

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 899 739**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

C12Q 1/6851 (2008.01)

G16B 45/00 (2009.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.08.2014** **E 20191740 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.09.2021** **EP 3770272**

54 Título: **Un procedimiento de análisis y sistema para analizar una reacción de amplificación de ácido nucleico**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.03.2022

73 Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstraße 124
4070 Basel, CH

72 Inventor/es:

KNOBEL, ROLF

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 899 739 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

Un procedimiento de análisis y sistema para analizar una reacción de amplificación de ácido nucleico

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un procedimiento de análisis para una reacción de amplificación de ácido nucleico ultrarrápida RNR tal como una reacción en cadena de la polimerasa PCR y un sistema para analizar una reacción de amplificación de ácido nucleico de un analito, tal como para detectar una presencia y/o medir una cantidad de un analito en una muestra por una reacción de amplificación de ácido nucleico.

Antecedentes y técnica relacionada

Las técnicas de amplificación de ácido nucleico *in vitro* incluyen una variedad de procedimientos basados en diferentes enfoques. Un enfoque incluye procedimientos por los que se multiplica una secuencia de ADN o ARN, haciéndola por tanto más fácilmente detectable para diversos procedimientos o pruebas. Por ejemplo, la amplificación *in vitro* del ácido nucleico se puede realizar usando uno de los siguientes procedimientos: reacción en cadena de la polimerasa PCR, reacción en cadena de la ligasa (LCR) o procedimiento de amplificación mediada por transcripción (TMA) isotérmica. En todos los enfoques mencionados anteriormente, el ácido nucleico se somete a ciclos de amplificación repetitivos.

Una técnica que se usa con frecuencia para diversas aplicaciones médicas, biológicas o industriales es la técnica de PCR. Esta técnica se basa en el ciclado térmico, que comprende ciclos de calentamiento y enfriamiento repetidos para replicación enzimática del ácido nucleico para amplificar una región específica de la hebra de ácido nucleico. A medida que avanza la PCR, el ADN generado se usa él mismo como molde para replicación, poniendo en marcha una reacción en cadena en la que el molde de ADN se amplifica exponencialmente duplicándose (al menos en teoría) con cada ciclo de reacción.

Las técnicas de amplificación de ácido nucleico incluyen muchas variaciones. Una de estas variaciones se denomina RNR de ácido nucleico ultrarrápida y se basa en amplificar y detectar simultáneamente la presencia de ácido nucleico en la muestra y adicionalmente cuantificar su concentración en la muestra.

Existen varios procedimientos conocidos para la detección de productos en la amplificación de ácido nucleico cuantitativa. De acuerdo con uno de estos procedimientos, para medir indirectamente la cantidad de ácido nucleico durante la RNR, se adquiere la intensidad de una emisión de fluorescencia del analito y se crea una curva de crecimiento indicativa de la intensidad de la emisión de fluorescencia en el intervalo de ciclo de RNR. El incremento de la señal de la curva de crecimiento por encima del valor de referencia inicialmente estacionario se usa para determinar un ciclo de cuantificación C_q en cada reacción.

La determinación del ciclo de cuantificación C_q basada en la curva de crecimiento usando diversos procedimientos de CT es el objeto de múltiples solicitudes de patente:

El documento EP 2719770 A1 divulga un procedimiento para detectar una presencia y/o medir una cantidad de un analito en una muestra por PCR así como un analizador respectivo. En particular, se divulga la normalización de señal de la curva de crecimiento teniendo en cuenta un valor de crecimiento máximo de la señal.

El documento US7788039B2 divulga un procedimiento para determinar una cantidad de ácido nucleico diana en una muestra. Se calcula una cantidad inicial de la diana de acuerdo con una ecuación de calibración usando una cantidad inicial del estándar, los valores de la curva de crecimiento de diana y estándar, donde la ecuación de calibración es una ecuación no lineal.

El documento EP1798652B1 divulga un algoritmo matemático para crear una señal de crecimiento a partir de datos de medición.

El documento EP1798542A1 muestra un procedimiento para determinar la presencia de un ácido nucleico en una muestra en el que se selecciona un valor digital en la señal de crecimiento y se determina la presencia del ácido nucleico a partir de una comparación del valor digital seleccionado con valores digitales calibrados.

"Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method", Thomas D Schmittgen *et al.*, Nature Protocols 3, - 1101 - 1108 (2008) proporciona una visión general del procedimiento de C_T comparativo para estudios de expresión génica cuantitativos.

Los sistemas de amplificación de ácido nucleico están disponibles comercialmente de diversos proveedores en base a diversos procedimientos de amplificación de ácido nucleico y se emplean para aplicaciones médicas tales como la detección de enfermedades infecciosas. Por lo tanto, la fiabilidad y precisión de los procedimientos de amplificación de ácido nucleico es de suma importancia.

Por lo tanto, los modos de realización de la invención tienen como objetivo proporcionar una mejora en el procedimiento de análisis usando amplificación de ácido nucleico y un sistema respectivo que permite una mejora en la consistencia, precisión, exactitud, linealidad y discriminación cualitativa de un análisis de amplificación de ácido nucleico.

Sumario de la invención

La invención como se define por las reivindicaciones adjuntas se refiere a que se proporciona un procedimiento de análisis para una reacción en cadena de la polimerasa ultrarrápida para detectar una presencia y/o medir una cantidad de un analito en una muestra como se reivindica en la reivindicación 1. Además, se proporciona un sistema para analizar una reacción de amplificación de ácido nucleico de un analito.

Los modos de realización de la invención se refieren a un procedimiento de análisis para una RNR de amplificación de ácido nucleico ultrarrápida que usa una función de umbral combinada CTF en el intervalo de ciclo de RNR, comprendiendo la CTF al menos dos niveles de umbral diferentes. La CTF se obtiene por cálculo sobre la base de al menos dos niveles de umbral diferentes.

El cálculo se puede realizar antes o después de la adquisición de la intensidad de la emisión de fluorescencia y la creación de la curva de crecimiento. Por ejemplo, el cálculo se realiza una vez y la CTF resultante se almacena en una memoria electrónica para leer la CTF cuando sea necesario para determinar el número de ciclos de cuantificación Cq de la RNR. De forma alternativa, la CTF se calcula después de la adquisición de la intensidad de la emisión fluorescente y/o después de la creación de la curva de crecimiento antes de la determinación del número de ciclos de cuantificación.

Los modos de realización de la invención son en particular ventajosos ya que combinar al menos dos niveles de umbral diferentes en la CTF permite la mejora de la precisión de la RNR en un amplio intervalo de concentraciones de analito y/o limita el efecto de la presencia de sustancias interferentes.

Además, los modos de realización de la presente invención son en particular ventajosos ya que se previene la aparición de negativos falsos para concentraciones de analito débiles y valores de Cq erróneos para concentraciones de analito altas, incrementando por tanto el intervalo de trabajo fiable del análisis de RNR.

De acuerdo con los modos de realización de la invención, al menos uno de los niveles de umbral CT es un valor constante durante el intervalo de ciclo de RNR. El valor constante se puede dar por un incremento de intersección relativo (procedimiento RII), un umbral de crecimiento parcial (procedimiento PGT), un múltiplo de la desviación estándar de la curva de crecimiento por encima del valor de referencia, un umbral establecido manualmente o una función constante.

De acuerdo con los modos de realización de la invención, la CTF se obtiene a partir de los al menos dos niveles de umbral diferentes combinando los niveles de umbral en el intervalo de ciclo de RNR, tal como por superposición, combinación lineal o no lineal. De forma alternativa o además, la CTF se obtiene dividiendo el intervalo de ciclo de RNR en intervalos de ciclo de RNR y calculando una CTF separada por intervalo usando al menos dos niveles de umbral diferentes por intervalo en el que los al menos dos niveles de umbral diferentes pueden variar de intervalo a intervalo.

