1N1 (2007). Las muestras se diluyen cada una en PBS, a las diluciones indicadas en la Tabla 13 a continuación. La concentración de la reserva de virus es 1x10⁶ UI/ml. Para generar un producto de ADN amplificado, una mezcla de reacción que comprende una muestra dada se incuba de acuerdo con un protocolo de desnaturalización y condiciones de elongación. El protocolo comprende: (i) en una primera ejecución, calentar la mezcla en un termociclador a 94 °C durante 1 minuto seguido de 10 o 15 ciclos (como se indica en la Tabla 13 a continuación) de 5 segundos a 94 °C y 10 segundos a 57 °C; y (ii) en una segunda ejecución, calentar la mezcla en el termociclador a 94 °C durante 1 minuto seguido de 35 ciclos de 5 segundos a 94 °C y 30 segundos a 57 °C. Se añade una muestra de dilución en serie de 1 µl a una premezcla de qPCR de un paso de Takara en un volumen de reacción de 25 µl. Después de la primera ejecución durante determinados ciclos, se añade 1 µl de la reacción a la mezcla de reacción de la segunda ejecución. Los resultados de la amplificación para H1N1 se representan gráficamente en la Figura 17. La figura muestra las unidades de fluorescencia relativa (UFR) registradas en función del número de ciclo. Los gráficos para cada una de las ocho muestras (1-8) se han indicado en la figura. Las muestras con señales detectables tienen los valores de Ct indicados en la Tabla 13.

Tabla 13: Resultados Experimentales del Ejemplo 11

N.º	1	2	3	4	5	6	7	8
Dilución de la muestra	1/10	1/100	1/1000	0	1/10	1/100	1/1000	0
Ct	18	21	27	-	11	17	24	-
Ciclos de la primera ejecución	10 ciclos				15 ciclos			

55 Ejemplo 12: Amplificación y Detección de Plásmido Recombinante de Ébola

Se realizaron experimentos de amplificación y detección en muestras de sangre completa humana que comprendían varios números de copias del plásmido recombinante correspondiente al virus del Ébola Zaire (Zaire-EBOV). Se

analizaron ocho muestras. Seis de las muestras incluyeron el plásmido recombinante en un número de copias en particular (250000, 25000, 2500, 250, 25 y 2,5 copias) y dos de las muestras (una que tenía sangre solamente, una que tenía agua solamente) sirvieron como muestras de control. Se analizaron muestras de sangre completa sin purificación de las muestras.

5 Cada muestra se combinó con los reactivos necesarios para la amplificación de ácidos nucleicos (p. ej., ADN polimerasa, dNTP, cebadores, cofactores, tampón adecuado, cebadores, etc.) y un agente indicador (p. ej., una sonda oligonucleotídica que comprende colorante FAM) en una mezcla de reacción. Un sumario de las diversas mezclas de reacción por número de muestra, incluido el número de copias del plásmido recombinante, se muestra en la Tabla 14.

10 Para generar producto amplificado, cada mezcla de reacción se sometió a dos series de condiciones de desnaturalización y elongación. Las dos series fueron las siguientes: (i) en una primera serie, 15 ciclos de 1 segundo a 95 °C y 1 segundo a 45 °C, seguido de 1 min a 95 °C; y (ii) en una segunda serie, 45 ciclos de 5 segundos a 95 °C y 10 segundos a 55 °C. Durante la segunda serie, se registró la señal del agente indicador para generar curvas de amplificación y obtener valores de Ct. Las curvas de amplificación para los experimentos se representan gráficamente en la Fig. 18, cada uno etiquetado por el número de muestra correspondiente a los números de muestra mostrados en la Tabla 14. Los resultados representados en la Fig. 18 muestran las unidades de fluorescencia relativa (UFR) registradas en función del número de ciclo. Los valores de Ct obtenidos de las curvas mostradas en la Fig. 18 se resumen en la Tabla 15.

15

20 Como se muestra en la Fig. 18, el plásmido recombinante se detectó a través de productos amplificados para todas las muestras que incluían el plásmido recombinante, excepto para la muestra 6. Por otra parte, el plásmido recombinante no se detectó en ninguna de las muestras de control (muestras 7 y 8). Por consiguiente, los resultados mostrados en la Fig. 18 indican que, en algunos casos, se puede obtener una sensibilidad de detección de 25 copias de plásmido/rxn utilizando múltiples series de condiciones de desnaturalización y elongación y sin purificación de las

25 muestras.

Tabla 14: Mezclas de reacción experimentales del Ejemplo 12

Muestra	plásmido (copias/rxn)
1	250000
2	25000
3	2500
4	250
5	25
6	2,5
7	0 (sangre solamente)
8	0 (agua solamente)

Tabla 15: Valores de Ct determinados a partir de experimentos en el Ejemplo 12

Muestra	Copias/rxn	Ct
1	250000	26,12
2	25000	33,61
3	2500	37,61
4	250	40,61
5	25	42,97
6	2,5	---
7	0	---
8	0	---

30

Ejemplo 13: Amplificación y Detección del virus del Ébola

Se realizaron experimentos de amplificación y detección en muestras de sangre completa humana que comprendían varios números de copias del pseudovirus del virus del Ébola Zaire (Zaire-EBOV). Se analizaron ocho muestras por duplicado (conjunto duplicado número 1 y conjunto duplicado número 2) para un total de dieciséis muestras. Seis de las muestras incluyeron el pseudovirus en un número de copias en particular (2500000, 250000, 25000, 2500, 250 y 25 copias) y dos de las muestras (una que tenía sangre solamente, una que tenía agua solamente) sirvieron como muestras de control. Se analizaron muestras de sangre completa sin purificación de las muestras.

35

40 Cada muestra se combinó con los reactivos necesarios para la transcripción inversa y la amplificación de ácidos nucleicos (p. ej., transcriptasa inversa, ADN polimerasa, dNTP, cofactores, cebadores, tampón adecuado, etc.) y un agente indicador (p. ej., una sonda oligonucleotídica que comprende colorante FAM) en una mezcla de reacción de 30 µl. Un sumario de las mezclas de reacción por número de muestra, incluido el número de copias de pseudovirus, se muestra en la Tabla 16. Para generar producto amplificado a partir del pseudovirus, cada mezcla de reacción se sometió a dos series de condiciones de desnaturalización y elongación. Las dos series fueron las siguientes: (i) en una primera serie, 15 ciclos de 1 segundo a 95 °C y 1 segundo a 45 °C, seguido de 1 min a 95 °C; y (ii) en una segunda serie, 45 ciclos de 5 segundos a 95 °C y 10 segundos a 55 °C. Durante la segunda serie, se registró la señal del agente

45

indicador para generar curvas de amplificación y obtener valores de Ct. Las curvas de amplificación para los experimentos se representan gráficamente en la **Fig. 19A** (juego duplicado número 1) y en la **Fig. 19B** (juego duplicado número 2), cada uno etiquetado por el número de muestra correspondiente a los que se muestran en la Tabla 16. Los resultados representados en la **Fig. 19A** y **Fig. 19B** muestra las unidades de fluorescencia relativa (UFR) registradas en función del número de ciclo. Los valores de Ct obtenidos de las curvas mostradas en la **Fig. 19A** y **Fig. 19B** se resumen en la Tabla 17, con "Ct 1" correspondiente al conjunto duplicado número 1 y "Ct 2" correspondiente al conjunto duplicado número 2.

Como se muestra en la **Fig. 19A** y **Fig. 19B**, se detectó pseudovirus, en ambos conjuntos duplicados, a través de productos amplificados para todas las muestras que incluían pseudovirus (muestras 1-6). Por otra parte, el pseudovirus no se detectó en ninguna de las muestras de control (muestras 7 y 8). Por consiguiente, los resultados mostrados en la **Fig. 19A** y **Fig. 19B** indican que, en algunos casos, se puede obtener una sensibilidad de detección de 25 copias de virus/rxn utilizando múltiples series de condiciones de desnaturalización y elongación y sin purificación de las muestras.

Tabla 16: Mezclas de reacción experimentales del Ejemplo 13

Muestra	Pseudovirus (copias/rxn)
1	2500000
2	250000
3	25000
4	2500
5	250
6	25
7	0 (sangre solamente)
8	0 (agua solamente)

Tabla 17: Valores de Ct determinados a partir de experimentos en el Ejemplo 13

Muestra	Copias/rxn	Ct 1	Ct 2
1	2500000	8,57	8,44
2	250000	12,09	11,27
3	25000	15,03	14,99
4	2500	18,90	18,87
5	250	21,71	21,71
6	25	27,86	39,42
7	0 (sangre solamente)	---	---
8	0 (agua solamente)	---	---

Ejemplo 14: Amplificación y Detección del virus del Ébola

Se realizaron experimentos de amplificación y detección en muestras de sangre completa humana que comprendían varios números de copias del pseudovirus del virus del Ébola Zaire (Zaire-EBOV). Se analizaron ocho muestras. Seis de las muestras incluían el pseudovirus en un número de copia particular (2500000, 250000, 25000, 2500, 250 y 25) y dos de las muestras (una con 20000 copias de un control positivo de pseudovirus, una que tenía agua solamente) sirvieron como muestras de control. Se analizaron muestras de sangre completa sin purificación de las muestras.

Cada muestra se combinó con los reactivos necesarios para la transcripción inversa y la amplificación de ácidos nucleicos (p. ej., transcriptasa inversa, ADN polimerasa, cebadores, dNTP, cofactores, tampón adecuado, etc.) y un agente indicador (p. ej., una sonda oligonucleotídica que comprende colorante FAM) en una mezcla de reacción de 30 µl. Un sumario de las diversas mezclas de reacción por número de muestra, incluido el número de copia del pseudovirus, se muestra en la Tabla 18. Para generar producto amplificado a partir del pseudovirus, cada mezcla de reacción se sometió a dos series de condiciones de desnaturalización y elongación. Las dos series fueron las siguientes: (i) en una primera serie, 15 ciclos de 1 segundo a 95 °C y 1 segundo a 45 °C, seguido de 1 min a 95 °C; y (ii) en una segunda serie, 35 ciclos de 5 segundos a 95 °C y 10 segundos a 55 °C. Durante la segunda serie, la señal del agente indicador se registró para generar curvas de amplificación y obtener valores de Ct. Las curvas de amplificación para los experimentos se representan gráficamente en la **Fig. 20**, cada uno etiquetado por el número de muestra correspondiente a los que se muestran en la Tabla 18. Los resultados representados en la **Fig. 20** muestran las unidades de fluorescencia relativa (UFR) registradas en función del número de ciclo. Los valores de Ct obtenidos de las curvas mostradas en la **Fig. 20** se resumen en la Tabla 19.

Como se muestra en la **Fig. 20**, El pseudovirus se detectó a través de productos amplificados para todas las muestras que incluían pseudovirus (muestras 1-6), incluida la muestra que incluía pseudovirus de control positivo (muestra 7). Por otra parte, el pseudovirus no se detectó en la muestra de control de agua solamente (muestra 8). Por consiguiente, los resultados mostrados en la **Fig. 20** indican que, en algunos casos, se puede obtener una sensibilidad de detección de 25 copias de virus/rxn utilizando múltiples series de condiciones de desnaturalización y elongación y sin purificación de las muestras.

Tabla 18: Mezclas de reacción experimentales del Ejemplo 14

Muestra	Pseudovirus (copias/rxn)
1	2500000
2	250000
3	25000
4	2500
5	250
6	25
7	20000 (pseudovirus de control positivo)
8	0 (agua solamente)

Tabla 19: Valores de Ct determinados a partir de experimentos en el Ejemplo 14

Muestra	Copias/rxn	Ct
1	2500000	10,44
2	250000	13,30
3	25000	16,14
4	2500	19,62
5	250	22,92
6	25	30,00
7	20000 (control positivo)	15,94
8	0 (agua solamente)	---

5

Ejemplo 15: Amplificación y Detección del virus del Ébola

Se realizaron experimentos de amplificación y detección en muestras de sangre completa humana que comprendían uno de los dos números de copia (250 copias/rxn o 25 copias/rxn) del pseudovirus del virus del Ébola Zaire (Zaire-EBOV). Cada muestra de sangre completa se analizó utilizando uno de los cuatro sistemas de reactivos, para un total de ocho muestras. Cada uno de los sistemas de reactivos (B-1, B-2, B-3 y B-4) incluyeron reactivos necesarios para la transcripción inversa y la amplificación de ácidos nucleicos (p. ej., transcriptasa inversa, ADN polimerasa, cebadores, dNTP, cofactores, tampón adecuado, etc.) y un agente indicador (p. ej., una sonda oligonucleotídica que comprende colorante FAM). Cada uno de los diferentes sistemas de reactivos contenía diferentes concentraciones de los diversos componentes en los sistemas de reactivos. Cada muestra de sangre completa se combinó con su sistema de reactivos apropiado en una mezcla de reacción de 30 µl. Un sumario de las diversas mezclas de reacción por número de muestra, incluido el número de copias del pseudovirus y el sistema de reactivos, se muestra a continuación en la Tabla 20. Para generar producto amplificado a partir del pseudovirus, cada mezcla de reacción se sometió a dos series de condiciones de desnaturalización y elongación. Las dos series fueron las siguientes: (i) en una primera serie, 15 ciclos de 1 segundo a 95 °C y 1 segundo a 45 °C, seguido de 1 min a 95 °C; y (ii) en una segunda serie, 40 ciclos de 5 segundos a 95 °C y 10 segundos a 55 °C. Durante la segunda serie, la señal del agente indicador se registró para generar curvas de amplificación y obtener valores de Ct. Las curvas de amplificación para los experimentos se representan gráficamente en la Fig. 21, cada uno etiquetado por el número de muestra correspondiente a los que se muestran en la Tabla 20. Los resultados representados en la Fig. 21 muestran las unidades de fluorescencia relativa (UFR) registradas en función del número de ciclo. Los valores de Ct obtenidos de las curvas mostradas en la Fig. 21 se resumen en la Tabla 21.

Como se muestra en la Fig. 21, se detectó pseudovirus a través de productos amplificados para todas las muestras, incluyendo muestras que tenían 25 copias/rxn. Por consiguiente, los resultados mostrados en la Fig. 21 indican que, en algunos casos, se puede obtener una sensibilidad de detección de 25 copias de virus/rxn utilizando múltiples series de condiciones de desnaturalización y elongación, con diferentes sistemas de reactivos y sin purificación de las muestras.

Tabla 20: Mezclas de reacción experimentales del Ejemplo 15

Muestra	Pseudovirus (copias/rxn)	Sistema de Reactivos
1	250	B-1
2	25	B-1
3	250	B-2
4	25	B-2
5	250	B-3
6	25	B-3
7	250	B-4
8	25	B-4

35

Tabla 21: Valores de Ct determinados a partir de experimentos en el Ejemplo 15

Muestra	Copias/rxn	Ct
1	250	20,38
2	25	24,82
3	250	20,62
4	25	24,05
5	250	20,26
6	25	25,09
7	250	19,86
8	25	24,00

Ejemplo 16: Detección de PCR en tiempo real para el virus del Ébola Zaire

5 Se usó un método de qPCR de una etapa de la presente divulgación para analizar muestras de suero sanguíneo de pacientes para el virus del Ébola Zaire. Las muestras no se purificaron. Las muestras incluyeron nueve muestras positivas para el virus del Ébola Zaire y siete muestras negativas para el virus del Ébola Zaire. Se usó un sistema de PCR en tiempo real de RocheLC96.

10 El programa empleado en este ejemplo para analizar las muestras se muestra en la Tabla 22.

Tabla 22: Programa de ciclado térmico

Etapa	Tem	Tiempo	N.º de Ciclo
1	42 °C	1min	1 ciclo
2	95 °C	5 segundos	10 ciclos
	45 °C	10 segundos	
3	95 °C	1min	1 ciclo
4	95 °C	5second	40cycles
	55 °C	10 segundos (Lectura)	

15 Los resultados del método qPCR de un paso se muestran en la Tabla 23. La prueba del método qPCR de un paso para el virus del Ébola Zaire mostró un 100% de consistencia en comparación con un reactivo y un método verificados.

Tabla 23: Resultados

N.º de muestra	Método QPCR de un paso de Coyote (Cq)	Reactivo y método verificado (Cq)	consistencia
1	N/D	N/D	Sí
2	2653	29,73	Sí
3	17,68	19,53	Sí
4	N/D	N/D	Sí
5	N/D	N/D	Sí
6	N/D	N/D	Sí
7	N/D	N/D	Sí
8	21,52	20,98	Sí
9	18,97	18,88	Sí
10	24,97	24,44	Sí
11	18,92	18,91	Sí
12	26,32	25,22	Sí
13	20,48	20,85	Sí
14	18,5	20,45	Sí
15	N/D	N/D	Sí

20 Ejemplo 17: Amplificación y Detección de Malaria

25 Se realizaron experimentos de amplificación y detección en una muestra de sangre completa humana que comprende una concentración desconocida de agentes patógenos de la Malaria. Se completaron dos conjuntos de experimentos. En el primer conjunto de experimentos, se completaron experimentos duplicados para una dilución 1:4 (en IX PBS) de la muestra de sangre completa humana; se completó un experimento para una muestra que comprende sangre completa y un plásmido correspondiente a los agentes patógenos de la Malaria; y se completó un experimento para un control de agua solamente. En el segundo conjunto de experimentos, se completaron experimentos para muestras que comprendían varias diluciones (1:4, 1:40, 1:400, 1:4000, 1:40000 y 1:400000) de la muestra de sangre completa humana en IX PBS junto con muestras control de sangre solamente y agua solamente. Se analizaron muestras de sangre completa sin purificación de las muestras.

30

Cada muestra se combinó con los reactivos necesarios para la amplificación de ácidos nucleicos (p. ej., ADN polimerasa, cebadores, dNTP, cofactores, tampón adecuado, etc.) y un agente indicador (p. ej., una sonda oligonucleotídica que comprende colorante FAM) en una mezcla de reacción de 30 µl. Un sumario de las mezclas de reacción por número de muestra, incluyendo dilución, para el primer conjunto de experimentos se muestra en la Tabla 24. Un sumario de las mezclas de reacción por número de muestra, incluyendo dilución, para el segundo conjunto de experimentos se muestra en la Tabla 25. Para generar un producto amplificado a partir de agentes patógenos de la Malaria, cada mezcla de reacción se sometió a dos series de condiciones de desnaturalización y elongación. Las dos series fueron las siguientes: (i) en una primera serie, 13 ciclos de 1 segundo a 95 °C y 1 segundo a 45 °C, seguido de 1 min a 95 °C; y (ii) en una segunda serie, 45 ciclos de 5 segundos a 95 °C y 10 segundos a 55 °C. Durante la segunda serie, la señal del agente indicador se registró para generar curvas de amplificación. Las curvas de amplificación para el primer conjunto de experimentos se representan gráficamente en la Fig. 22A y las curvas de amplificación para el segundo conjunto de experimentos se representan gráficamente en la Fig. 22B. Cada curva está etiquetada por su número de muestra correspondiente en las Tablas 24 y 25, respectivamente. Los resultados representados en la Fig. 22A y Fig. 22B muestra las unidades de fluorescencia relativa (UFR) registradas en función del número de ciclo.

Como se muestra en la Fig. 22A, Los agentes patógenos de la Malaria se detectaron mediante productos amplificados para las dos mezclas de reacción que comprendían una muestra de sangre completa (muestras 1 y 2) y para el control positivo que comprende un plásmido recombinante (muestra 3). Por otra parte, Los agentes patógenos de la Malaria no se detectaron en la muestra de control de agua sola (muestra 4). Por consiguiente, los resultados mostrados en la Fig. 22A indican que los agentes patógenos de la Malaria pueden, en algunos casos, detectarse usando múltiples series de condiciones de elongación y desnaturalización sin purificación de las muestras.

Tal como se muestra en la Fig. 22B, los agentes patógenos de la Malaria se detectaron a través de productos amplificados para todas las mezclas de reacción que contenían muestras de sangre completa (muestras 1-6). Por otra parte, los agentes patógenos de la Malaria no se detectaron en las muestras de control de agua solamente y de sangre solamente (muestras 7 y 8). Por consiguiente, los resultados mostrados en la Fig. 22B indican que un o unos patógenos, incluidos los agentes patógenos de la Malaria, pueden, en algunos casos, detectarse a diluciones de hasta 1:400000 utilizando múltiples series de condiciones de desnaturalización y elongación y sin purificación de las muestras.

Tabla 24: Mezclas de reacción experimentales para el primer conjunto de experimentos del Ejemplo 17

Muestra	Dilución
1	1:4
2	1:4
3	1:2 (plásmido en control de sangre total)
4	Ninguno (agua solamente)

Tabla 25: Mezclas de reacción experimentales para el segundo conjunto de experimentos en el Ejemplo 17

Muestra	Dilución
1	1:4
2	1:40
3	1:400
4	1:4000
5	1:40000
6	1:400000
7	0 (sangre solamente)
8	0 (agua solamente)

Ejemplo 18: Amplificación y Detección del Virus del Dengue

Se realizaron experimentos de amplificación y detección en muestras obtenidas de un cultivo que comprende una concentración desconocida de virus del Dengue. Se completaron tres conjuntos de experimentos. En el primer conjunto de experimentos, se completaron experimentos duplicados para cultivo sin diluir; se completó un experimento para la dilución 1:10 del cultivo; y se completó un experimento para un control de agua solamente. En el segundo conjunto de experimentos, los experimentos se completaron para varias diluciones (sin dilución, 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000 y 1:1000000) del cultivo junto con una muestra de control de agua solamente. En el tercer conjunto de experimentos, los experimentos se completaron para varias diluciones (sin dilución, 1:10, 1:100, 1:1000 y 1:10000) del cultivo junto con una muestra de control de agua solamente. Las muestras de cultivo se analizaron sin purificación de las muestras.

Se combinaron 2 µl de cada muestra con los reactivos necesarios para la transcripción inversa y la amplificación de ácidos nucleicos (p. ej., transcriptasa inversa, ADN polimerasa, cebadores, dNTP, cofactores, tampón adecuado, etc.) y un agente indicador (p. ej., una sonda oligonucleotídica que comprende colorante FAM) en una mezcla de reacción de 30 µl. Un sumario de las mezclas de reacción, incluyendo dilución, para el primer conjunto de experimentos se muestra en la Tabla 26, para el segundo conjunto de experimentos en la Tabla 27 y para el tercer conjunto de

experimentos en la Tabla 28. Para generar un producto amplificado a partir del virus, cada mezcla de reacción se sometió a dos series de condiciones de desnaturalización y elongación. Las dos series fueron las siguientes: (i) en una primera serie, 1 min a 42 °C, 10 ciclos de 5 segundos a 95 °C y 10 segundos a 45 °C, seguido de 1 min a 95 °C; y (ii) en una segunda serie, 45 ciclos de 5 segundos a 95 °C y 10 segundos a 55 °C. Durante la segunda serie, la señal del agente indicador se registró para generar curvas de amplificación. Las curvas de amplificación para el primer conjunto de experimentos se representan gráficamente en la **Fig. 23A**, las curvas de amplificación para el segundo conjunto de experimentos se representan gráficamente en la **Fig. 23B** y las curvas de amplificación para el tercer conjunto de experimentos se representan gráficamente en la **Fig. 23C**. Cada curva está etiquetada por su número de muestra correspondiente en las Tablas 26, 27 y 28, respectivamente. Los resultados representados en la **Fig. 23A**, **Fig. 23B** y **Fig. 23C** muestra las unidades de fluorescencia relativa (UFR) registradas en función del número de ciclo. Los valores de Ct obtenidos de las curvas mostradas en la **Fig. 23A**, **Fig. 23B** y **Fig. 23C** se muestran en las tablas 26, 27 y 28, respectivamente.

Como se muestra en la **Fig. 23A**, el virus se detectó mediante productos amplificados para las tres mezclas de reacción que comprendían virus (muestras 1-3). Por otra parte, el virus no se detectó en la muestra de control de agua solamente (muestra 4). Por consiguiente, los resultados mostrados en la **Fig. 23A** indican que el virus del Dengue puede detectarse, en algunos casos, utilizando múltiples series de condiciones de elongación y desnaturalización.

Tal como se muestra en la **Fig. 23B**, el virus se detectó a través de productos amplificados para mezclas de reacción que contienen virus del Dengue y no se diluyó (muestra 1) o se diluyó hasta 1:1000 (muestras 2, 3 y 4). Sin embargo, no se determinó un valor de Ct, para la mezcla de reacción 1:1000 (muestra 4). El virus no se detectó en diluciones más altas (muestras 5, 6 y 7) o en la muestra de control de agua solamente (muestra 8). Por consiguiente, los resultados mostrados en la **Fig. 23B** indican que el virus puede detectarse, en algunos casos, a diluciones de hasta 1:1000, donde los valores de Ct pueden generarse a diluciones de hasta 1:100 utilizando múltiples series de condiciones de desnaturalización y elongación y sin purificación de las muestras.

Como se muestra en la **Fig. 23C**, el virus se detectó a través de productos amplificados para mezclas de reacción que contienen virus del Dengue y no se diluyó (muestra 1) o se diluyó hasta 1:1000 (muestras 2, 3 y 4). Sin embargo, no se determinó un valor de Ct, para la mezcla de reacción 1:1000. El virus no se detectó en diluciones más altas (muestra 5) o en la muestra de control de agua solamente (muestra 6). Por consiguiente, los resultados mostrados en la **Fig. 23C** indican que el virus puede detectarse, en algunos casos, a diluciones de hasta 1:1000, donde los valores de Ct pueden generarse a diluciones de hasta 1:100 utilizando múltiples series de condiciones de desnaturalización y elongación y sin purificación de las muestras.

Tabla 26: Mezclas de reacción experimentales y valores de Ct determinados para el tercer conjunto de experimentos del Ejemplo 18

Muestra	Dilución	Valor de Ct
1	ninguna	19,32
2	ninguna	20,40
3	1:10	23,23
4	sin virus (agua solamente)	---

Tabla 27: Mezclas de reacción experimentales y valores de Ct determinados para el segundo conjunto de experimentos en el Ejemplo 18

Muestra	Dilución	Valor de Ct
1	ninguna	20,85
2	1:10	25,14
3	1:100	31,57
4	1:1000	---
5	1:10000	---
6	1:100000	---
7	1:1000000	---
8	sin virus (agua solamente)	---

Tabla 28: Mezclas de reacción experimentales y valores de Ct determinados para el tercer conjunto de experimentos en el Ejemplo 18

Muestra	Dilución	Valor de Ct
1	Ninguna	19,22
2	1:10	22,43
2	1:100	26,55
4	1:1000	---
5	1:10000	---
6	sin virus (agua solamente)	---

Ejemplo 19: Detección de Polimorfismos de un Solo Nucleótido (SNP)

Los experimentos de amplificación y detección se realizaron en muestras de hisopo orofaríngeo o muestras de sangre humanos que comprendían un genotipo particular de citocromo P450 2C19, CYP2C19*2 (que tiene un genotipo "GA") o CYP2C19*3 (que tiene un genotipo "GG"). Se realizaron dos conjuntos de experimentos: un conjunto para muestras obtenidas de hisopos orofaríngeos humanos y un conjunto para muestras obtenidas de sangre. En el primer conjunto de experimentos, se analizaron siete muestras diferentes obtenidas de hisopos orofaríngeos humanos sin purificación de las muestras. En el segundo conjunto de experimentos, se analizaron cinco muestras de sangre diferentes sin purificación de las muestras.

Cada muestra se combinó con los reactivos necesarios para la amplificación de ácidos nucleicos (p. ej., ADN polimerasa, cebadores, dNTP, cofactores, tampón adecuado, etc.) y dos agentes indicadores (p. ej., una sonda oligonucleotídica que comprende colorante FAM para detectar la amplificación de ácidos nucleicos, una sonda oligonucleotídica que comprende colorante Rojo Texas para detectar el genotipo "GA") en una mezcla de reacción. Para generar producto amplificado, cada mezcla de reacción se sometió a un protocolo de termociclado que incluyó 5 min a 95 °C seguido de 50 ciclos de 5 segundos a 95 °C y 10 segundos a 49 °C. Durante el termociclado, las señales de los agentes indicadores se registraron para generar las curvas de amplificación. Las curvas de amplificación para el primer conjunto de experimentos (hisopos orofaríngeos humanos) se representan gráficamente en la **Fig. 24A** (señal correspondiente a la sonda oligonucleotídica con FAM) y **Fig. 24B** (señal correspondiente a la sonda oligonucleotídica con Rojo Texas). Las curvas de amplificación para el segundo conjunto de experimentos (muestras de sangre) se representan gráficamente en la **Fig. 25A** (señal correspondiente a la sonda oligonucleotídica con FAM) y **Fig. 25B** (señal correspondiente a la sonda oligonucleotídica con Rojo Texas). Los resultados representados en la **Fig. 24A**, **Fig. 24B**, **Fig. 25A** y **Fig. 25B** muestran las unidades de fluorescencia relativa (UFR) registradas en función del número de ciclo. Cada curva está etiquetada por su número de mezcla de reacción correspondiente en la Tabla 29 (experimentos con hisopos orofaríngeos) o en la Tabla 30 (experimentos con sangre). Los valores de Ct determinados para las curvas de amplificación también se muestran en la Tabla 29 o en la Tabla 30 junto con el genotipo determinado. En las curvas de amplificación donde se observó señal de Rojo Texas en la **Fig. 24B** o **Fig. 25B**, se determinó que la mezcla de reacción correspondiente tenía el genotipo "GA". Por otra parte, en las curvas de amplificación donde no se observó señal de Rojo Texas en la **Fig. 24B** o **Fig. 25B**, se determinó que la mezcla de reacción correspondiente tenía el genotipo "GG".

Como se muestra en la **Fig. 24A**, se observó producto amplificado para cada una de las mezclas de reacción que tenían una muestra obtenida de hisopos orofaríngeos, lo que sugiere que se produce la amplificación de los ácidos nucleicos. Sin embargo, tal como se muestra en la **Fig. 24B**, se observó producto amplificado para solo algunas de las mezclas de reacción (mezclas de reacción 1, 4, 6 y 7) que tenían una muestra obtenida de hisopos orofaríngeos, correspondiendo estas mezclas de reacción al genotipo "GA". En las otras mezclas de reacción (mezclas de reacción 2, 3 y 5), no se observaron productos amplificados, correspondiendo estas mezclas de reacción al genotipo "GG". Los resultados mostrados en la **Fig. 24A** y **Fig. 24B** se validaron mediante experimentos de amplificación y detección utilizando ADN extraído de muestras de hisopos orales (datos no mostrados). Por lo tanto, los resultados mostrados en la **Fig. 24A** y **Fig. 24B** sugieren que, en algunos casos, los SNP se pueden detectar mediante amplificación en tiempo real en muestras obtenidas de hisopos orofaríngeos sin purificación de las muestras.