De acuerdo con un modo de realización de la invención, la CTF es una combinación, tal como una combinación lineal, de dos niveles de umbral en todo el intervalo de ciclo de RNR. Uno de los niveles de umbral proporciona una contribución dominante a la CTF en ciclos de reacción tempranos de la RNR, tal como para números de ciclos por debajo de 10, 15 o 20, mientras que uno de los niveles de umbral proporciona una contribución dominante a la CTF en ciclos de reacción tardíos de la RNR, tal como para números de ciclos mayores que 30, 40 o 50. De acuerdo con los modos de realización de la invención, la CTF pasa de un nivel de umbral inicial a un nivel de umbral final en el intervalo de ciclo de RNR. En otras palabras, la contribución del nivel de umbral inicial a la CTF puede ser dominante para ciclos de reacción tempranos de la RNR, tal como para el número de ciclos 0 o 1, y la contribución del nivel de umbral final a la CTF puede estar sustancialmente por debajo de la contribución del nivel de umbral inicial tal como 0 en ciclos de reacción tempranos de la RNR, tal como para el número de ciclos 0 o 1. De manera análoga, la contribución del nivel de umbral final en ciclos de reacción tardíos de la RNR a la CTF puede estar sustancialmente por encima de la contribución del nivel de umbral inicial. La transición de la CTF del nivel de umbral inicial al nivel de umbral final en el intervalo de ciclo de RNR puede ser una transición de una etapa o múltiples etapas, una transición lineal, una transición polinómica, una transición exponencial o una combinación de las mismas.

De acuerdo con los modos de realización de la invención, el nivel de umbral inicial en sí mismo comprende una primera combinación A de al menos dos niveles de umbral diferentes. De forma alternativa o además, el nivel de umbral final en sí mismo comprende una segunda combinación B de al menos dos niveles de umbral diferentes donde los niveles de umbral que se combinan en el nivel de umbral inicial pueden ser los mismos o diferentes

niveles de umbral que los niveles de umbral que se combinan en el nivel de umbral final.

De acuerdo con un modo de realización de la invención, uno de los niveles de umbral inicial y final no es una combinación de niveles de umbral sino un único nivel de umbral.

De acuerdo con los modos de realización de la invención, el nivel de umbral inicial comprende al menos un nivel de umbral que se adapta para la determinación precisa del número de ciclos de cuantificación para una curva de crecimiento fuerte, es decir, una curva de crecimiento obtenida para una concentración de analito alta y/o concentración baja de una sustancia de interferencia.

Por otro lado, el nivel de umbral final comprende al menos un nivel de umbral que se adapta para la determinación precisa del número de ciclos de cuantificación para incrementos tardíos, es decir, una concentración de analito baja y/o concentración alta de una sustancia de interferencia. Debido a la transición de la CTF del nivel de umbral inicial al nivel de umbral final sobre el intervalo de ciclo de RNR, se permite una determinación precisa del número de ciclos de cuantificación para incrementos de señal tanto tempranos como tardíos.

De acuerdo con los modos de realización de la invención, el nivel de umbral inicial tiene un punto de partida con una coordenada y debajo de una coordenada y de un punto final del nivel de umbral final, dando como resultado un incremento en la función de umbral combinada con una pendiente positiva o el nivel de umbral inicial tiene un punto de partida con una coordenada y por encima de una coordenada y de un punto final del nivel de umbral final dando como resultado una disminución en la función de umbral combinada, es decir, en una función de umbral combinada que tiene una pendiente negativa en el intervalo de ciclo de RNR.

De acuerdo con los modos de realización de la invención, la coordenada y del punto de partida y la coordenada y del punto final se usan para calcular la función de umbral combinada por una transición lineal, polinómica, exponencial, logarítmica u otra entre las dos coordenadas y. Por ejemplo, las dos coordenadas y se almacenan en una memoria electrónica y se leen de la memoria electrónica para calcular la función de umbral combinada por medio de interpolación lineal entre las dos coordenadas y.

De acuerdo con los modos de realización de la invención, la CTF es una constante en el intervalo de ciclo de RNR. Por ejemplo, cada uno de los niveles de umbral proporciona una constante y la función de umbral combinada se calcula como una combinación lineal de las dos constantes, tal como un promedio o un promedio ponderado de las dos constantes. Por ejemplo, uno de los niveles de umbral se adapta para la determinación precisa del número de ciclos de cuantificación para un incremento de señal temprano, mientras que el otro de los dos niveles de umbral se puede adaptar para la determinación precisa del número de ciclos de cuantificación para un incremento de señal tardío, por lo tanto para la determinación de CT en ciclos de reacción tardíos de la RNR.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un sistema para analizar una reacción de amplificación de ácido nucleico de un analito, comprendiendo el sistema: un sistema de detección configurado para adquirir la intensidad de emisión de fluorescencia del analito para cada ciclo de reacción de amplificación de la RNR y una unidad de procesamiento configurada para: crear una curva de crecimiento indicativa de la intensidad de la emisión de fluorescencia en un intervalo de ciclos de reacción de la RNR, proporcionar una función de umbral combinada CTF que comprende al menos dos niveles de umbral diferentes; y determinar un número de ciclos de cuantificación Cq de la RNR, siendo el número de ciclos de cuantificación Cq indicativo de un resultado de análisis cuantitativo y/o cualitativo de la curva de crecimiento como el número de ciclos correspondiente a una intersección de la curva de crecimiento con la función de umbral combinada.

De acuerdo con los modos de realización de la invención, la unidad de procesamiento proporciona la función de umbral combinada leyendo datos de una memoria electrónica del sistema que es descriptiva de la función de umbral combinada y calculando la función de umbral combinada usando estos datos y/o la curva de crecimiento. Por ejemplo, los datos almacenados en la memoria electrónica indican la coordenada y del punto de partida del nivel de umbral inicial y el punto final del nivel de umbral final y el cálculo de la función de umbral combinada por el procesador se realiza por medio de una interpolación entre las coordenadas y en el intervalo de ciclo de RNR.

Los modos de realización de la invención pueden ser en particular ventajosos ya que la exactitud y precisión del análisis se pueden incrementar en un amplio intervalo de concentración del analito y/o consistencia frente a interferencias.

Breve descripción de los dibujos

En lo siguiente se describirán los modos de realización de la invención con mayor detalle, solo a modo de ejemplo, haciendo referencia a los dibujos en los que:

la fig. 1 es un diagrama de bloques que ilustra un esquema de un analizador de RNR para analizar una

muestra, tal como una muestra biológica,

la fig. 2 ilustra esquemáticamente una curva de crecimiento de RNR de un analito para cada ciclo de RNR,

5 la fig. 3A ilustra esquemáticamente dos curvas de crecimiento de RNR diferentes, dos niveles de umbral y una CTF resultante,

la fig. 3B ilustra esquemáticamente dos curvas de crecimiento de RNR diferentes, dos niveles de umbral y una CTF resultante,

10 la fig. 4 ilustra una CTF alternativa para las curvas de crecimiento de la fig. 3,

la fig. 5 muestra una ventana que se visualiza por un analizador con una CTF con pendiente negativa,

15 la fig. 6 muestra una ventana que se visualiza por un analizador con una CTF con pendiente negativa, con una transición de la CTF de RII como nivel de umbral inicial a PGT como nivel de umbral final,

la fig. 7 muestra una ventana que se visualiza por un analizador con una CTF con pendiente positiva,

20 la fig. 8 muestra ejemplos de transición lineal, cuadrática y exponencial entre los niveles de umbral inicial y final,

la fig. 9 muestra diversas curvas de crecimiento de una serie de diluciones,

25 la fig. 10 muestra una comparación de diversos valores de C_q obtenidos usando niveles de umbral conocidos y la CTF según la invención,

la fig. 11 muestra diversas curvas de calibración de valores de C_q en función de la concentración para niveles de umbral conocidos y la CTF según la invención,

30 la fig. 12 muestra curvas de crecimiento de interferencias,

la fig. 13 muestra umbrales de interferencias, y

35 la fig. 14 muestra valores de C_q en función de la curva de crecimiento de interferencias

Descripción detallada

40 En toda la siguiente descripción detallada de modos de realización de la invención se designarán elementos idénticos o similares por números de referencia idénticos.

El término "valor de referencia" se refiere a la parte inicial de la curva de crecimiento que no muestra incremento de la señal.

45 El término "intersección" o "valor de intersección" como se entiende en el presente documento es el valor de desviación de señal de la curva de crecimiento en un número de ciclos tempranos, es decir, 0, que se obtiene por extrapolación.