Como se muestra en la **Fig. 25A**, se observó producto amplificado para cada una de las mezclas de reacción que tenían una muestra obtenida de sangre, lo que sugiere que se produce la amplificación de los ácidos nucleicos. Sin embargo, tal como se muestra en la **Fig. 25B**, se observó producto amplificado para solo algunas de las mezclas de reacción (mezclas de reacción 1, 2 y 5) que tenían una muestra obtenida de sangre, correspondiendo estas mezclas de reacción al genotipo "GA". En las otras mezclas de reacción (mezclas de reacción 3 y 4), no se observaron productos amplificados, correspondiendo estas mezclas de reacción al genotipo "GG". Los resultados mostrados en la **Fig. 25A** y **Fig. 25B** se validaron mediante secuenciación de ácidos nucleicos. Por lo tanto, los resultados mostrados en la **Fig. 25A** y **Fig. 25B** sugieren que, en algunos casos, los SNP se pueden detectar mediante amplificación en tiempo real en muestras obtenidas de sangre sin purificación de las muestras.

Tabla 29: Valores de Ct y genotipos determinados para los experimentos con hisopos orofaríngeos del Ejemplo 19

Mezcla de Reacción	Ct-Indicador FAM	Ct-Indicador Rojo Texas	Genotipo
1	38,70	40,25	GA
2	38,28	---	GG
3	34,16	---	GG
4	33,18	33,75	GA
5	35,20	---	GG
6	33,08	33,59	GA
7	36,45	37,01	GA

Tabla 30: Valores de Ct y genotipos determinados para experimentos con sangre del Ejemplo 19

Mezcla de Reacción	Ct-Indicador FAM	Ct-Indicador Rojo Texas	Genotipo
1	38,36	36,24	GA

(continuación)

Mezcla de Reacción	Ct-Indicador FAM	Ct-Indicador Rojo Texas	Genotipo
2	39,97	39,67	GA
3	41,25	---	GG
4	33,96	---	GG
5	35,68	34,12	GA

Ejemplo 20: Amplificación y Detección de Adenovirus de Tipo 55 (ADV55) y Adenovirus de Tipo 7 (ADV7)

Los experimentos de amplificación y detección se realizaron en muestras obtenidas de hisopos orofaríngeos que comprendían varios números de copias de adenovirus de tipo 55 (ADV55) o concentraciones desconocidas de adenovirus de tipo 7 (ADV7). Se completaron dos conjuntos de experimentos: un conjunto para muestras con ADV55 y un conjunto para experimentos con ADV7. En el primer conjunto de experimentos, se completaron seis experimentos diferentes que tenían muestras que comprendían números de copias diferentes (1, 10, 100, 1000, 10000 y 100000 copias) de ADV55 sin purificación de las muestras junto con experimentos para un control negativo. En el segundo conjunto de experimentos, se completaron ocho experimentos diferentes que tenían muestras que comprendían un número de copias desconocido de ADV7 sin purificación de las muestras.

Cada muestra se combinó con los reactivos necesarios para la amplificación de ácidos nucleicos (p. ej., ADN polimerasa, cebadores, dNTP, cofactores, tampón adecuado, etc.) y un agente indicador (p. ej., una sonda oligonucleotídica que comprende colorante FAM) en una mezcla de reacción. Un resumen de las mezclas de reacción, incluido el número de copias de ADV55, para el primer conjunto de experimentos se muestra en la Tabla 31. Para generar productos amplificados a partir de virus, cada mezcla de reacción se sometió a dos series de condiciones de desnaturalización y elongación. Las dos series fueron las siguientes: (i) en una primera serie, 20 ciclos de 1 segundo a 95 °C y 1 segundo a 45 °C, seguido de 1 min a 95 °C; y (ii) en una segunda serie, 35 ciclos de 5 segundos a 95 °C y 34 segundos a 60 °C. Durante la segunda serie, se registró la señal del agente indicador para generar curvas de amplificación y obtener valores de Ct. Las curvas de amplificación para el primer conjunto de experimentos se representan gráficamente en la **Fig. 26A**, cada uno etiquetado por el número de mezcla de reacción correspondiente a los mostrados en la Tabla 31. Las curvas de amplificación para el segundo conjunto de experimentos se representan gráficamente en la **Fig. 26B** y los valores de Ct correspondientes se muestran en la Tabla 32. Las curvas de amplificación en la **Fig. 26B** están etiquetados como corresponden al número de la mezcla de reacción mostrado en la Tabla 32. Los resultados representados en la **Fig. 26A** y **Fig. 26B** muestran las unidades de fluorescencia relativa (UFR) registradas en función del número de ciclo.

Como se muestra en la **Fig. 26A**, se detectó ADV55 a través de productos amplificados para todas las mezclas de reacción que comprendían muestras que contienen virus (mezclas de reacción 1-6). Por otra parte, no se detectó virus en la mezcla de reacción de control negativo (mezcla de reacción 7). Por consiguiente, los resultados mostrados en la **Fig. 26A** indican que el virus ADV55 puede detectarse, en algunos casos, usando múltiples series de condiciones de elongación y desnaturalización sin purificación de las muestras y a varios niveles de dilución.

Tal como se muestra en la **Fig. 26B**, se detectó ADV7 a través de productos amplificados para todas las mezclas de reacción. Por consiguiente, los resultados mostrados en la **Fig. 26B** indican que el virus ADV7 puede detectarse, en algunos casos, utilizando múltiples series de condiciones de elongación y desnaturalización y sin purificación de las muestras.

Tabla 31: Mezclas de reacción experimentales para experimentos con ADV55 del Ejemplo 20

Mezcla de Reacción	Número de copias de ADV55 /Rxn
1	1
2	10
3	100
4	1000
5	10000
6	100000
7	0 (control negativo)

Tabla 32: Valores de Ct determinados para experimentos de ADV7 en el Ejemplo 20

Mezcla de Reacción	Valor de Ct
1	5,12
2	7,16
3	10,97
4	14,15
5	17,58
6	20,29
7	22,13
8	17,66

Ejemplo 21: Amplificación y Detección del Virus de la Hepatitis C de ARN blindado (ARN-VHC)

5 Se realizaron experimentos de amplificación y detección en muestras de plasma sanguíneo que comprendían varios números de copias Virus de hepatitis C de ARN blindado (ARN-VHC). Se completaron tres experimentos diferentes que tenían muestras que comprendían diferentes números de copias (10, 100 y 500 copias) de ARN-VHC sin purificación de las muestras junto con un experimento completado para un control negativo.

10 Cada muestra se combinó con los reactivos necesarios para la transcripción inversa y la amplificación de ácidos nucleicos (p. ej., transcriptasa inversa, ADN polimerasa, cebadores, dNTP, cofactores, tampón adecuado, etc.) y un agente indicador (p. ej., una sonda oligonucleotídica que comprende colorante FAM) en una mezcla de reacción. Un sumario de las mezclas de reacción, incluido el número de copias de ARN-VHC se muestra en la Tabla 33. Para generar un producto de ADN amplificado a partir de virus, cada mezcla de reacción se sometió a dos series de condiciones de desnaturalización y elongación. Las dos series fueron las siguientes: (i) en una primera serie, 20 ciclos de 1 segundo a 95 °C y 1 segundo a 45 °C, seguido de 1 min a 95 °C; y (ii) en una segunda serie, 55 ciclos de 5 segundos a 95 °C y 34 segundos a 60 °C. Durante la segunda serie, la señal del agente indicador se registró para generar curvas de amplificación. Las curvas de amplificación para el primer conjunto de experimentos se representan gráficamente en la **Fig. 27**, cada uno etiquetado por el número correspondiente a los números de la mezcla de reacción mostrados en la Tabla 33. Los resultados representados en la **Fig. 27** muestran las unidades de fluorescencia relativa (UFR) registradas en función del número de ciclo.

20 Como se muestra en la **Fig. 27**, se detectó ARN-VHC a través de productos amplificados para todas las mezclas de reacción que comprendían muestras que contienen virus (mezcla de reacción 1-3). Por otra parte, no se detectó ARN-VHC en la mezcla de reacción de control negativo (mezcla de reacción 4). Por consiguiente, los resultados mostrados en la **Fig. 27** indican que RNA-HCV puede detectarse, en algunos casos, utilizando múltiples series de condiciones de elongación y desnaturalización y sin purificación de las muestras. También se puede lograr una sensibilidad de detección de 10 copias/rxn.

Tabla 33: Mezclas de reacción experimentales para experimentos de ARN-VHC del Ejemplo 21

Mezcla de Reacción	Número de copias de ARN-VHC/Rxn
1	10
2	100
3	500
4	0 (control negativo)

30

REIVINDICACIONES

1. Un método para amplificar una secuencia de un ácido nucleico diana presente en una muestra biológica obtenida de un sujeto, que comprende:
- 5 (a) proporcionar un recipiente de reacción que comprende dicha muestra biológica y los reactivos necesarios para llevar a cabo la amplificación del ácido nucleico, cuya muestra biológica se obtiene directamente de dicho sujeto y se proporciona en dicho recipiente de reacción sin procesamiento adicional, en donde dichos reactivos comprenden (i) una polimerasa de ácido desoxirribonucleico (ADN) y opcionalmente una transcriptasa inversa y (ii) un conjunto de cebadores que comprende dos cebadores que tienen especificidad para dicha secuencia del ácido nucleico diana, para obtener una mezcla de reacción; y
- 10 (b) someter dicha mezcla de reacción que comprende dicha (i) ADN polimerasa y opcionalmente dicha transcriptasa inversa y (ii) dicho conjunto de cebadores en dicho recipiente de reacción a una pluralidad de series de reacciones de extensión con cebadores para amplificar dicha secuencia del ácido nucleico diana para generar producto amplificado que es indicativo de la presencia de dicha secuencia del ácido nucleico diana en dicha muestra biológica, comprendiendo cada serie dos o más ciclos de (i) incubar dicha mezcla de reacción en una condición de desnaturalización **caracterizada por** una temperatura de desnaturalización y una duración de la desnaturalización, seguido de (ii) incubar dicha mezcla de reacción en una condición de elongación **caracterizada por** una temperatura de elongación y una duración de elongación, en donde una serie individual difiere de al menos otra serie individual de dicha pluralidad con respecto a dicha condición de desnaturalización y/o dicha condición de elongación.
2. El método de la Reivindicación 1, en donde dicha pluralidad de series de reacciones de extensión con cebadores comprende una primera serie y una segunda serie, comprendiendo dicha primera serie más de diez ciclos.
- 25 3. El método de la Reivindicación 1, en donde dichos reactivos son necesarios para llevar a cabo la amplificación con transcripción inversa en paralelo con la amplificación del ácido desoxirribonucleico, en donde opcionalmente, dicha transcriptasa inversa está separada de dicha ADN polimerasa.
- 30 4. El método de la Reivindicación 2, en donde dicha segunda serie comprende más de diez ciclos.
5. El método de la Reivindicación 1, en donde, en (a), no se ha sometido dicha muestra biológica a extracción del ácido nucleico y/o no está purificada.
- 35 6. El método de la Reivindicación 1, en donde dicha secuencia del ácido nucleico diana es una secuencia de un ácido nucleico derivado de un patógeno.
7. El método de la Reivindicación 6, en donde, dicho patógeno es un virus.
- 40 8. El método de la Reivindicación 1, que comprende además someter dicha secuencia del ácido nucleico diana a una o más condiciones de desnaturalización antes de (b), en donde dichas una o más condiciones de desnaturalización se seleccionan de un perfil de temperatura de desnaturalización y un agente de desnaturalización.
- 45 9. El método de la Reivindicación 1, que comprende además someter dicha secuencia del ácido nucleico diana a una o más condiciones de desnaturalización entre una primera serie y una segunda serie de dicha pluralidad de series de reacciones de extensión con cebadores.
10. El método de la Reivindicación 1, en donde dicha serie individual difiere de al menos otra serie individual de dicha pluralidad con respecto a al menos una cualquiera de la tasa de aumento entre la temperatura de desnaturalización y la temperatura de elongación, temperatura de desnaturalización, duración de la desnaturalización, temperatura de elongación y duración de elongación.
- 50 11. El método de la Reivindicación 10, en donde dicha serie individual difiere de al menos otra serie individual de dicha pluralidad con respecto a al menos dos cualquiera de la tasa de aumento entre la temperatura de desnaturalización y la temperatura de elongación, temperatura de desnaturalización, duración de la desnaturalización, temperatura de elongación y duración de elongación.
- 55 12. El método de la Reivindicación 2, en donde cada ciclo de dicha primera serie comprende (i) incubar dicha mezcla de reacción a aproximadamente 92 °C-95 °C durante no más de 30 segundos, seguido de (ii) incubar dicha mezcla de reacción a aproximadamente 35 °C-65 °C durante no más de 1 minuto y en donde cada ciclo de dicha segunda serie comprende (i) incubar dicha mezcla de reacción a aproximadamente 92 °C-95 °C durante no más de 30 segundos, seguido de (ii) incubar dicha mezcla de reacción a aproximadamente 40 °C-60 °C durante no más de 1 minuto.
- 60 13. El método de la Reivindicación 1, en donde dicha pluralidad de series de las reacciones de extensión con cebadores produce una cantidad detectable de producto amplificado que es indicativa de la presencia de dicha secuencia del ácido nucleico diana en dicha muestra biológica con un valor de umbral de ciclo más bajo en
- 65

comparación con una serie única de reacciones de extensión con cebadores en condiciones de desnaturalización y de elongación comparables.

5 14. El método de la Reivindicación 1, que adicionalmente comprende, antes de (b), precalentar dicha muestra biológica a una temperatura de precalentamiento de 90 °C a 100 °C durante una duración de precalentamiento de no más de 10 minutos.

10 15. El método de la Reivindicación 14, en donde dicha pluralidad de reacciones de extensión con cebadores produce dicha cantidad detectable de producto amplificado que es indicativa de dicha presencia de dicha secuencia del ácido nucleico diana en dicha muestra biológica con al menos una reducción del 20 % en el valor de umbral de ciclo en comparación con dicha serie única de reacciones de extensión con cebadores en condiciones de desnaturalización y elongación comparables.

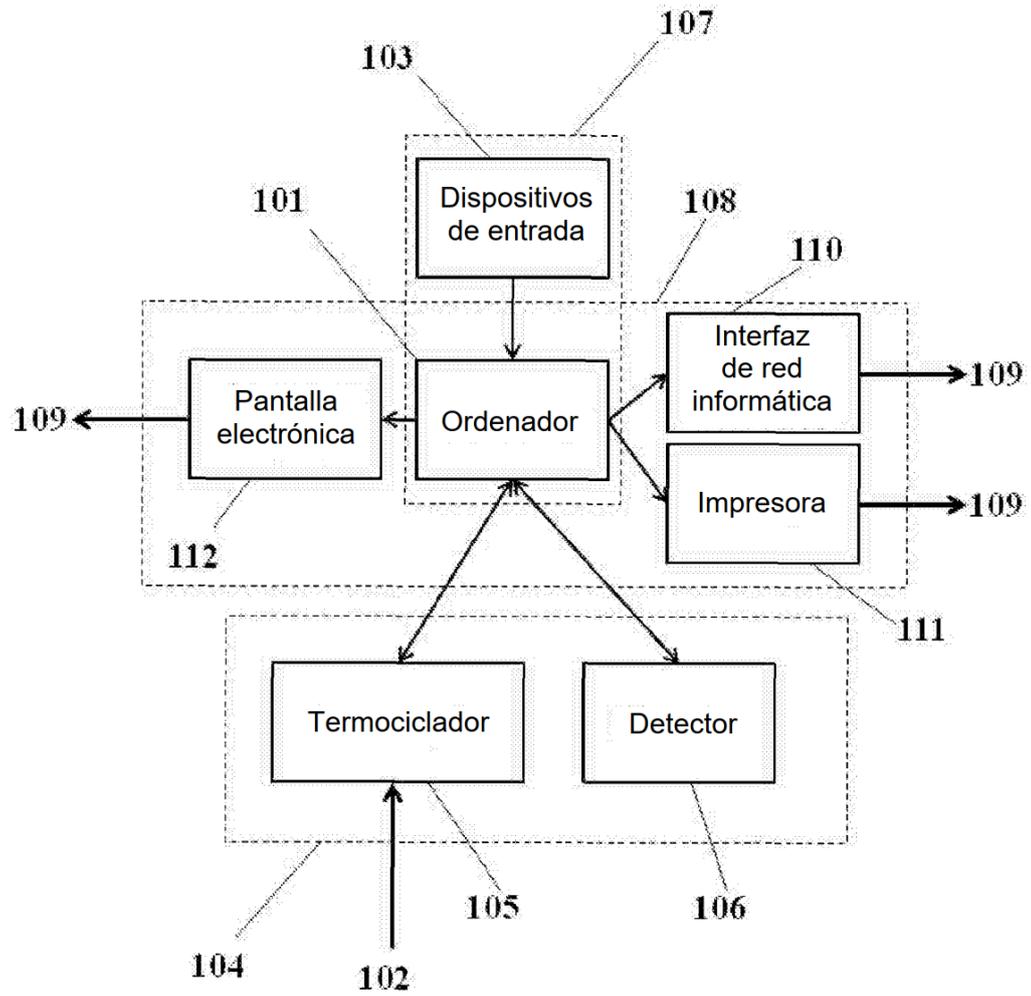


Fig. 1

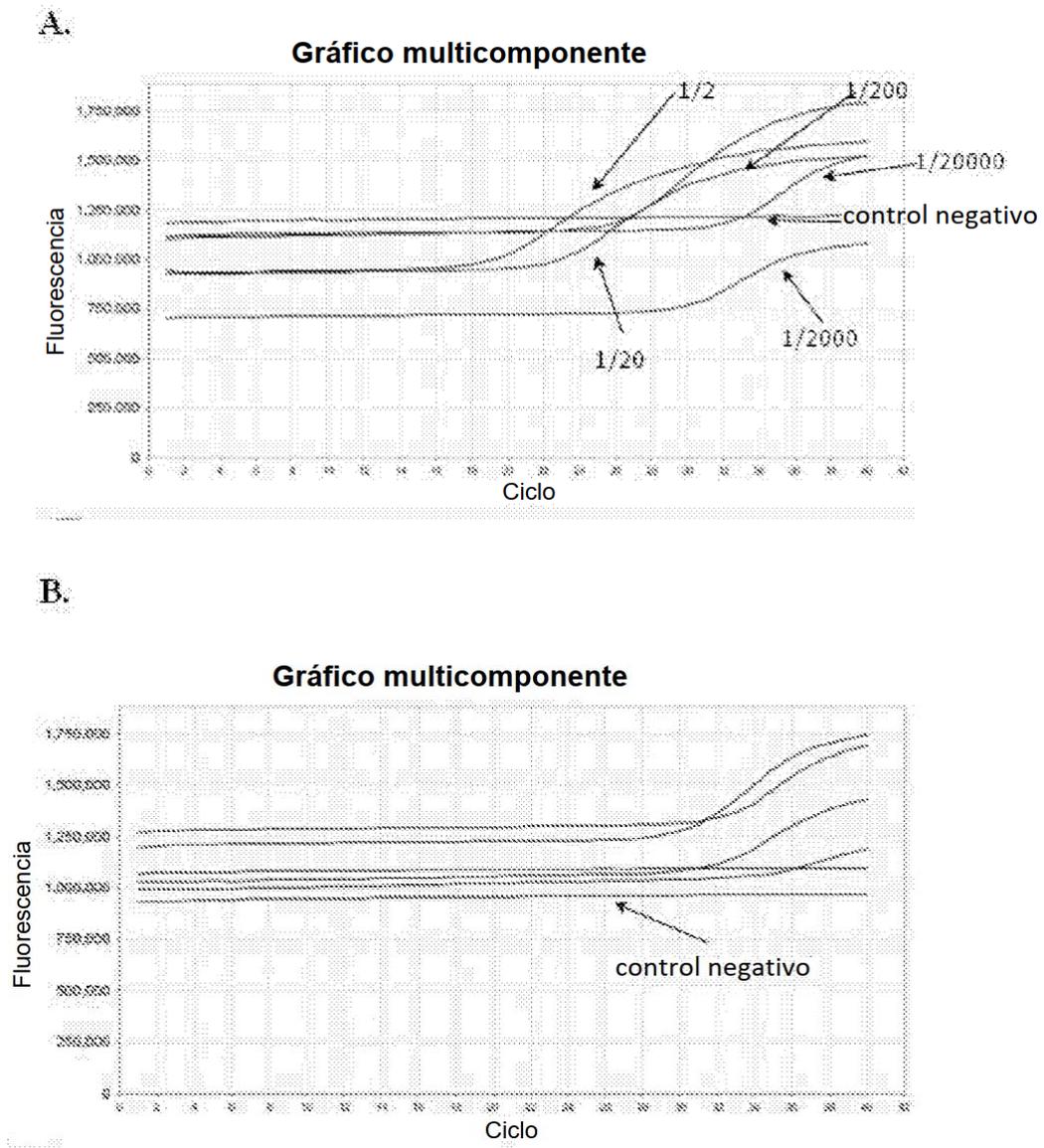


Fig. 2

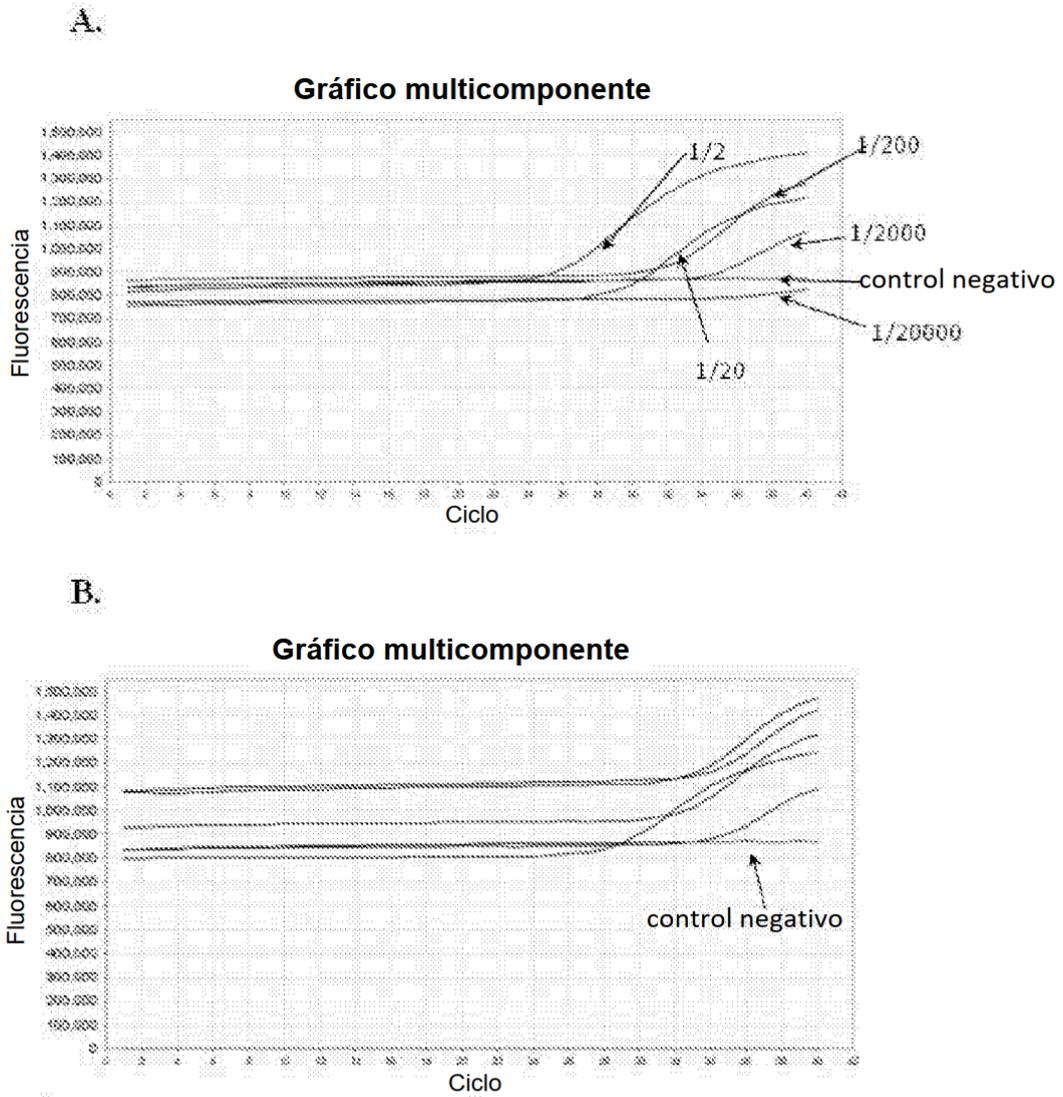


Fig. 3

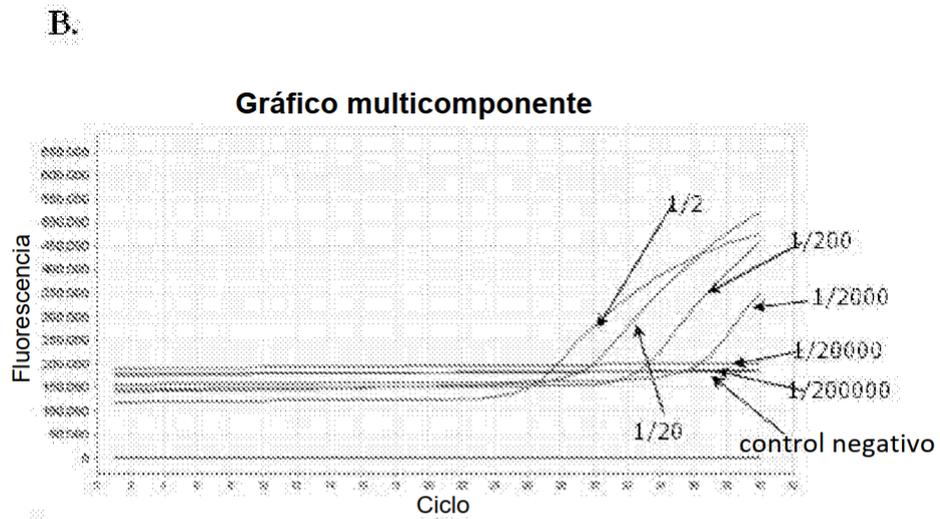
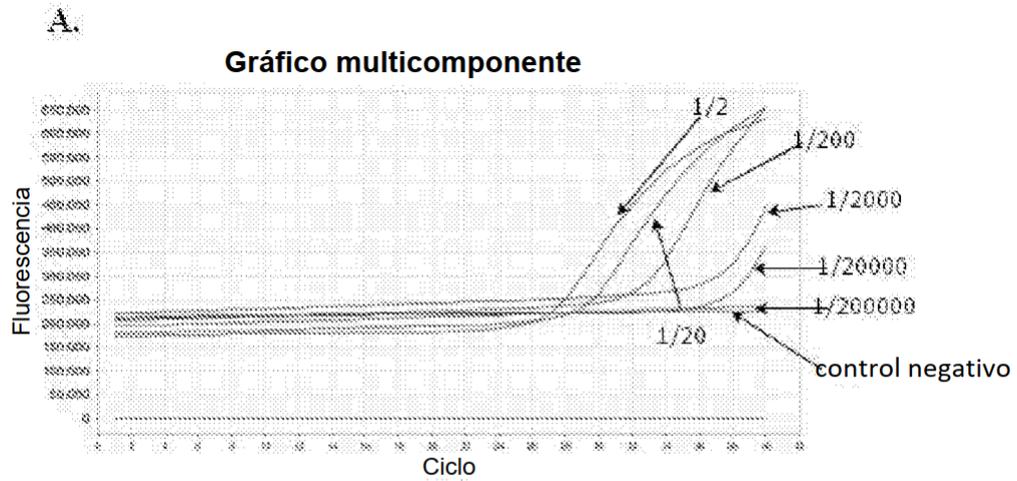