50 El término "línea de saturación" se refiere a la parte de la curva de crecimiento en la región de meseta después de la fase de crecimiento exponencial que también se denomina fase de amplificación exponencial y después de la fase de nivelación.

El término "nivel de umbral" como se usa en el presente documento engloba un nivel de umbral para la curva de crecimiento.

55 Una "función de umbral combinada" o "CTF" como se entiende en el presente documento engloba una función matemática en el intervalo de ciclo que se compone de al menos dos niveles de umbral diferentes. De acuerdo con un modo de realización, una CTF puede ser una combinación lineal o logarítmica de dos niveles de umbral diferentes.

60 En un modo de realización, el valor de Y, es decir, el nivel de umbral, devuelto por la CTF para un valor de X dado, es decir, el número de ciclos, puede pasar de uno de los dos niveles de umbral diferentes al otro.

65 De acuerdo con un modo de realización, una CTF puede pasar de una primera combinación (por ejemplo, lineal o logarítmica) de al menos dos niveles de umbral diferentes a una segunda combinación (por ejemplo, lineal o logarítmica) de al menos dos niveles de umbral diferentes.

El término "intervalo de ciclo de RNR de amplificación de ácido nucleico ultrarrápida" como se entiende en el presente documento se refiere al intervalo de números de ciclos que se ejecuta para adquirir los valores de intensidad para la creación de la curva de crecimiento. Por ejemplo, el intervalo de ciclo de RNR puede ser un número fijo predefinido, tal como 30, 40 o 50. El establecimiento del intervalo de ciclo de RNR es una compensación entre el rendimiento del sistema de análisis para analizar la reacción de amplificación de ácido nucleico y la sensibilidad del sistema de análisis para la determinación de un número de ciclos de cuantificación para señales débiles.

De acuerdo con un modo de realización de la invención, se implementa un procedimiento de umbral como un incremento de intersección relativo RII. Por ejemplo, el RII es una paralela por encima del valor de referencia.

De acuerdo con los modos de realización de la invención, el RII puede tener el siguiente formato:

$$y(x) = B + r \cdot I \quad (1)$$

B: función de referencia, típicamente lineal

I: extrapolación de intersección al número de ciclos 0

r: parámetro de porcentaje positivo, por ejemplo, 50 %

De acuerdo con los modos de realización de la invención, se puede implementar un procedimiento de umbral como un umbral de crecimiento parcial PGT que depende de la diferencia de señal de la curva de crecimiento entre la línea de saturación y la línea de referencia, es decir, el crecimiento del valor de referencia a la línea de saturación. El PGT puede devolver un valor de Y constante en todo el intervalo de números de ciclos.

De acuerdo con los modos de realización de la invención, el PGT puede tener la siguiente forma:

$$y(x) = B + p \cdot G = B + p \cdot (S - B) \quad (2)$$

B: función de referencia

S: línea de saturación

G: crecimiento del valor de referencia a la línea de saturación

p: parámetro preferentemente entre un 0 % y un 100 %, por ejemplo, 5 %

De acuerdo con un modo de realización de la invención, un procedimiento de umbral se da por la desviación estándar de la curva de crecimiento por encima del valor de referencia y puede tener la siguiente forma:

$$y(x) = B + f \cdot D \quad (3)$$

B: función de referencia

f: parámetro del factor multiplicador, por ejemplo, 10

D: desviación estándar de la curva de crecimiento

De acuerdo con los modos de realización de la invención, un procedimiento de umbral se da por un valor de umbral que se preestablece o se introduce manualmente por un usuario.

De acuerdo con un modo de realización de la invención, el procedimiento de umbral es un valor constante que es constante en el intervalo de ciclo de RNR, por ejemplo:

$$y(x) = C \quad (4)$$

C: una constante predefinida basada en datos empíricos.

De acuerdo con los modos de realización de la invención, la transición de uno de los al menos dos niveles de umbral diferentes, es decir, el nivel de umbral inicial, al otro de los al menos dos niveles de umbral diferentes, es decir, el nivel de umbral final, es tal por una transición de una etapa o múltiples etapas, lineal, polinómica y/o exponencial como se ilustra en la figura 8.

Por ejemplo, una CTF con una transición lineal del nivel de umbral inicial y_1 al nivel de umbral final y_2 puede tener

la siguiente forma:

$$CTF(x) = y_1 + (y_2 - y_1) \cdot \frac{x - x_1}{x_2 - x_1} \quad (5)$$

5 donde:

x_1 : número de ciclos de reacción tempranos, tal como 0 o 1;

x_2 : número de ciclos de reacción tardíos, tal como 30, 40 o 50;

10

y_1 : nivel de umbral inicial;

y_2 : nivel de umbral final.

15

De acuerdo con un modo de realización de la invención, la CTF puede tener el siguiente formato para la implementación de una transición polinómica:

$$CTF(x) = y_1 + (y_2 - y_1) \cdot \left(\frac{x - x_1}{x_2 - x_1} \right)^p \quad (6)$$

20

donde:

p: orden polinómico fijo, tal como 2 para una función polinómica cuadrática.

25

De acuerdo con un modo de realización de la invención, la CTF puede tener el siguiente formato para la implementación de una transición exponencial:

$$CTF(x) = e^{\frac{x_2 \ln(y_1) - x_1 \ln(y_2)}{x_2 - x_1}} \cdot \left(\frac{y_2}{y_1} \right)^{\frac{x}{x_2 - x_1}} \quad (7)$$

30

La figura 1 muestra esquemas del sistema de RNR 100 para amplificación y cuantificación simultánea de un analito ultrarrápida. Usando el procedimiento de RNR, se crea y se detecta una señal durante el proceso de amplificación. La señal en general representa la cantidad de cualquier analito creado durante la amplificación y por tanto presente en la muestra. La muestra es un líquido que puede contener el analito y/u otros productos de la reacción de amplificación. El sistema de RNR comprende un bloque de termociclador 120, una fuente de luz de excitación 110, un sistema detector 130 para recopilar la señal de RNR ultrarrápida y un sistema de procesamiento de datos 140 que comprende una unidad de procesamiento y una memoria 150 para almacenar la señal de RNR e instrucciones de programa 160 para analizar la señal de RNR, y una unidad 170 para visualizar la señal y emitir un resultado del análisis.

35

40

El analito se conjuga con un tinte fluorescente y la muestra se carga en el bloque de termociclador 120. Un bloque de termociclador 120 puede ser un bloque de muestra de diseño convencional, que comprende 96 pocillos y puede contener hasta 96 muestras. La muestra se ilumina con la fuente de excitación de fluorescencia 110, y los datos de fluorescencia brutos se miden por el sistema detector de RNR 130 para cada número de ciclos de RNR. El detector de RNR 130 es adecuado para recopilar la señal de fluorescencia de RNR emitida por uno o más tintes fluorescentes. Los datos medidos se recopilan en la unidad de memoria del sistema de procesamiento de datos 150 y se pueden visualizar en la unidad de visualización 170 como una curva de crecimiento de RNR no normalizada, o de forma alternativa como una curva de crecimiento de RNR normalizada.

45

50

La figura 2 muestra el ejemplo esquemático de una curva de crecimiento 200 que representa la señal de RNR tomada para cada ciclo de RNR. El diagrama incluye un sistema de coordenadas cartesianas donde la abscisa se designa como el eje x y la ordenada se designa como el eje y, y donde x es el número de ciclos de la RNR e y es la intensidad de la emisión fluorescente.

55

La figura 2 también muestra los valores de intensidad de fluorescencia 205 como una línea de puntos, donde cada uno de los valores de intensidad 205 se ha adquirido realizando una medición de intensidad de emisión de fluorescencia de la reacción de amplificación en curso. Los valores de intensidad 205 se modelan usando una fórmula de modelo de curva de crecimiento matemática u otro tipo de interpolación y/o interpolación. La señal de RNR se muestra como la curva de crecimiento 200 en la figura 2. Aquí, el valor de intersección 210 es el valor de desviación de la señal de RNR cuando el número de ciclos de RNR es cero.

60

El valor de referencia 240 es la señal de RNR durante los ciclos iniciales de la reacción RNR, típicamente medida entre los ciclos 1 y 15, donde no existe un incremento detectable en la fluorescencia debido a los productos de reacción RNR. El valor de referencia 240 es la función de referencia B (véanse las ecuaciones 1 a 3). El umbral predefinido 220 se usa para determinar un número de ciclos en el que la señal de RNR excede el valor de

referencia 240 de la reacción RNR, es decir, el ciclo en el que existe el primer incremento significativo detectable en la fluorescencia, que es aproximadamente $c_q = 22$ aquí. El umbral 220 se da por CTF (véanse las ecuaciones 5 a 7).

- 5 El valor de crecimiento máximo 250 es una diferencia entre una intensidad máxima de la señal de RNR en una región de meseta 230 y la señal de RNR en el valor de referencia 240. La etapa de meseta 230 es la señal de RNR durante los ciclos finales de la reacción RNR.

10 La intensidad de la señal de RNR en una región de meseta 230 es S y el valor de crecimiento máximo 250 es el crecimiento G en la ecuación 2 anterior.

15 La fig. 3A muestra un diagrama con una representación gráfica de una curva de crecimiento 200.1 y otra curva de crecimiento 200.2 que se muestra como una línea discontinua. El diagrama incluye un sistema de coordenadas cartesianas donde la abscisa se designa como el eje x y la ordenada se designa como el eje y análoga al diagrama mostrado en la fig. 2, donde x es el número de ciclos de la RNR e y es la intensidad de la emisión fluorescente.

El diagrama muestra un primer nivel de umbral y_1 y un segundo nivel de umbral y_2 .

- 20 El umbral y_1 se puede definir introduciendo un punto de partida $T_1 (x_1, y_1)$; asimismo el nivel de umbral y_2 se puede definir introduciendo un punto final $T_2 (x_2, y_2)$.

25 En el modo de realización considerado aquí, la coordenada y del punto de partida T_1 que determina el nivel de umbral y_1 es mayor que la coordenada respectiva de y_2 del punto final T_2 de modo que y_1 está por encima del otro nivel de umbral y_2 como se ilustra en la fig. 3A.

30 La curva de crecimiento 200.1 se origina a partir de una concentración de muestra en el extremo superior del intervalo dinámico de la RNR, mientras que la concentración de muestra para la curva de crecimiento 200.2 está en el extremo inferior del intervalo dinámico. Como consecuencia, la fase exponencial de la curva de crecimiento 200.1 se produce en un intervalo de número de ciclos mucho menor que es el caso para la curva de crecimiento 200.2 como se ilustra en la fig. 3A.

35 La aplicación del nivel de umbral y_1 solo para la determinación de c_q de las curvas de crecimiento 200.1 y 200.2 daría como resultado la detección de c_q solo para la curva de crecimiento 200.1 pero no detectaría un valor de c_q (o daría lugar a una detección muy tardía) para la curva de crecimiento 200.2 ya que esta última es demasiado débil para alcanzar la intensidad y_1 en su fase exponencial y/o región de meseta dentro del intervalo de ciclo de RNR.

40 Por otra parte, el uso del nivel de umbral y_2 solo daría lugar a la detección de un valor de c_q para la curva de crecimiento 200.2 pero no sería fiable en lo que respecta a la detección para un valor de c_q para la curva de crecimiento 200.1 ya que y_2 está cerca del valor de referencia de modo que las variaciones podrían dar lugar a una detección de C_q imprecisa para la curva de crecimiento 200.1.

45 Esta situación se remedia combinando los niveles de umbral y_1 e y_2 lo que proporciona una función de umbral combinada CTF(x). En el ejemplo considerado aquí, la CTF está de acuerdo con la ecuación 5 anterior de modo que la CTF tiene una transición lineal de y_1 a y_2 en el intervalo de coordenadas x de x_1 a x_2 como se ilustra en la fig. 3A. Esto tiene el efecto beneficioso de que la CTF forma una intersección con ambas curvas de crecimiento 200.1 y 200.2 dentro de sus respectivas fases de crecimiento exponencial dando como resultado una detección fiable y precisa de los respectivos números de ciclos de cuantificación c_{q1} y c_{q2} .

50 Por tanto, la función de umbral combinada CTF(x) se calcula combinando los niveles de umbral y_1 e y_2 . En el modo de realización considerado aquí, esto es una combinación lineal que proporciona una transición lineal de T_1 a T_2 a lo largo del eje x. El intervalo de ciclo de RNR se puede establecer para que sea igual al intervalo de coordenadas x de x_1 a x_2 en el modo de realización considerado aquí, ya que los ciclos de RNR adicionales por encima del ciclo x_2 no proporcionarían una contribución significativa a la determinación del número de ciclos de cuantificación, sino que simplemente reducirían el rendimiento del sistema.

60 El cálculo de la CTF se puede realizar por el sistema de RNR 100 (véase la fig. 1). Por ejemplo, las coordenadas de los puntos T_1 a T_2 se almacenan en la memoria 150. Por la ejecución de las instrucciones de programa 160 T_1 a T_2 se leen de la memoria 150 y la función de umbral combinada CTF se calcula de acuerdo con la ecuación 5, 6 o 7. De forma alternativa, la función de umbral combinada CTF se almacena en la memoria 150 por medio de datos que son descriptivos de la CTF, tal como en forma de tabla.

65 En el ejemplo ilustrado en la fig. 3A, la CTF pasa del nivel de umbral inicial y_1 al nivel de umbral final y_2 . En el ejemplo considerado aquí, la transición es lineal y da como resultado una CTF con pendiente negativa con lo que el nivel de umbral inicial y_1 proporciona el punto de partida inicial T_1 en el número de ciclos $x_1 = 0$ y el nivel de

umbral final y_2 proporciona el punto final T_2 de la CTF en el número de ciclos x_2 .

La fig. 3B es ilustrativa de una elección alternativa de los niveles y_1 e y_2 . En el ejemplo considerado aquí, el uso del nivel de umbral y_1 solo no daría como resultado un negativo falso como sería el caso para el ejemplo de la fig. 3. Sin embargo, el punto de intersección de la curva de crecimiento 200.2 con el nivel de umbral CTF y_1 está solo en un número de ciclos tardíos C_{q2} , es decir, en $x = 48$ en lugar de $x = 40$ (es decir, aproximadamente $\log_2 10^6 = 19,93 \approx 20$ ciclos después de C_{q1} correspondientes a una proporción de 10^6 entre la concentración del primer y segundo analito respectivamente). Esto es una desventaja ya que se ha de ejecutar un número relativamente grande de ciclos para obtener un resultado cualitativo que reduzca el rendimiento del sistema de análisis. Otra desventaja es que el punto de intersección entre el nivel de umbral de CT y_1 y la curva de crecimiento 200.2 se puede producir después de la fase de crecimiento exponencial de la curva de crecimiento 200.2 donde el proceso de RNR está en su etapa de nivelación (es decir, la cantidad de ácido nucleico ya no se duplica en cada ciclo) dando lugar valores de C_q falsos. Esta situación se mejora usando la CTF que resulta de la combinación de y_1 e y_2 como el punto de intersección y, por lo tanto, C_q para la curva de crecimiento 200.2 se mueve a $x = 40$.

De forma alternativa, CTF(x) puede estar de acuerdo con la ecuación 6 o 7 anterior o puede ser otra función monótona o escalonada.

De acuerdo con los modos de realización de la invención, el nivel de umbral y_1 está de acuerdo con la ecuación 2, teniendo en cuenta por tanto el nivel de señal S de la línea de saturación en la fase de meseta, mientras que el nivel de umbral y_2 está de acuerdo con la ecuación 1, teniendo en cuenta el valor de intersección I en lugar de S.

La fig. 4 ilustra un modo de realización alternativo para la combinación de los umbrales y_1 e y_2 por medio de una combinación lineal, tal como

$CTF(x) = 0,5 y_1 + 0,5 y_2$ que es una constante y por tanto no existe transición de CTF en este caso, en el que el nivel de umbral y_1 es adecuado para ciclos de reacción tempranos de la RNR mientras que el nivel de umbral y_2 es adecuado para ciclos de reacción tardíos de la RNR, dando como resultado la combinación de estos una CTF adecuada en un intervalo de ciclo amplio. Por ejemplo, una elección adecuada de y_1 e y_2 es elegir y_1 e y_2 de modo que $y_1 > y_2$ como se ilustra en la fig. 4.