Fig. 4

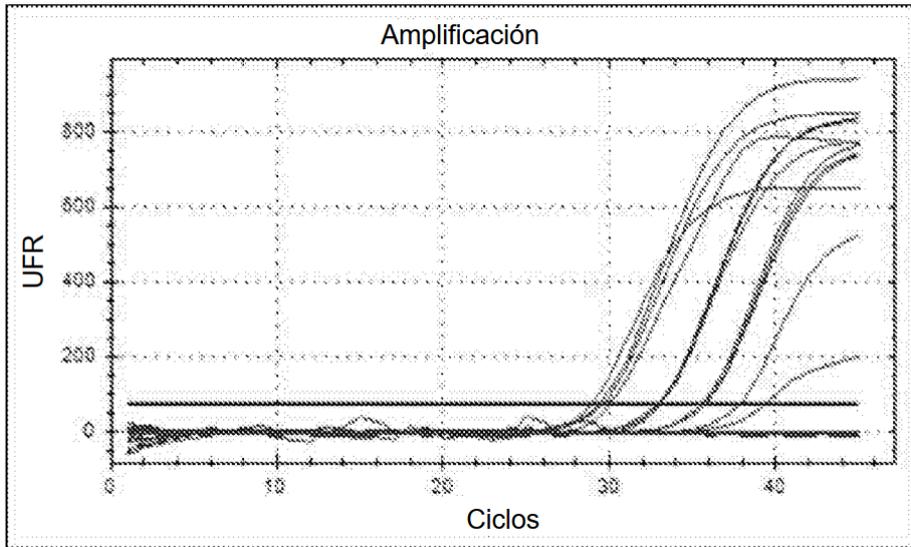


Fig. 5

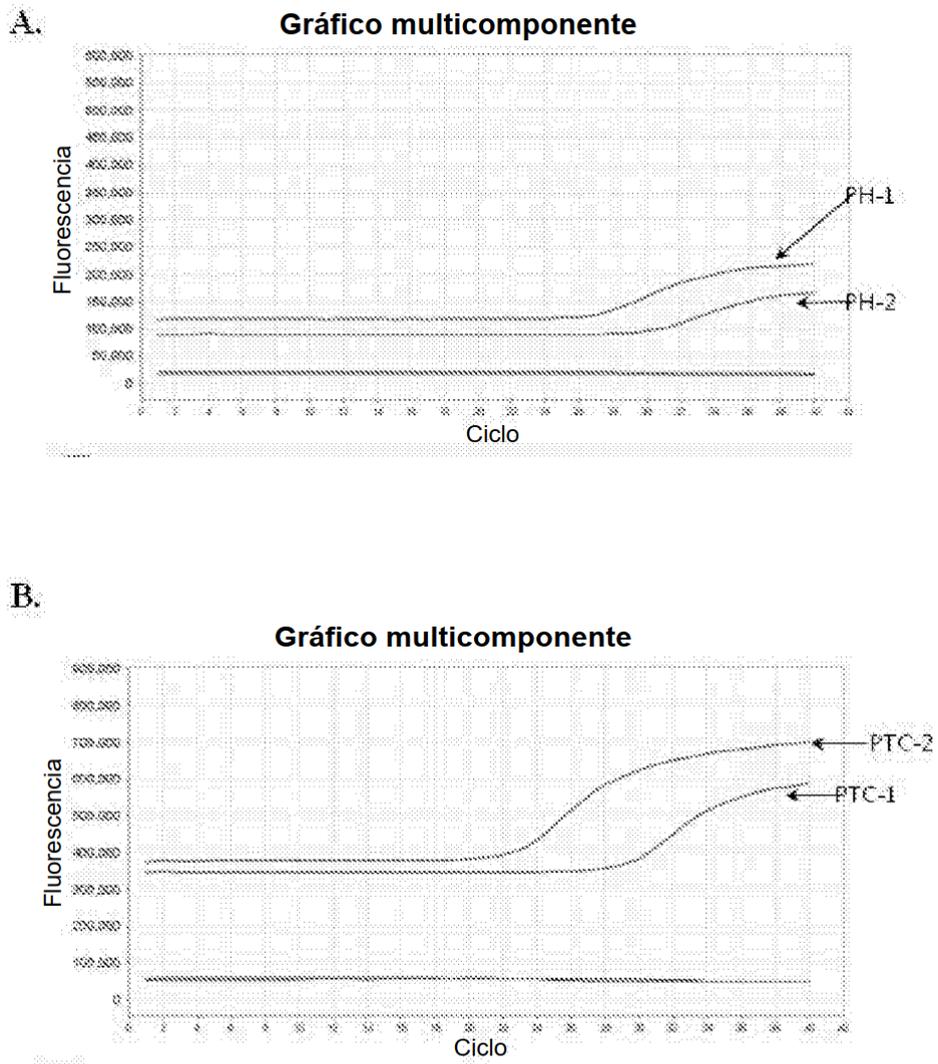
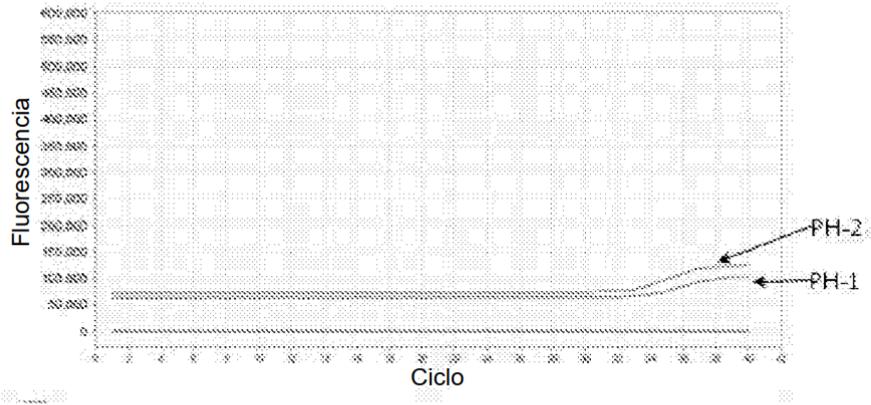


Fig. 6

A.

Gráfico multicomponente



B.

Gráfico multicomponente

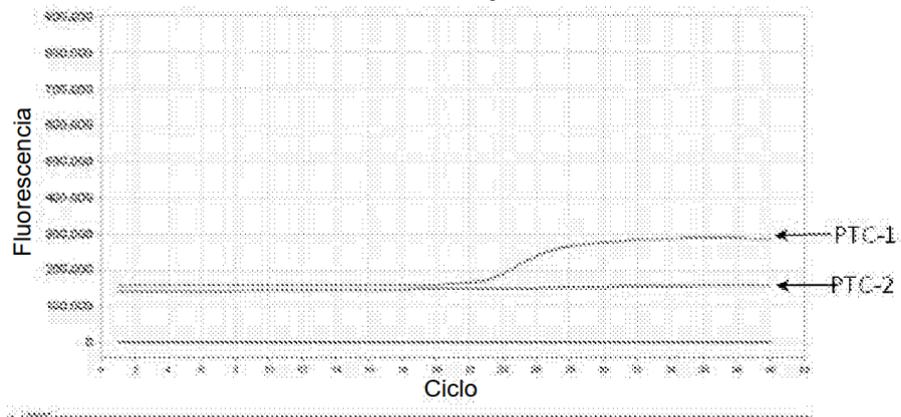
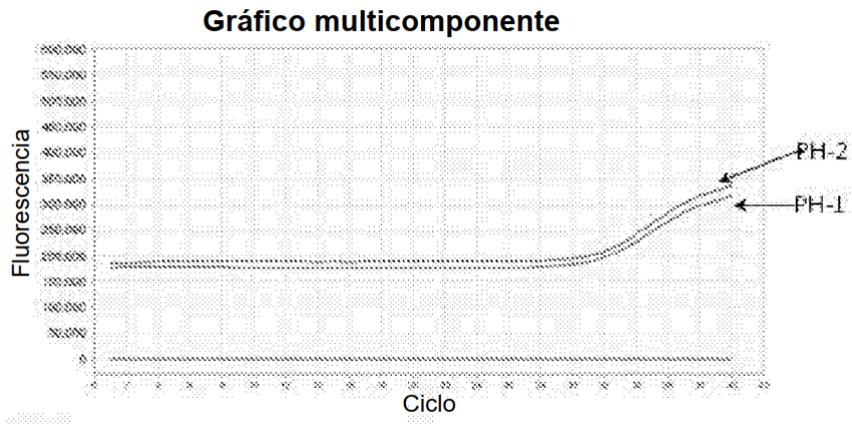


Fig. 7

A.



B.

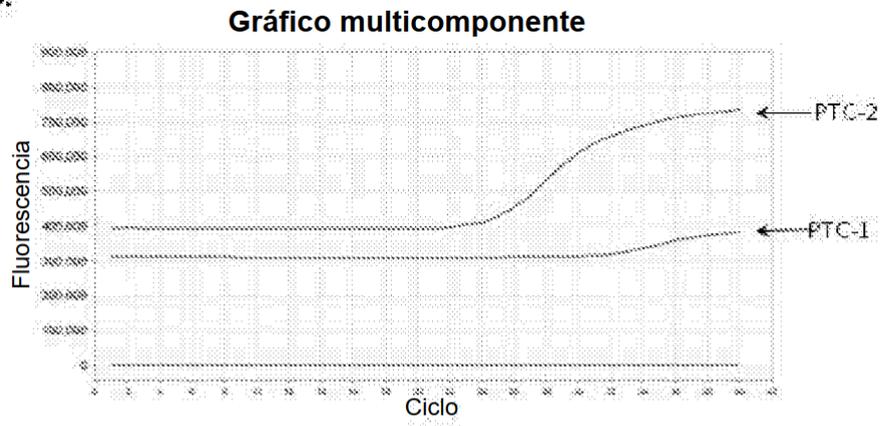
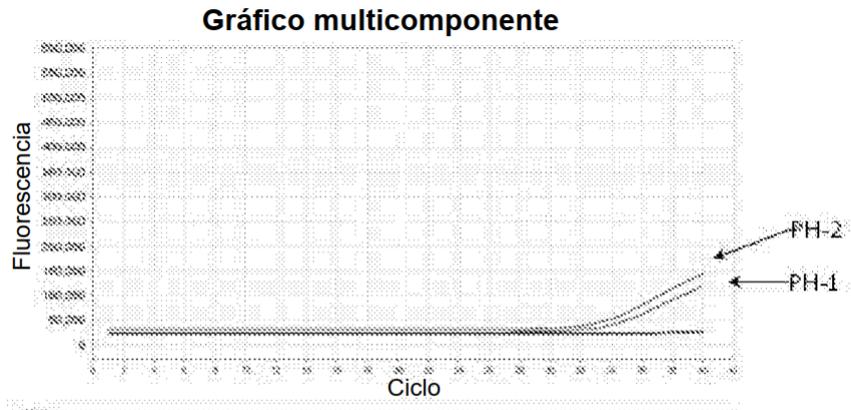


Fig. 8

A.



B.

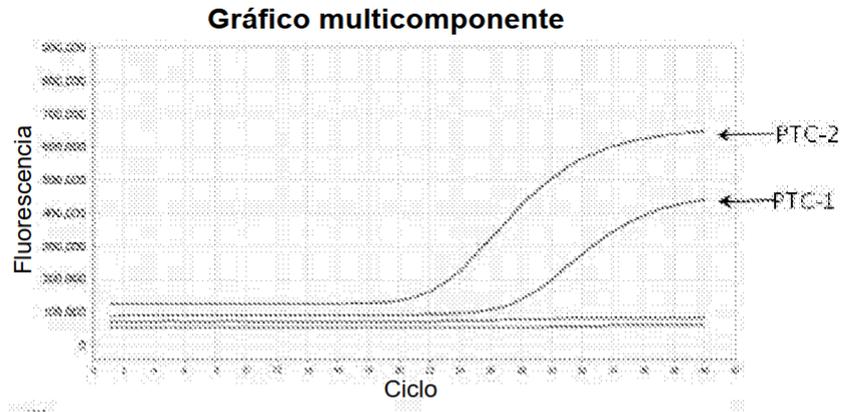
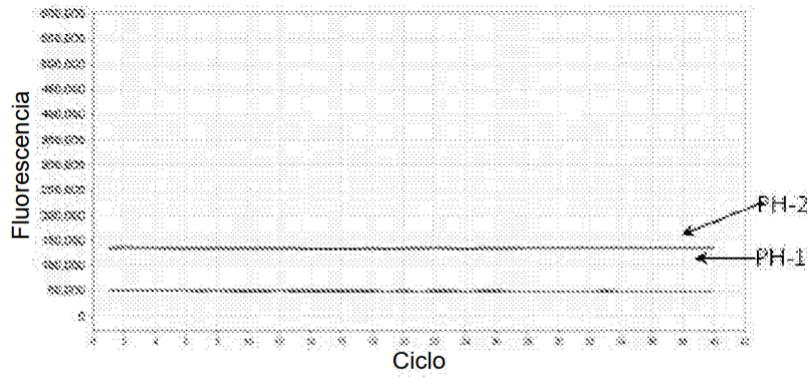


Fig. 9

A.

Gráfico multicomponente



B.