La CTF resultante se ilustra en la fig. 4 así como los números de ciclos de cuantificación C_q que se detectan por tanto para las curvas de crecimiento 200.1 y 200. 2.

La fig. 5 es ilustrativa de la ventana que sale en la pantalla 170 (véase la fig. 1) con una CTF que tiene una pendiente negativa para la detección de C_{q1} y C_{q2} similar al modo de realización de la fig. 3.

La fig. 6 ilustra otro modo de realización similar a los modos de realización de la fig. 3A y fig. 3B, donde el nivel de umbral inicial y_1 , estando RII de acuerdo con la ecuación 1 anterior, pasa linealmente de acuerdo con la ecuación 5 anterior al nivel de umbral final y_2 , estando PGT de acuerdo con la ecuación 2 anterior.

La fig. 7 es ilustrativa de un modo de realización donde la CTF tiene una pendiente positiva.

La fig. 8 ilustra la transición de las contribuciones de los umbrales y_1 e y_2 a CTF para una transición lineal, cuadrática ($p = 2$) y exponencial de acuerdo con las ecuaciones 5, 6 y 7, respectivamente.

La fig. 9 muestra las curvas de crecimiento 200.1 a 200.7 para una serie de diluciones donde la curva de crecimiento 200.1 se obtiene para la mayor concentración del analito y las curvas de crecimiento consecutivas 200.2, 200.3, etc. se obtienen para concentraciones decrecientes del analito donde la concentración de analito disminuye en un orden de magnitud de una curva de crecimiento a la siguiente, lo que ilustra el intervalo dinámico del analizador (véase el sistema RNR 100 de la fig. 1).

La fig. 10 es ilustrativa de los valores de C_q obtenidos a partir de las curvas de crecimiento 200.1 a 200.7 para tres casos:

i. la curva 300 muestra los valores de C_q que se obtienen cuando se usa un RII solo con $r = 50$ % de acuerdo con la ecuación 1.

ii. la curva 302 muestra los valores de C_q que se obtienen si se usa un PGT solo con $p = 0,1$ de acuerdo con la ecuación 2.

iii. Se obtiene la curva 304 cuando se usa una CTF que combina estos RII y PGT, por ejemplo, de acuerdo con la ecuación 5, 6 o 7, dando como resultado valores de C_q aproximadamente equidistantes para la serie de diluciones.

Como se puede observar en la figura 10, el uso de un procedimiento de CT estándar con una altura de umbral fija, por ejemplo, RII 0,5 da lugar a un retraso de C_q relativo para las curvas de concentración baja debido al incremento menos pronunciado. Por otra parte, el uso de un procedimiento CT relacionado con el crecimiento como PGT podría compensar en exceso el efecto de un crecimiento menos prominente por la detección temprana de los valores de C_q .

Los valores de C_q equidistantes que se obtienen en el caso anterior iii. reflejan la concentración relativa constante de los respectivos analitos correspondientes a las curvas de crecimiento consecuentes 200.1 a 200.7 (es decir, un orden de magnitud para curvas consecutivas) que se debe al hecho de que el punto de intersección de la CTF con las respectivas curvas de crecimiento está siempre dentro de la fase de crecimiento exponencial independientemente del grado de dilución del analito en un intervalo de concentración extremadamente amplio. Esto a su vez implica que la precisión de la determinación de C_q se incrementa sustancialmente en comparación con los casos anteriores i. y ii. debido al hecho de que la curva de crecimiento tiene la menor cantidad de ruido dentro de la fase de crecimiento exponencial y por tanto produce resultados más exactos.

La fig. 11 muestra las curvas de calibración de los datos de la fig. 10 si el RII o el PGT se usa solo así como para la curva de CTF combinada que proporciona una curva de calibración lineal casi perfecta como es evidente de la fig. 11. Si se usa un procedimiento de umbral único tal como RII o PGT solo, hay una desviación significativa de la curva de calibración de la ley lineal teórica que relaciona el valor de C_q con la concentración de analito inicial de la muestra en una escala logarítmica como es evidente de la fig. 11.

La fig. 12 muestra tres curvas de crecimiento 200.1, 200.2 y 200.3 para la misma concentración del analito pero diferentes concentraciones de una sustancia de interferencia que afecta la reacción RNR.

La fig. 13 muestra los valores de c_q resultantes que se obtienen para las curvas de crecimiento 200.1 a 200.3 de la fig. 12 si se usa un procedimiento de umbral plano de RII y cuando se usa una CTF con una pendiente negativa tal como de acuerdo con las ecuaciones 5, 6 o 7.

Como es evidente de la fig. 13, los valores de C_q obtenidos para las tres curvas de crecimiento 200.1, 200.2 y 200.3 varían entre 30 y 32 si se usa el procedimiento de umbral de RII solo lo que da como resultado un respectivo error grande. Por el contrario, como también se ilustra en la fig.13, los valores de C_q obtenidos para estas curvas usando la CTF con pendiente negativa dan como resultado valores de C_q casi idénticos para las tres curvas, mejorando enormemente por tanto la precisión incluso si están presentes diversas concentraciones de sustancias de interferencia en la muestra. Esto también se ilustra en la fig. 14, que muestra los valores de c_q de concentraciones de muestra idénticos en función de la concentración interferente.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de análisis para una reacción de amplificación de ácido nucleico ultrarrápida RNR, comprendiendo el procedimiento:

- adquirir una intensidad de una emisión de fluorescencia de un analito para cada ciclo de reacción de amplificación de la RNR;

- crear una curva de crecimiento (200) indicativa de la intensidad de la emisión de fluorescencia en un intervalo de ciclo de RNR,

- calcular una función de umbral combinada (CTF) en el intervalo de ciclo de RNR que comprende al menos dos niveles de umbral diferentes, en el que la función de umbral combinada (CTF) es dependiente del número de ciclos de la RNR, pasando la función de umbral combinada (CTF) de un nivel de umbral inicial (y_1) a un nivel de umbral final (y_2), siendo el nivel de umbral inicial (y_1) diferente del nivel de umbral final (y_2),

siendo el nivel de umbral inicial (y_1) $B + r \times I$, en el que B es una función de referencia, siendo el valor de referencia la parte inicial de la curva de crecimiento que no muestra incremento de señal, r es un parámetro de porcentaje positivo e I es una extrapolación de intersección al número de ciclos 0,

siendo el nivel de umbral final (y_2) $y(x) = B + p \cdot G = B + p \cdot (S - B)$, en el que B es la función de referencia, S es la línea de saturación de la curva de crecimiento, G es el crecimiento del valor de referencia a la línea de saturación, y p es un parámetro entre un 0 % y un 100 %,

en el que el nivel de umbral inicial (y_1) está por encima del nivel de umbral final (y_2),

en el que la función de umbral combinada se selecciona de un grupo de tres funciones que comprenden:

i. una CTF con una transición lineal del nivel de umbral inicial (y_1) al nivel de umbral final (y_2) de acuerdo con: $CTF(x) = y_1 + (y_2 - y_1) \cdot \frac{x - x_1}{x_2 - x_1}$, donde x_1 es un número de ciclos de reacción tempranos igual a 0 o 1, x_2 es un número de ciclos de reacción tardíos mayor que 30, y_1 es el nivel de umbral inicial, y_2 es el nivel de umbral final.

ii. una CTF con una transición polinómica del nivel de umbral inicial (y_1) al nivel de umbral final (y_2) de acuerdo con: $CTF(x) = y_1 + (y_2 - y_1) \cdot \left(\frac{x - x_1}{x_2 - x_1}\right)^p$, donde p es un orden polinómico fijo, en la que p es 2 para una función polinómica cuadrática;

iii. una CTF con una transición exponencial del nivel de umbral inicial (y_1) al nivel de umbral final (y_2) de acuerdo con $CTF(x) = e^{\frac{x_2 \ln(y_1) - x_1 \ln(y_2)}{x_2 - x_1} \cdot \left(\frac{y_2}{y_1}\right)^{\frac{x}{x_2 - x_1}}}$,

- determinar un número de ciclos de cuantificación (Cq) de la RNR, siendo el número de ciclos de cuantificación (Cq) indicativo de un resultado de análisis cuantitativo y/o cualitativo de la curva de crecimiento (200) como el número de ciclos correspondiente a una intersección de la curva de crecimiento (200) con la función de umbral combinada (CTF).