Gráfico multicomponente

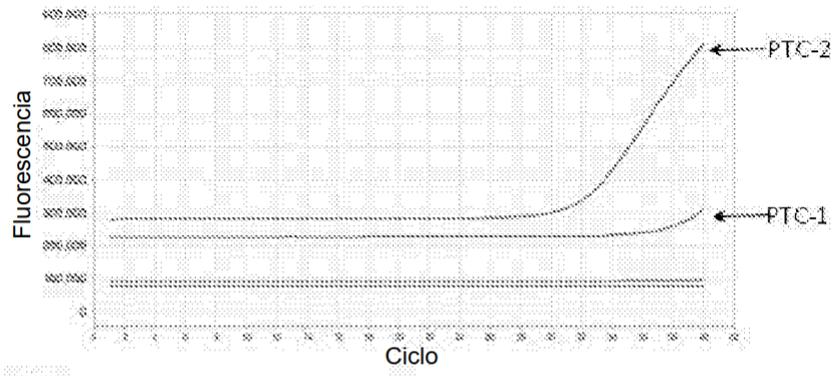


Fig. 10

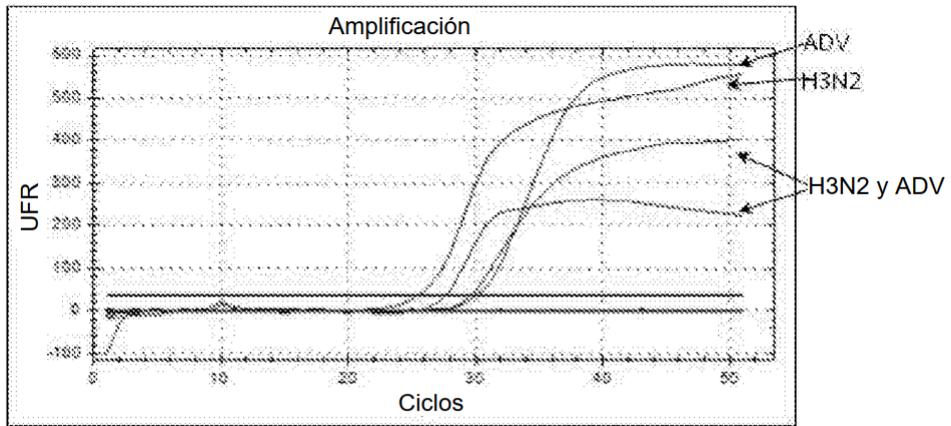


Fig. 11

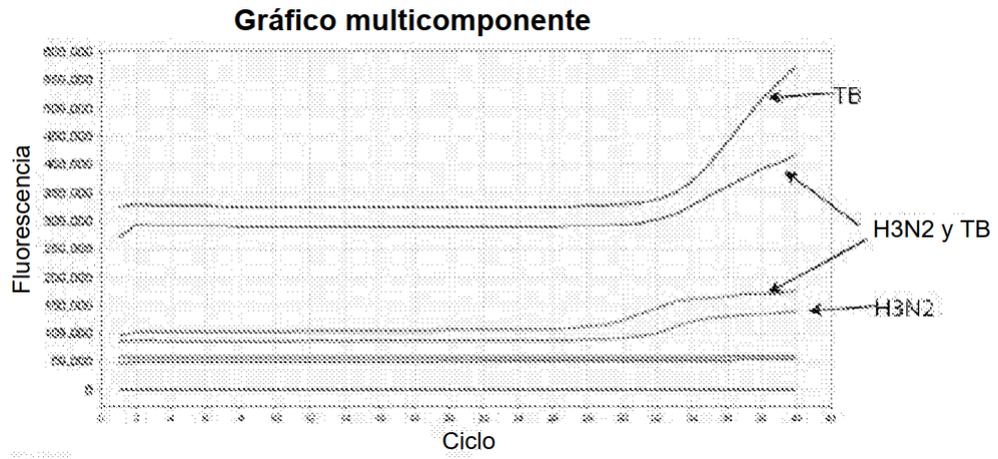


Fig. 12

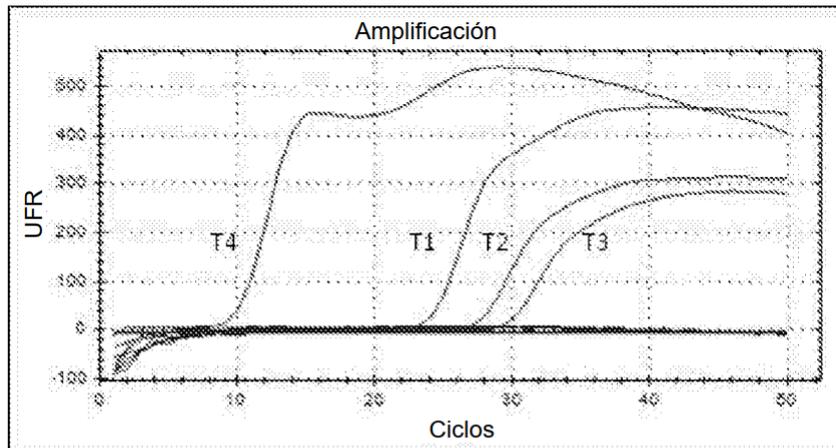


Fig. 13

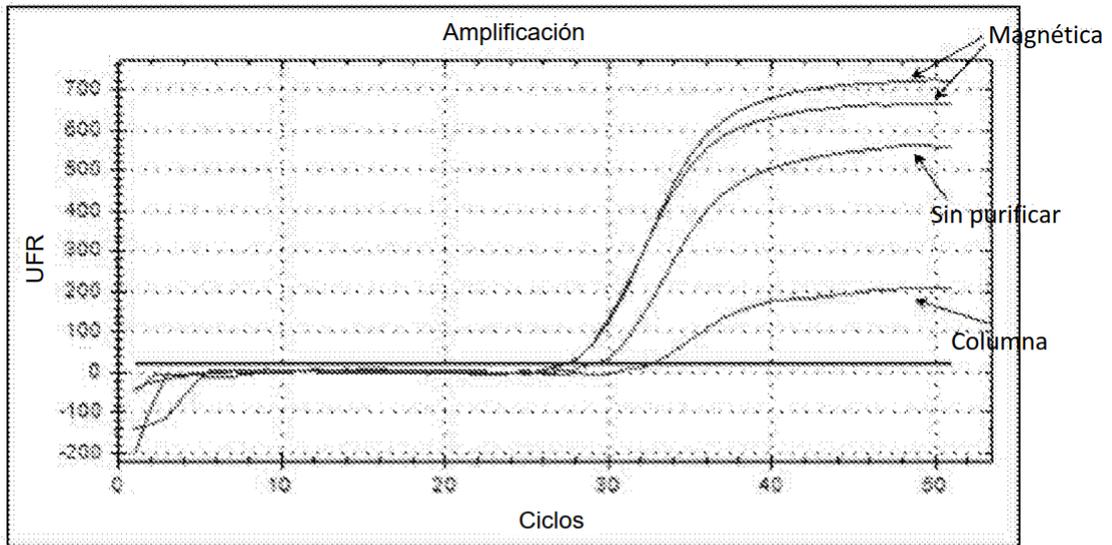
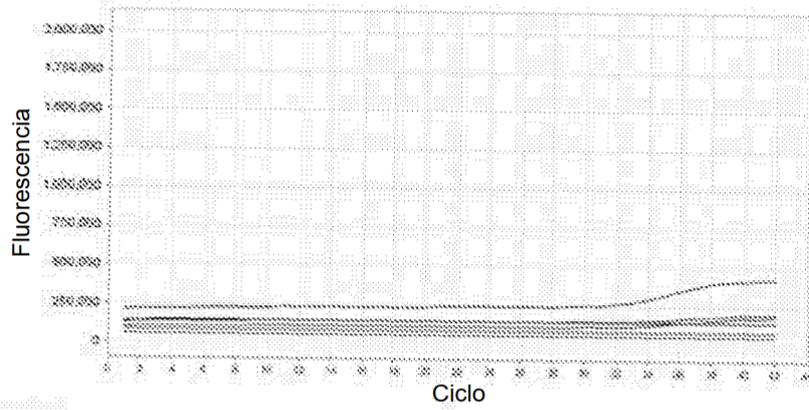


Fig. 14

A.

Gráfico multicomponente



B.

Gráfico multicomponente

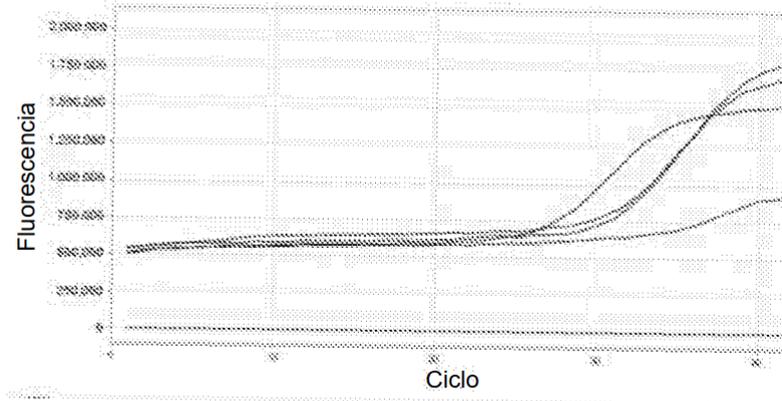
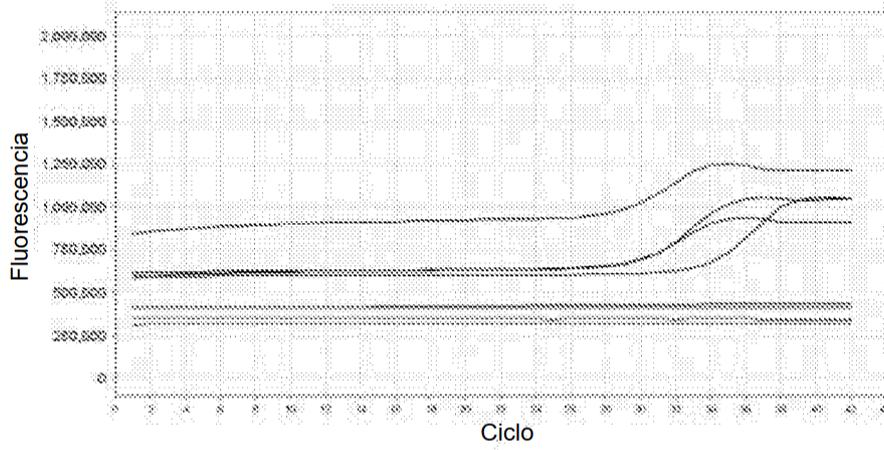


Fig. 15

A.

Gráfico multicomponente



B.

Gráfico multicomponente

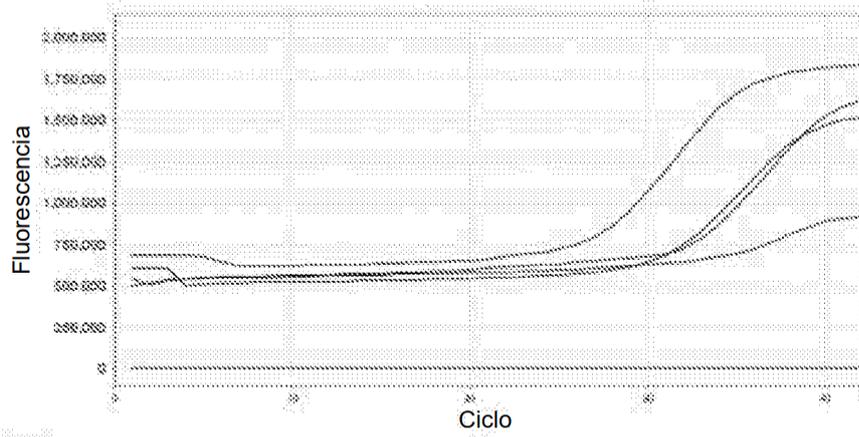


Fig. 16

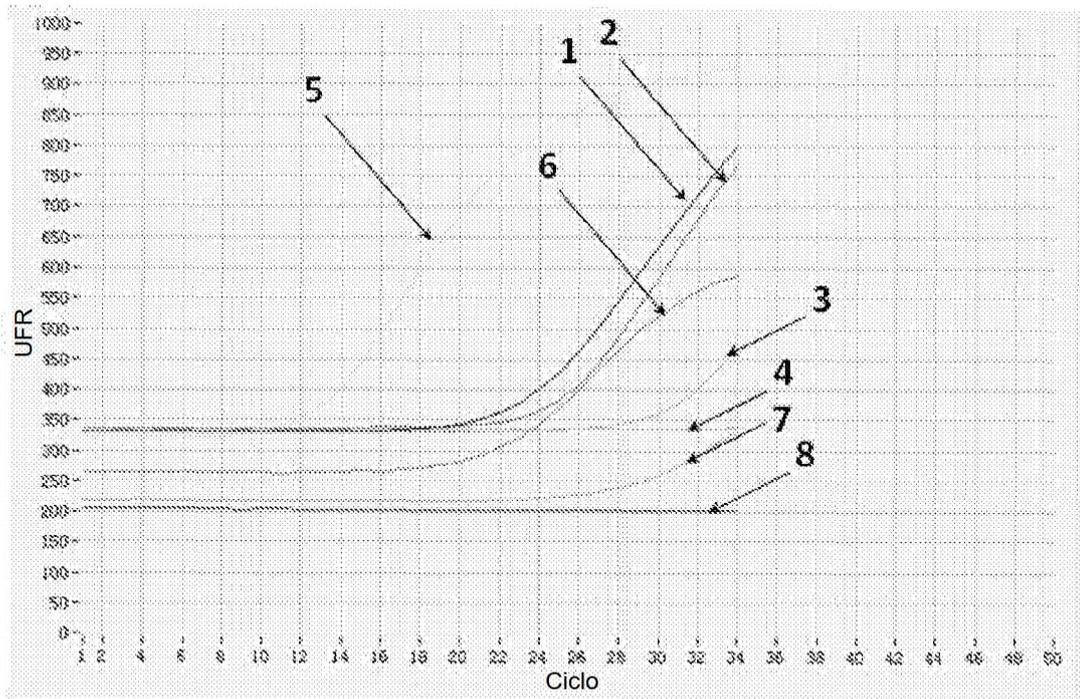


Fig. 17

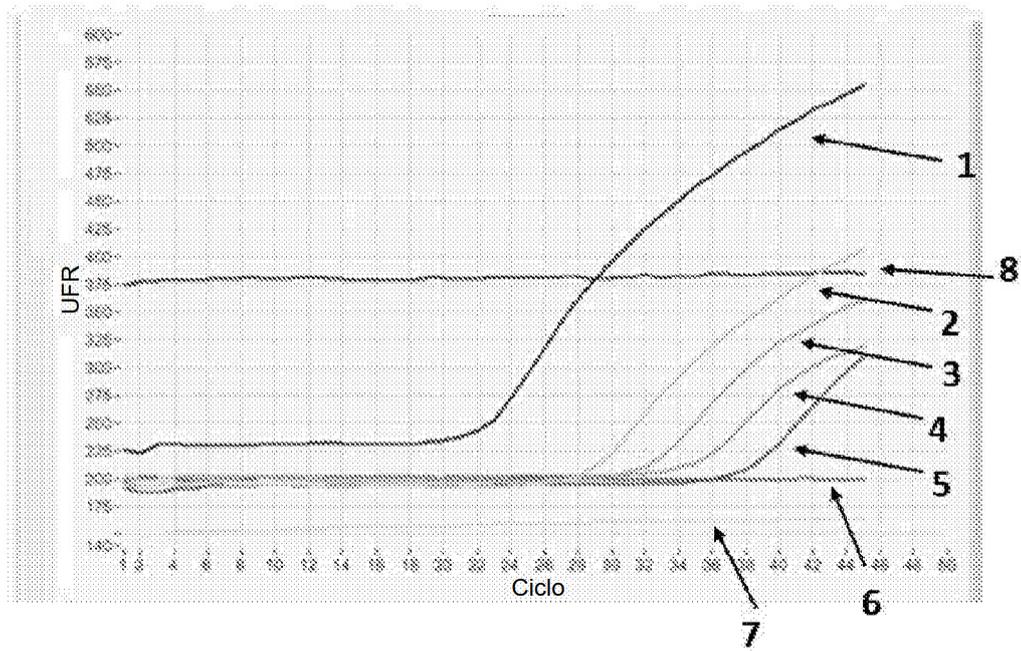


Fig. 18

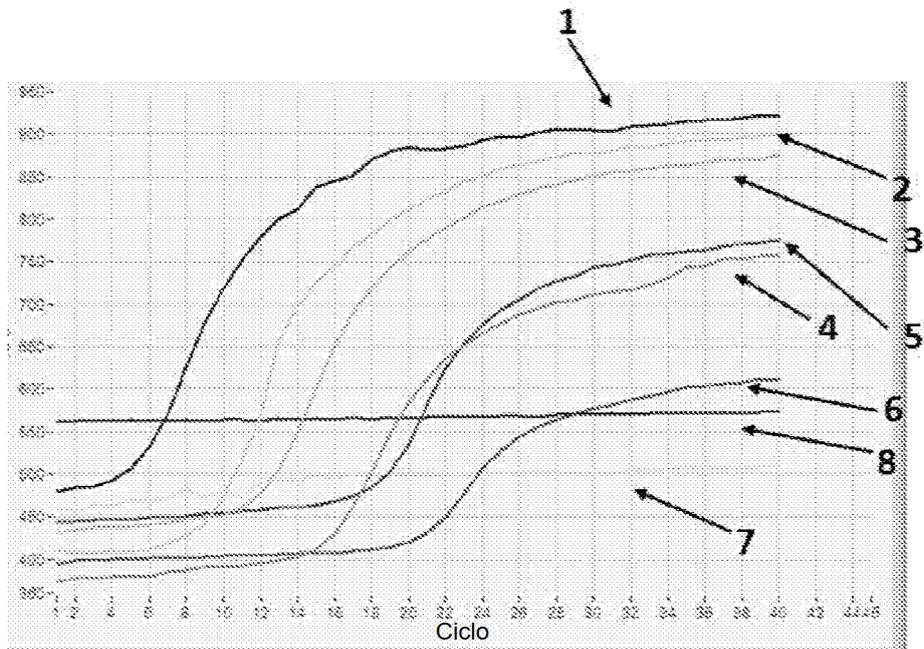


Fig. 19A

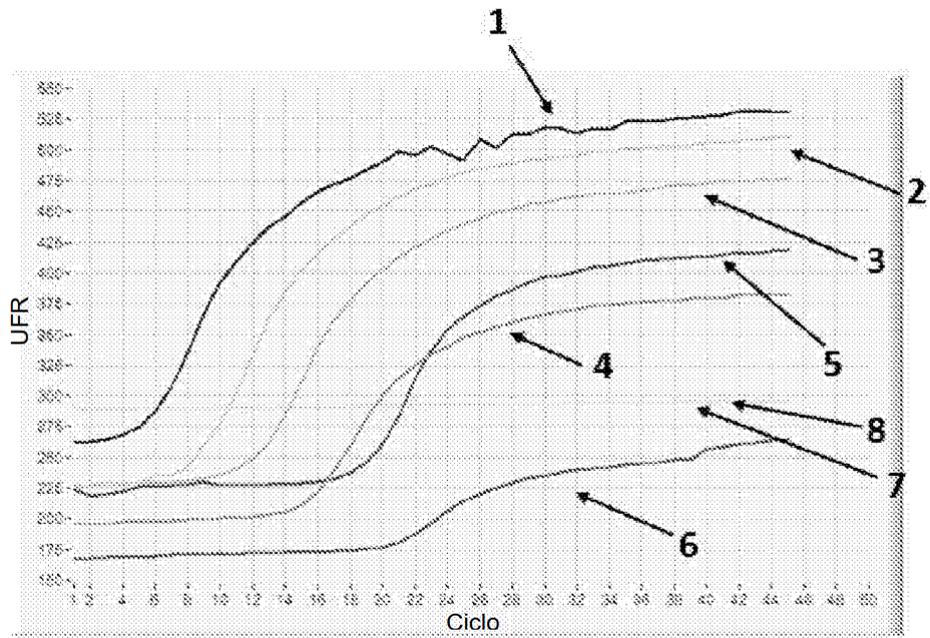


Fig. 19B

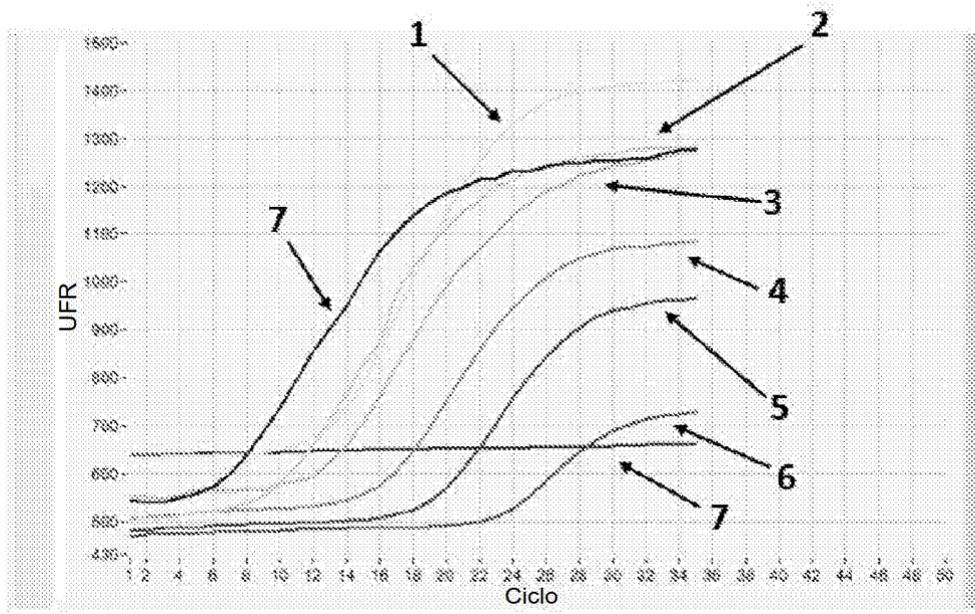


Fig. 20

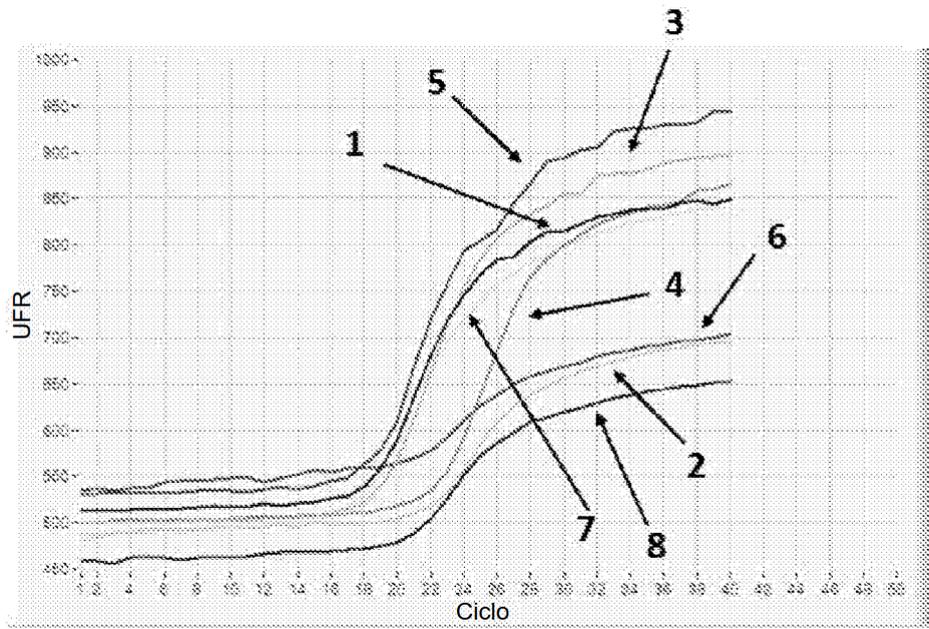


Fig. 21

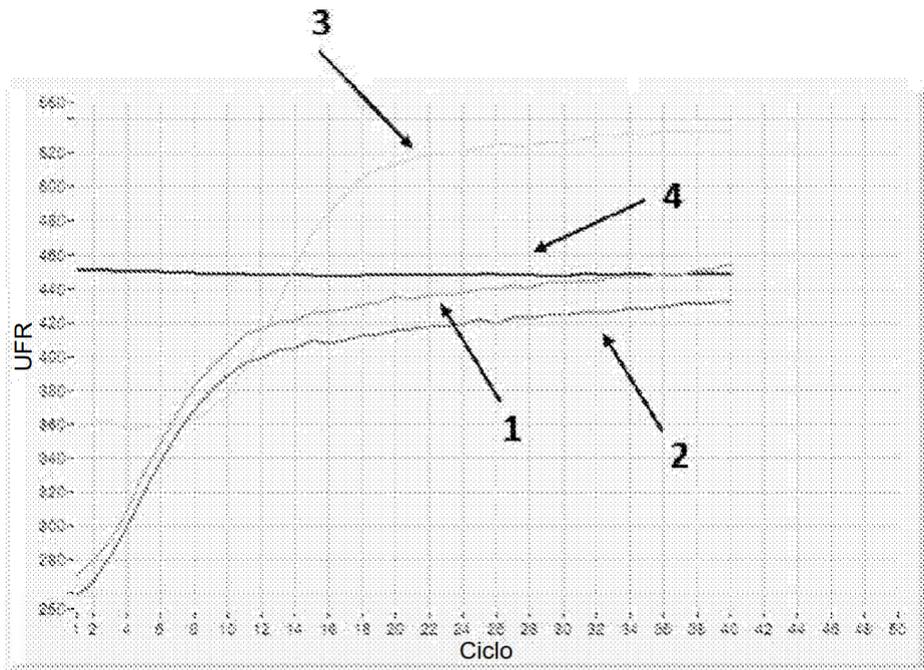


Fig. 22A

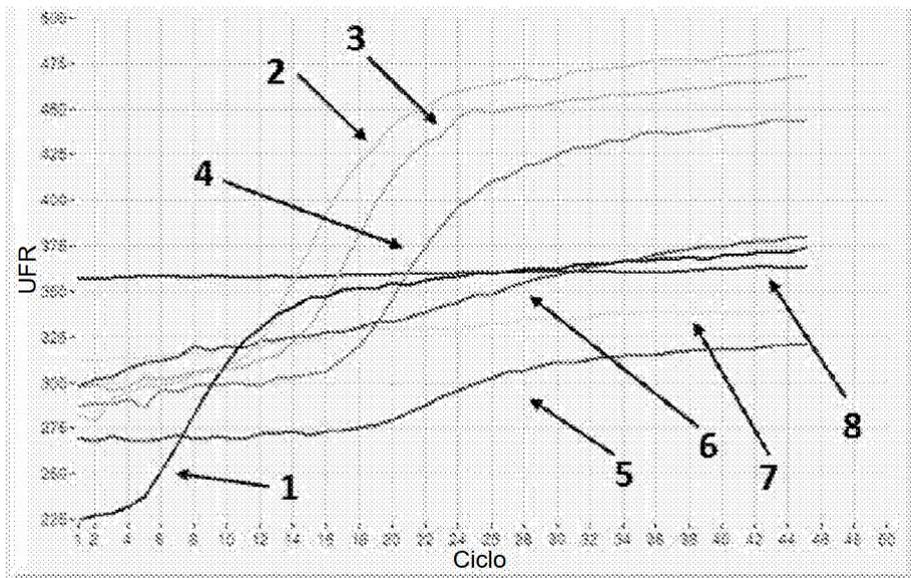


Fig. 22B

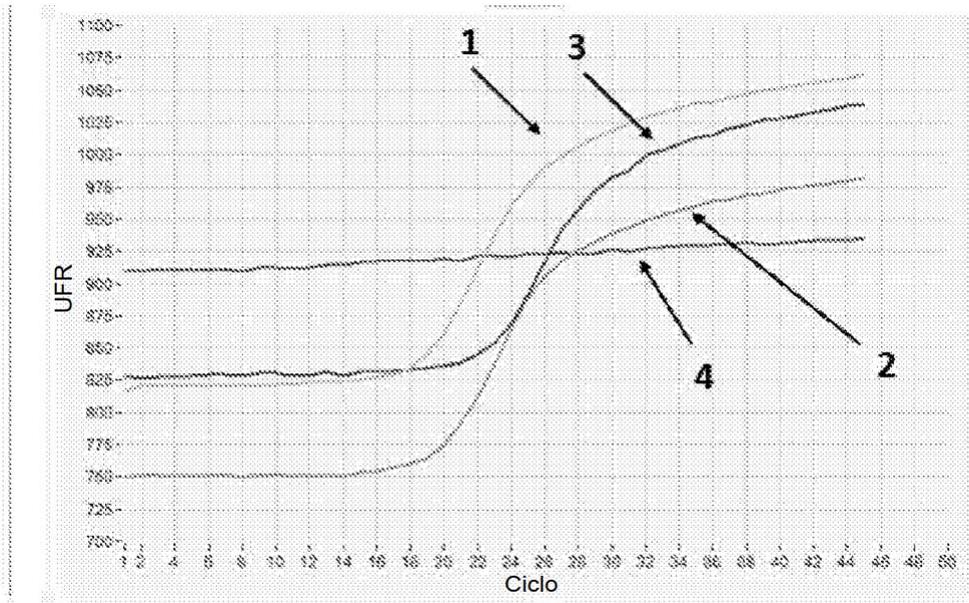


Fig. 23A

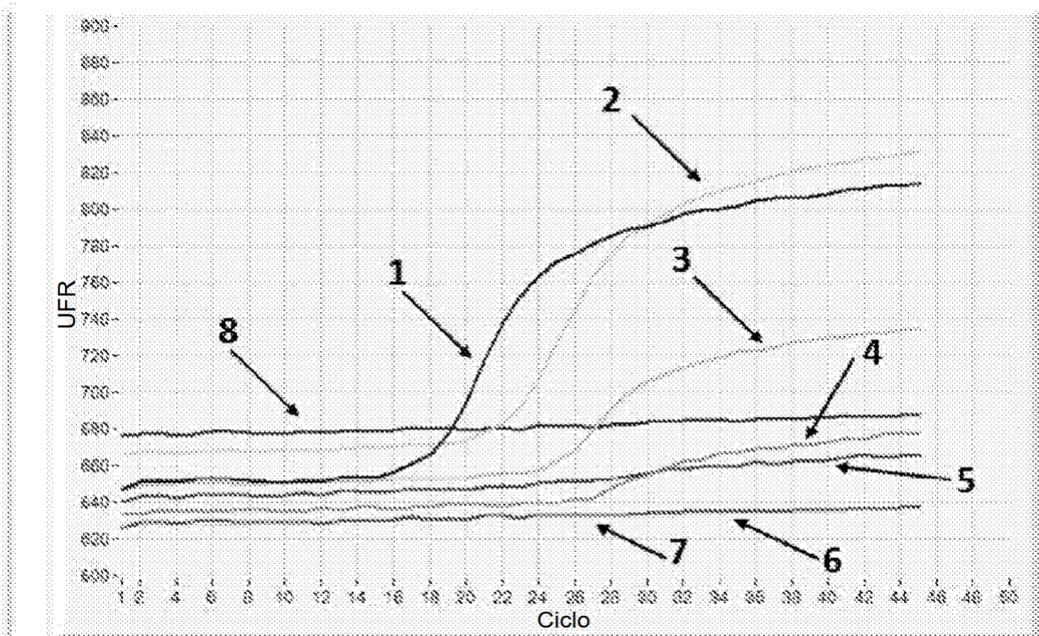