2. El procedimiento de análisis de acuerdo con la reivindicación 1, en el que:

- el nivel de umbral inicial (y_1) comprende al menos un procedimiento adecuado para ciclos de reacción tempranos de la RNR; y/o

- el nivel de umbral final (y_2) comprende al menos un procedimiento adecuado para ciclos de reacción tardíos de la RNR.

3. El procedimiento de análisis de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que:

- el nivel de umbral inicial (y_1) tiene un punto de partida (T_1) con una coordenada y por encima de una coordenada y de un punto final (T_2) del nivel de umbral final (y_2) dando como resultado una función de umbral combinada (CTF) decreciente.

4. El procedimiento de análisis de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la combinación comprende al menos un nivel de umbral adecuado para ciclos de reacción tempranos de la RNR y al menos un nivel de umbral adecuado para ciclos de reacción tardíos de la RNR.

5. El procedimiento de análisis de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, en el que la reacción

de amplificación de ácido nucleico ultrarrápida RNR es una reacción en cadena de la polimerasa PCR ultrarrápida.

6. Un sistema para analizar una reacción de amplificación de ácido nucleico ultrarrápida RNR de un analito, comprendiendo dicho sistema:

- un sistema de detección (130) configurado para adquirir una intensidad de una emisión de fluorescencia del analito para cada ciclo de reacción de amplificación de la RNR;

- una unidad de procesamiento (145) configurada para:

• crear una curva de crecimiento (200) indicativa de la intensidad de la emisión de fluorescencia en un intervalo de ciclo de reacción de la RNR;

- proporcionar una función de umbral combinada (CTF) en el intervalo de ciclo de RNR que comprende al menos dos niveles de umbral diferentes, en el que la función de umbral combinada (CTF) es dependiente del número de ciclos de la RNR, pasando la función de umbral combinada (CTF) de un nivel de umbral inicial (y1) a un nivel de umbral final (y2), siendo el nivel de umbral inicial (y1) diferente del nivel de umbral final (y2),

siendo el nivel de umbral **inicial (y1)** $B + r \times I$, en el que B es una función de referencia, siendo el valor de referencia la parte inicial de la curva de crecimiento que no muestra incremento de señal, r es un parámetro de porcentaje positivo e I es una extrapolación de intersección al número de ciclos 0,

siendo el nivel de umbral **final (y2)** $y(x) = B + p \cdot G = B + p \cdot (S - B)$, en el que B es la función de referencia, S es la línea de saturación de la curva de crecimiento, G es el crecimiento del valor de referencia a la línea de saturación, y p es un parámetro entre un 0 % y un 100 %,

en el que el nivel de umbral inicial (y1) está por encima del nivel de umbral final (y2),

- en el que la función de umbral combinada se selecciona de un grupo de tres funciones que comprenden:

i. una CTF con una transición lineal del nivel de umbral inicial (y1) al nivel de umbral final (y2) de acuerdo con: $CTF(x) = y_1 + (y_2 - y_1) \cdot \frac{x - x_1}{x_2 - x_1}$, donde x1 es un número de ciclos de reacción tempranos igual a 0 o 1, x2 es un número de ciclos de reacción tardíos mayor que 30, y1 es el nivel de umbral inicial, y2 es el nivel de umbral final.

ii. una CTF con una transición polinómica del nivel de umbral inicial (y1) al nivel de umbral final (y2) de acuerdo con: $CTF(x) = y_1 + (y_2 - y_1) \cdot \left(\frac{x - x_1}{x_2 - x_1}\right)^p$, donde p es un orden polinómico fijo, en la que p es 2 para una función polinómica cuadrática;

iii. una CTF con una transición exponencial del nivel de umbral inicial (y1) al nivel de umbral final (y2) de acuerdo con $CTF(x) = e^{\frac{x_2 \ln(y_1) - x_1 \ln(y_2)}{x_2 - x_1}} \cdot \left(\frac{y_2}{y_1}\right)^{\frac{x}{x_2 - x_1}}$, y

• determinar un número de ciclos de cuantificación (Cq) de la RNR, siendo el número de ciclos de cuantificación (Cq) indicativo de un resultado de análisis cuantitativo y/o cualitativo de la curva de crecimiento (200) como el número de ciclos correspondiente a una intersección de la curva de crecimiento (200) con la función de umbral combinada (CTF).

7. El sistema de la reivindicación 6, en el que la función de umbral combinada (CTF) se proporciona por la unidad de procesamiento leyendo datos y/o instrucción/instrucciones de una memoria electrónica del sistema que es descriptiva de la función de umbral combinada (CTF) y/o calculando la función de umbral combinada (CTF).

8. El sistema de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, en el que la reacción de amplificación de ácido nucleico ultrarrápida RNR es una reacción en cadena de la polimerasa PCR ultrarrápida.

9. Un procedimiento de análisis para una reacción de amplificación de ácido nucleico ultrarrápida RNR, comprendiendo el procedimiento:

- adquirir una intensidad de una emisión de fluorescencia de un analito para cada ciclo de reacción de amplificación de la RNR;

- crear una curva de crecimiento (200) indicativa de la intensidad de la emisión de fluorescencia en un intervalo de ciclo de RNR,

- calcular una función de umbral combinada (CTF) en el intervalo de ciclo de RNR que comprende al menos dos niveles de umbral diferentes, en el que la función de umbral combinada (CTF) es dependiente del número de ciclos de la RNR, pasando la función de umbral combinada (CTF) de un nivel de umbral inicial (y_1) a un nivel de umbral final (y_2), siendo el nivel de umbral inicial (y_1) diferente del nivel de umbral final (y_2),

siendo el nivel de umbral inicial (y_1) $B + r \times I$, en el que B es una función de referencia, siendo el valor de referencia la parte inicial de la curva de crecimiento que no muestra incremento de señal, r es un parámetro de porcentaje positivo e I es una extrapolación de intersección al número de ciclos 0,

siendo el nivel de umbral final (y_2) $y(x) = B + p \cdot G = B + p \cdot (S - B)$, en el que B es la función de referencia, S es la línea de saturación de la curva de crecimiento, G es el crecimiento del valor de referencia a la línea de saturación, y p es un parámetro entre un 0 % y un 100 %,

en el que el nivel de umbral inicial (y_1) está por debajo del nivel de umbral final (y_2),

en el que la función de umbral combinada se selecciona de un grupo de tres funciones que comprenden:

i. una CTF con una transición lineal del nivel de umbral inicial (y_1) al nivel de umbral final (y_2) de acuerdo con: $CTF(x) = y_1 + (y_2 - y_1) \cdot \frac{x - x_1}{x_2 - x_1}$, donde x_1 es un número de ciclos de reacción tempranos igual a 0 o 1, x_2 es un número de ciclos de reacción tardíos mayor que 30, y_1 es el nivel de umbral inicial, y_2 es el nivel de umbral final.

ii. una CTF con una transición polinómica del nivel de umbral inicial (y_1) al nivel de umbral final (y_2) de acuerdo con: $CTF(x) = y_1 + (y_2 - y_1) \cdot \left(\frac{x - x_1}{x_2 - x_1}\right)^p$, donde p es un orden polinómico fijo, en la que p es 2 para una función polinómica cuadrática;

iii. una CTF con una transición exponencial del nivel de umbral inicial (y_1) al nivel de umbral final (y_2) de acuerdo con $CTF(x) = e^{\frac{x_2 \ln(y_1) - x_1 \ln(y_2)}{x_2 - x_1}} \cdot \left(\frac{y_2}{y_1}\right)^{\frac{x}{x_2 - x_1}}$,

- determinar un número de ciclos de cuantificación (Cq) de la RNR, siendo el número de ciclos de cuantificación (Cq) indicativo de un resultado de análisis cuantitativo y/o cualitativo de la curva de crecimiento (200) como el número de ciclos correspondiente a una intersección de la curva de crecimiento (200) con la función de umbral combinada (CTF).