Fig. 23B

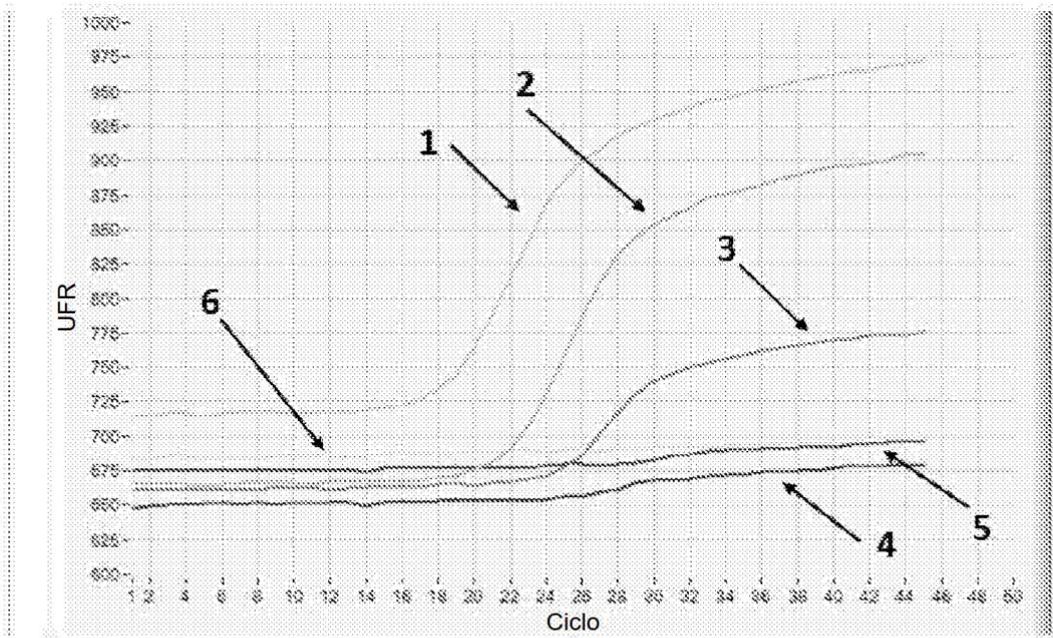


Fig. 23C

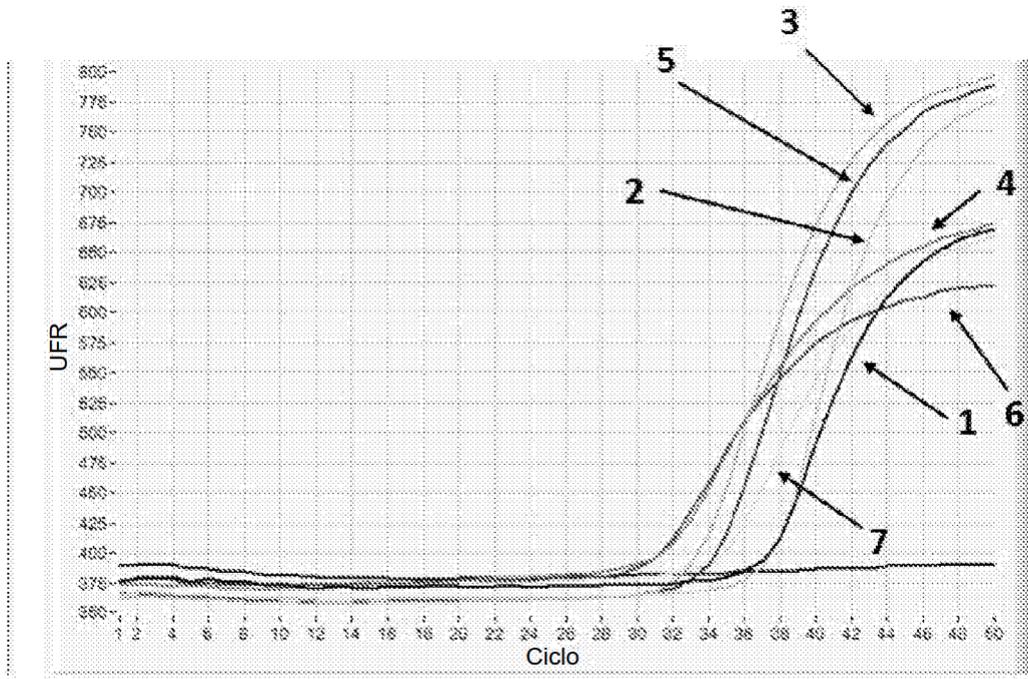


Fig. 24A

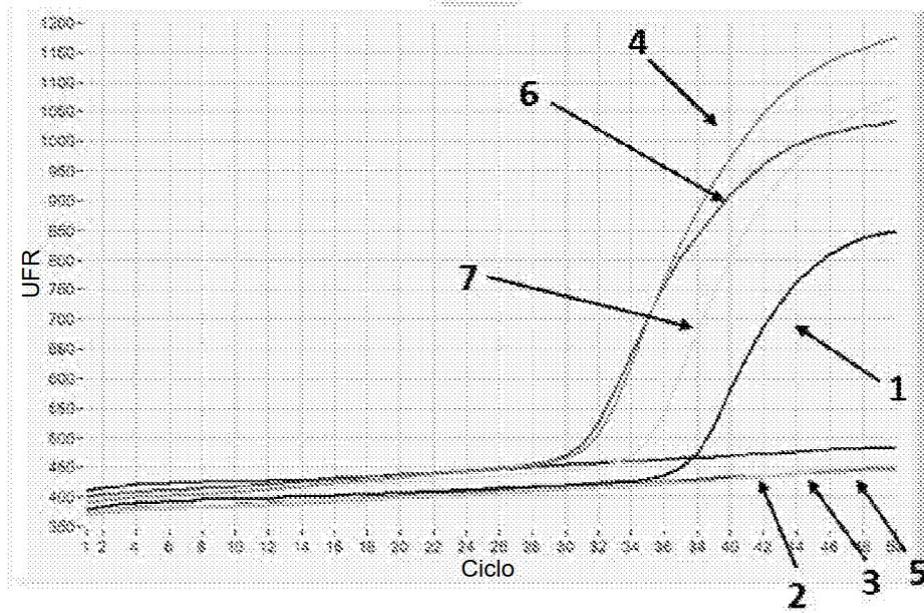


Fig. 24B

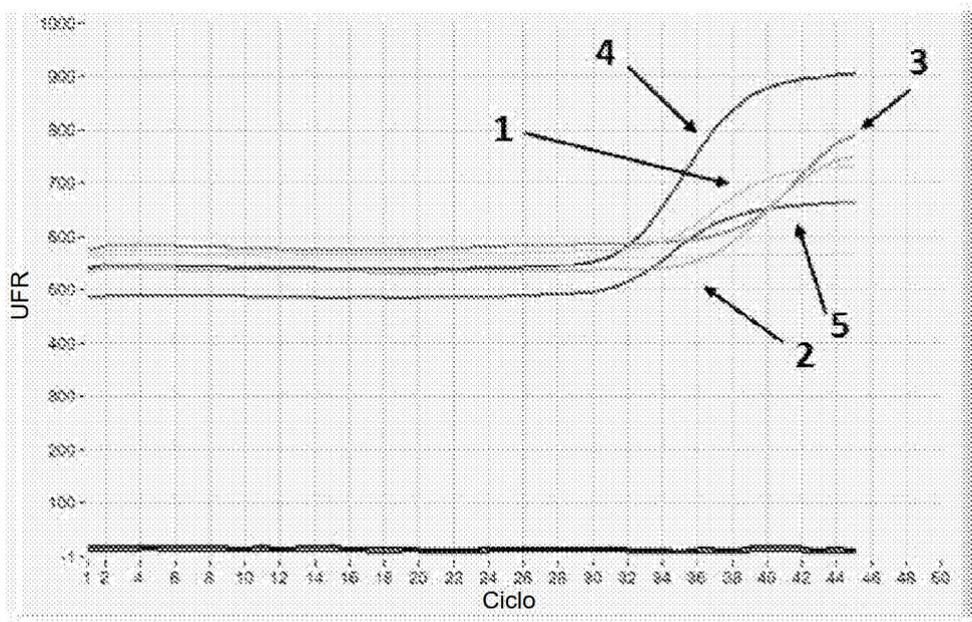


Fig. 25A

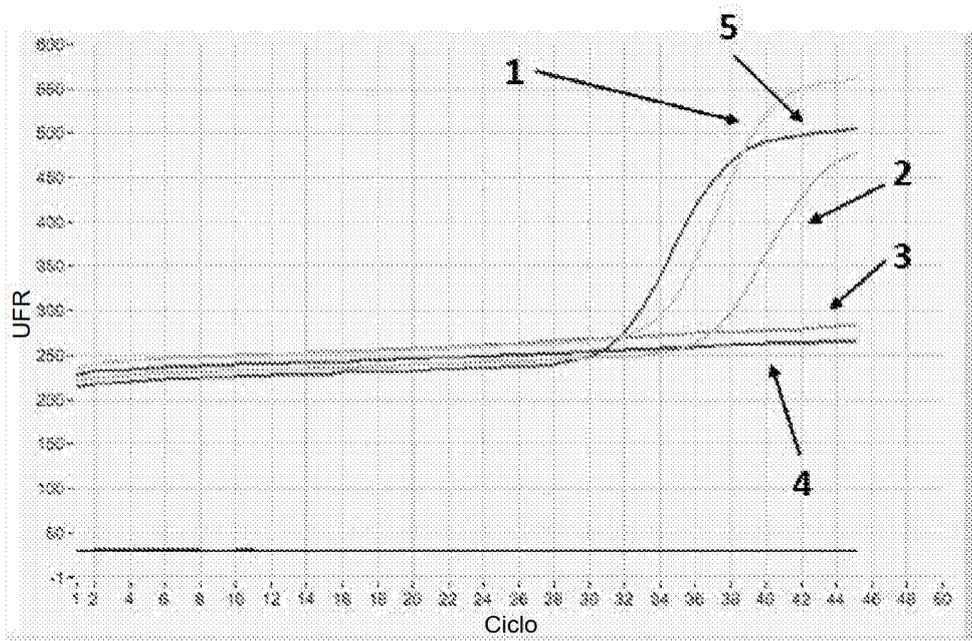


Fig. 25B

Gráfico de Amplificación

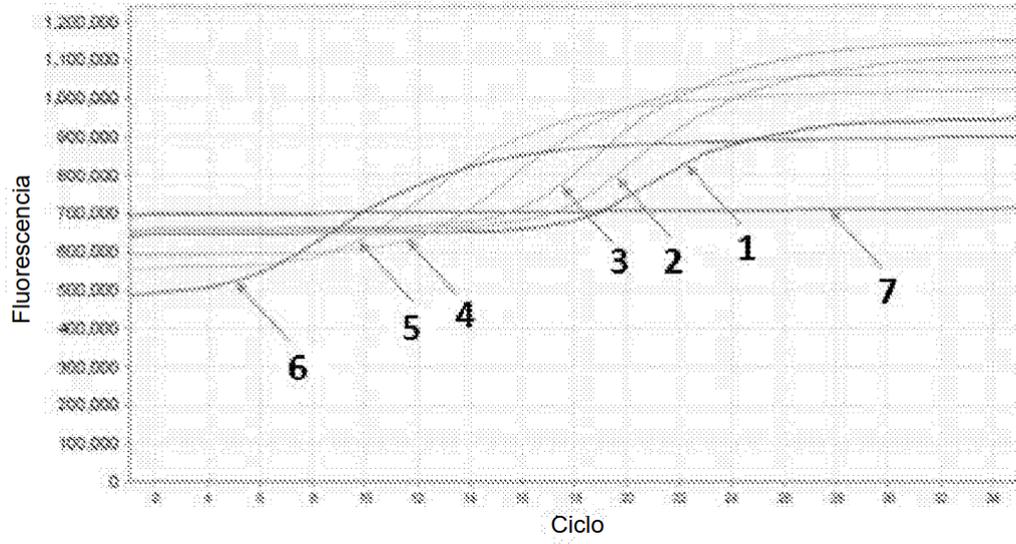


Fig. 26A

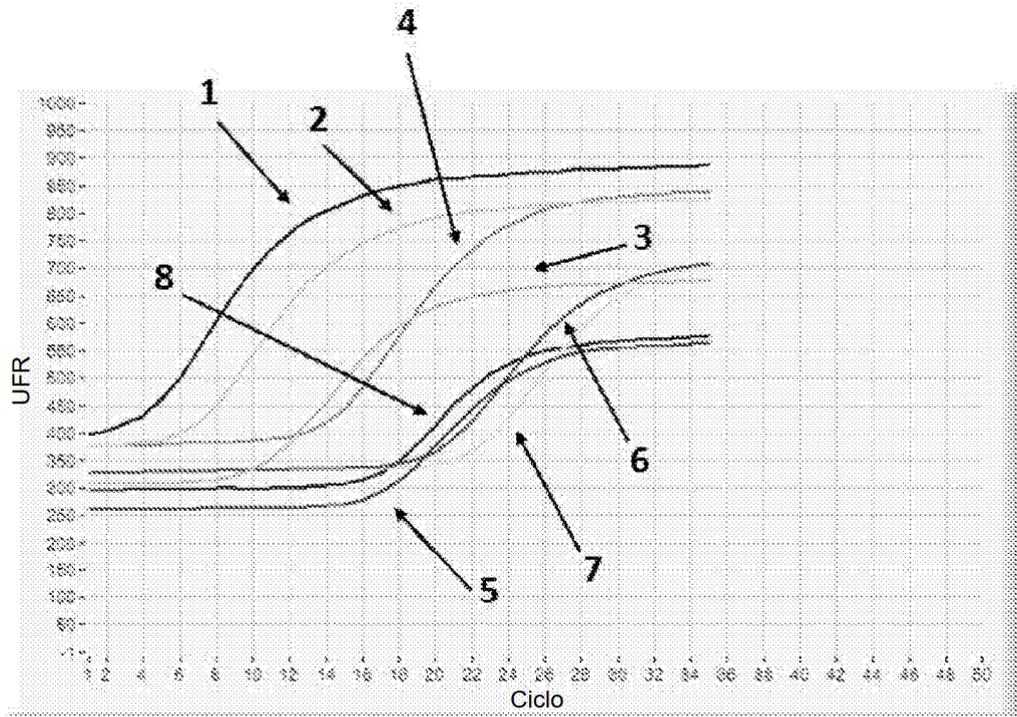


Fig. 26B

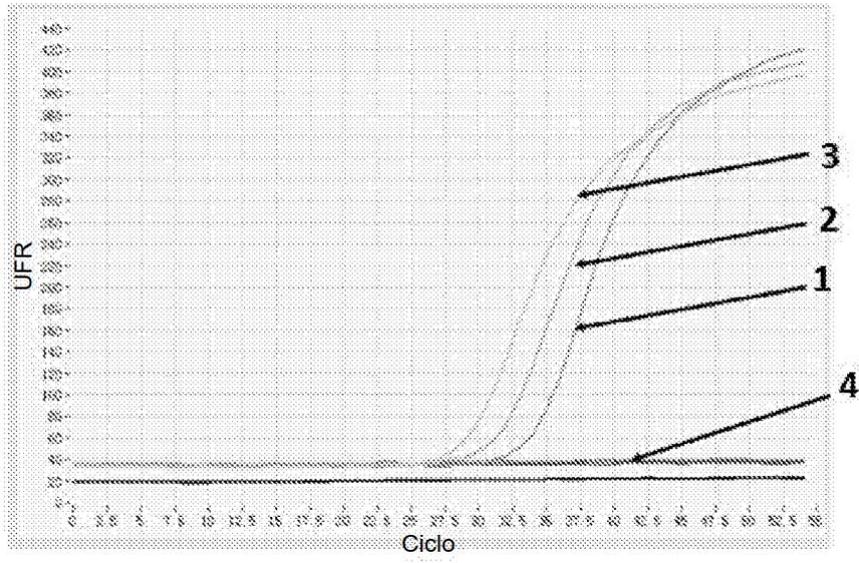


Fig. 27

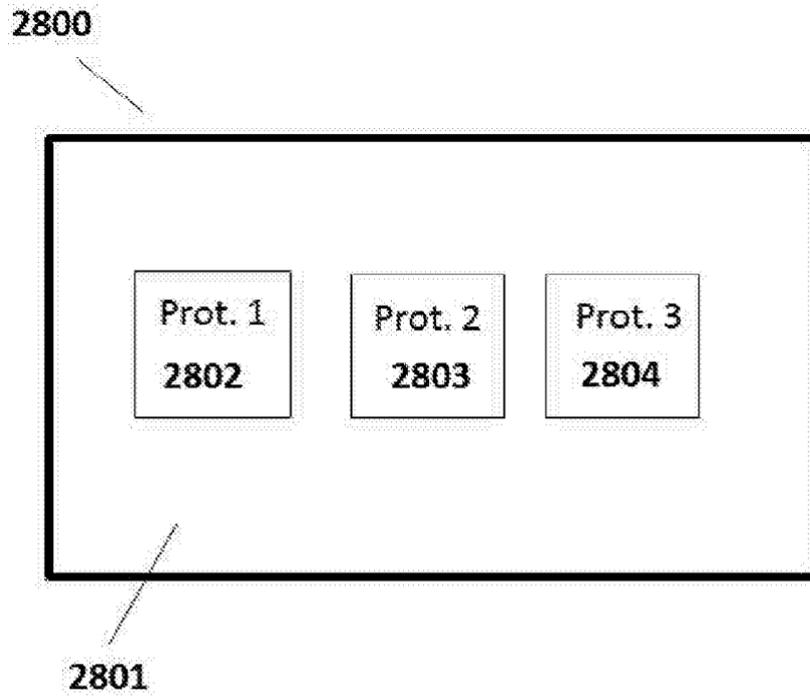


Fig. 28A

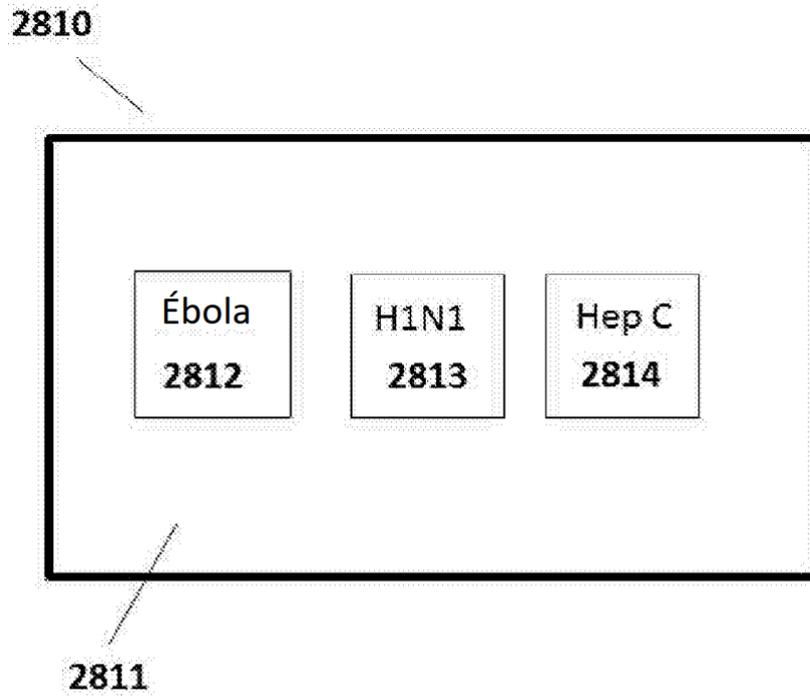


Fig. 28B