10. Un sistema para analizar una reacción de amplificación de ácido nucleico ultrarrápida RNR de un analito, comprendiendo dicho sistema:

- un sistema de detección (130) configurado para adquirir una intensidad de una emisión de fluorescencia del analito para cada ciclo de reacción de amplificación de la RNR;

- una unidad de procesamiento (145) configurada para:

• crear una curva de crecimiento (200) indicativa de la intensidad de la emisión de fluorescencia en un intervalo de ciclo de reacción de la RNR;

- proporcionar una función de umbral combinada (CTF) en el intervalo de ciclo de RNR que comprende al menos dos niveles de umbral diferentes, en el que la función de umbral combinada (CTF) es dependiente del número de ciclos de la RNR, pasando la función de umbral combinada (CTF) de un nivel de umbral inicial (y_1) a un nivel de umbral final (y_2), siendo el nivel de umbral inicial (y_1) diferente del nivel de umbral final (y_2),

siendo el nivel de umbral inicial (y_1) $B + r \times I$, en el que B es una función de referencia, siendo el valor de referencia la parte inicial de la curva de crecimiento que no muestra incremento de señal, r es un parámetro de porcentaje positivo e I es una extrapolación de intersección al número de ciclos 0,

siendo el nivel de umbral final (y_2) $y(x) = B + p \cdot G = B + p \cdot (S - B)$, en el que B es la función de referencia, S es la línea de saturación de la curva de crecimiento, G es el crecimiento del valor de referencia a la línea de saturación, y p es un parámetro entre un 0 % y un 100 %,

en el que el nivel de umbral inicial (y_1) está por **debajo** del nivel de umbral final (y_2),

- en el que la función de umbral combinada se selecciona de un grupo de tres funciones que comprenden:

i. una CTF con una transición lineal del nivel de umbral inicial (y_1) al nivel de umbral final (y_2) de acuerdo con:

$CTF(x) = y_1 + (y_2 - y_1) \cdot \frac{x-x_1}{x_2-x_1}$, donde x_1 es un número de ciclos de reacción tempranos igual a 0 o 1, x_2 es un número de ciclos de reacción tardíos mayor que 30, y_1 es el nivel de umbral inicial, y_2 es el nivel de umbral final.

5 ii. una CTF con una transición polinómica del nivel de umbral inicial (y_1) al nivel de umbral final (y_2) de acuerdo con: $CTF(x) = y_1 + (y_2 - y_1) \cdot \left(\frac{x-x_1}{x_2-x_1}\right)^p$, donde p es un orden polinómico fijo, en la que p es 2 para una función polinómica cuadrática;

10 iv. una CTF con una transición exponencial del nivel de umbral inicial (y_1) al nivel de umbral final (y_2) de acuerdo con $CTF(x) = e^{\frac{x_2 \ln(y_1) - x_1 \ln(y_2)}{x_2 - x_1}} \cdot \left(\frac{y_2}{y_1}\right)^{\frac{x}{x_2 - x_1}}$, y

15 • determinar un número de ciclos de cuantificación (C_q) de la RNR, siendo el número de ciclos de cuantificación (C_q) indicativo de un resultado de análisis cuantitativo y/o cualitativo de la curva de crecimiento (200) como el número de ciclos correspondiente a una intersección de la curva de crecimiento (200) con la función de umbral combinada (CTF).

Fig. 1

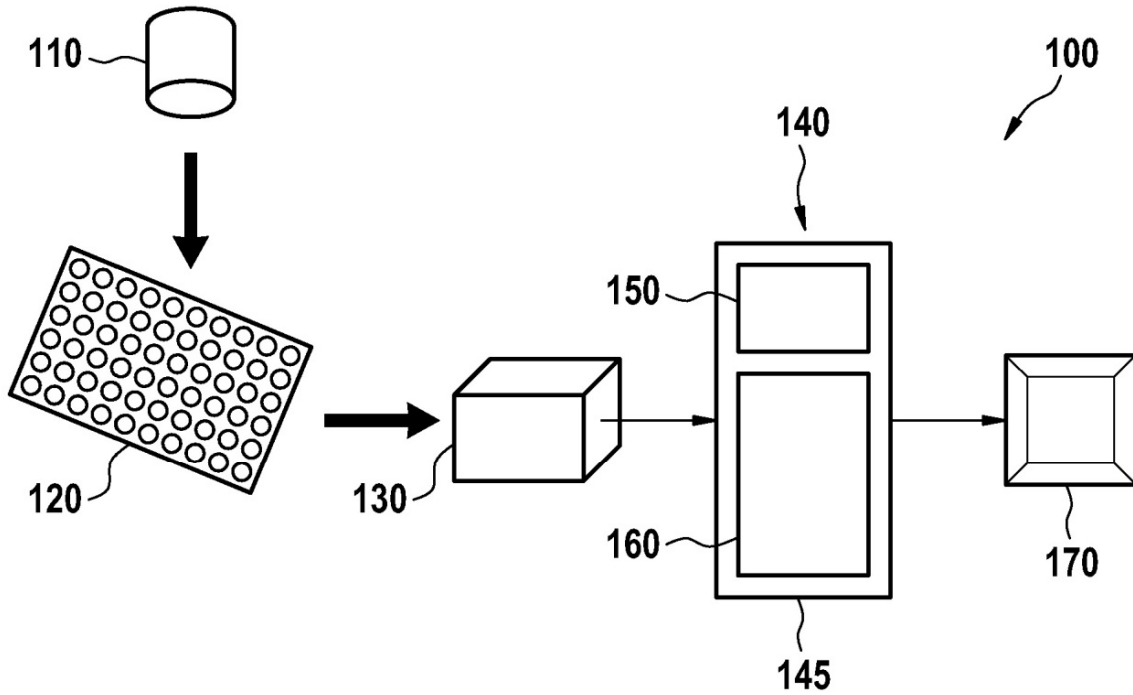


Fig. 2

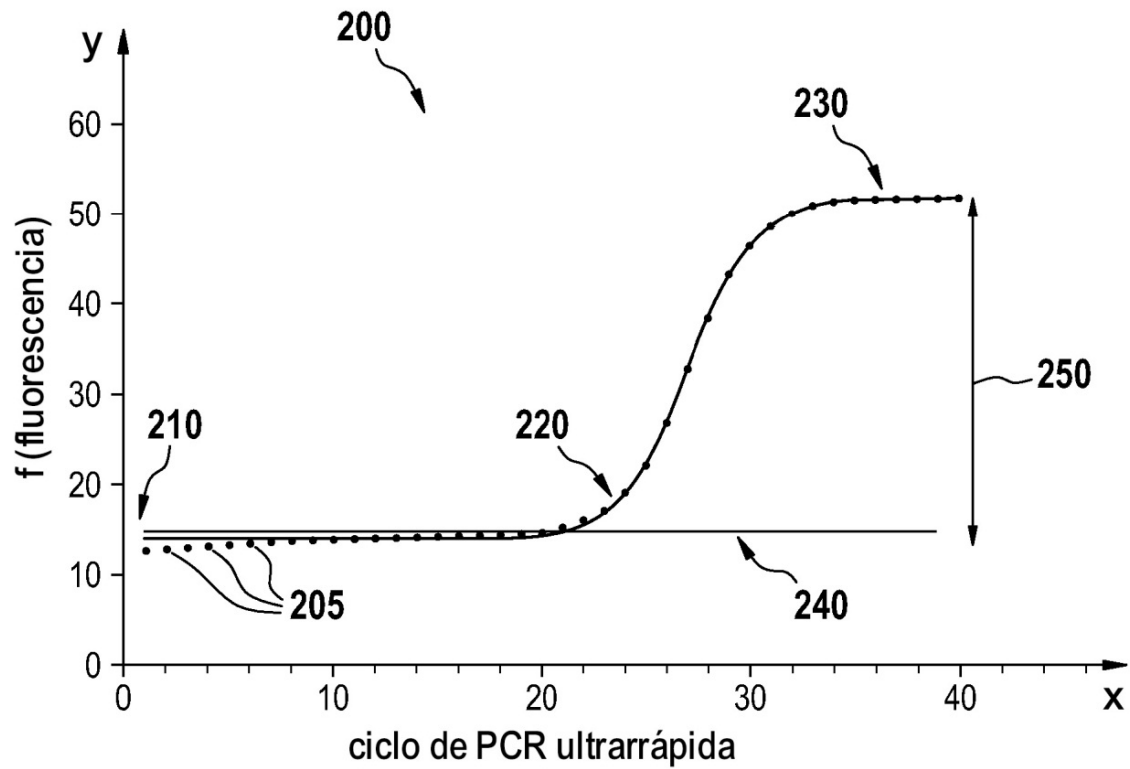


Fig. 3A

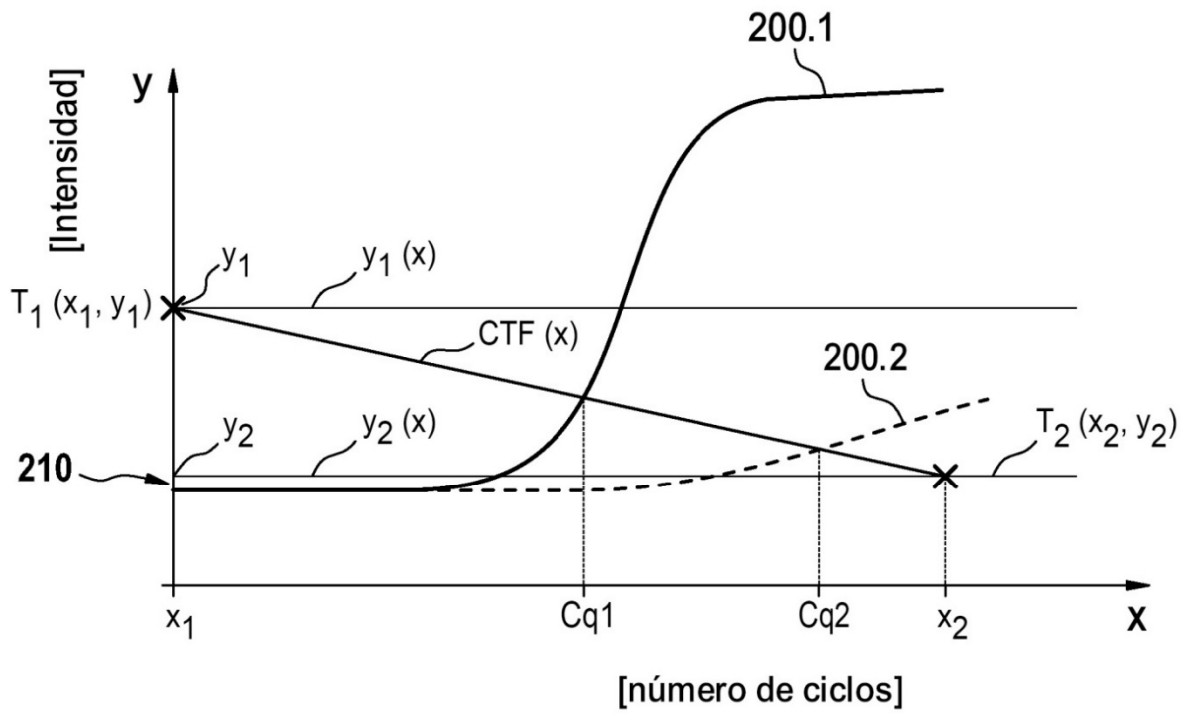


Fig. 3B

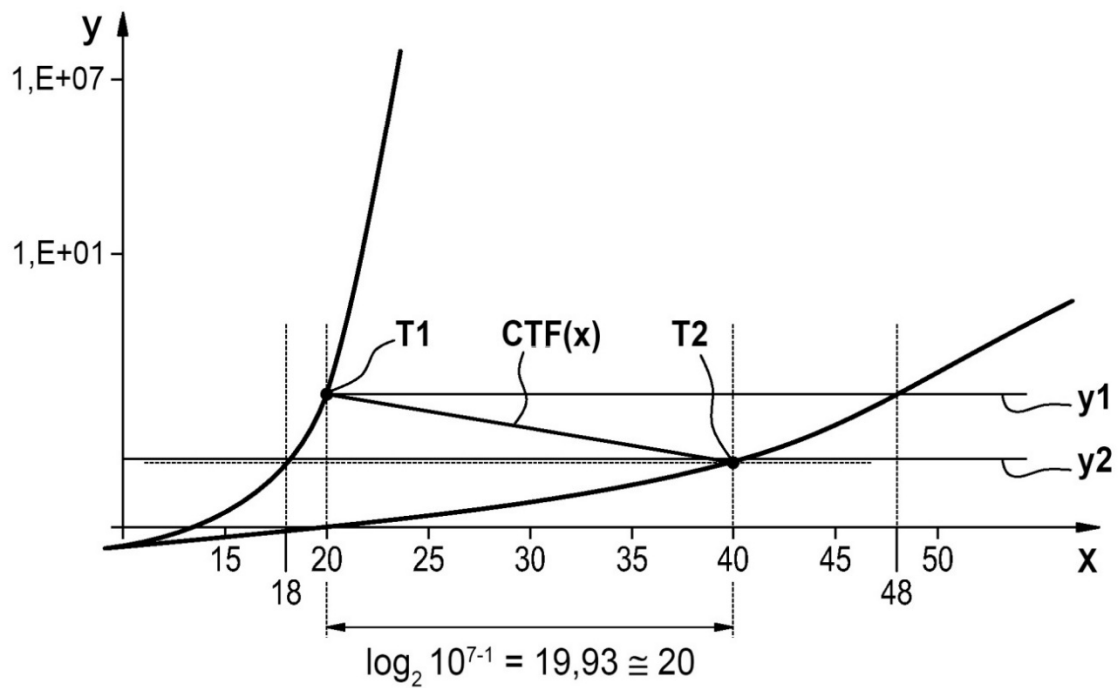


Fig. 4

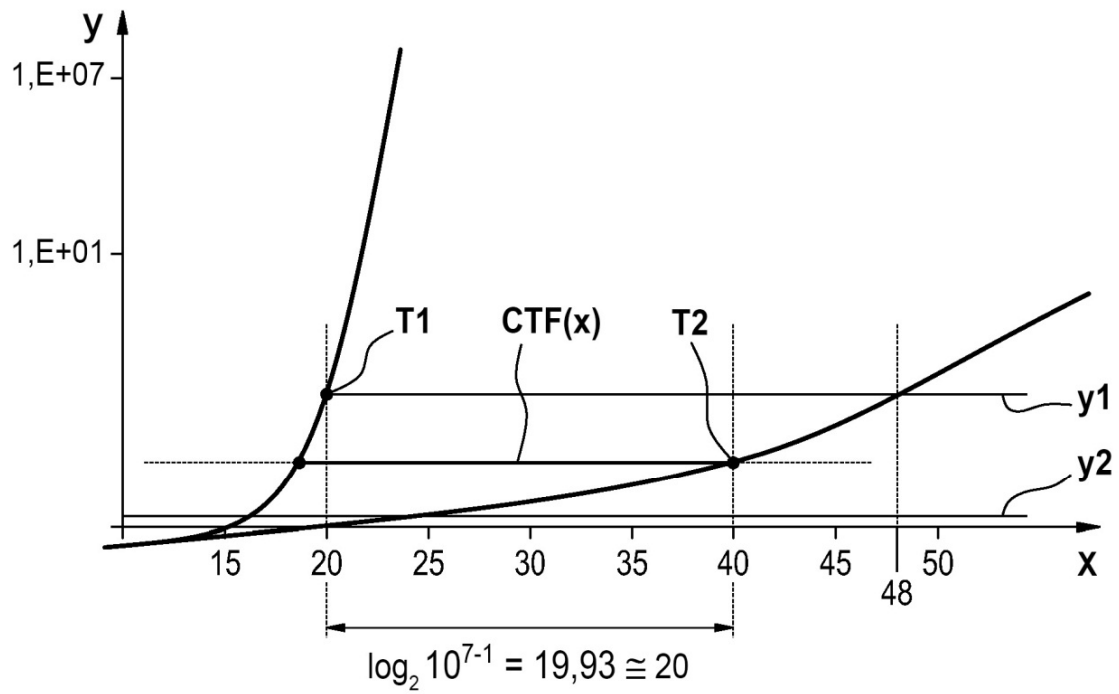


Fig. 5

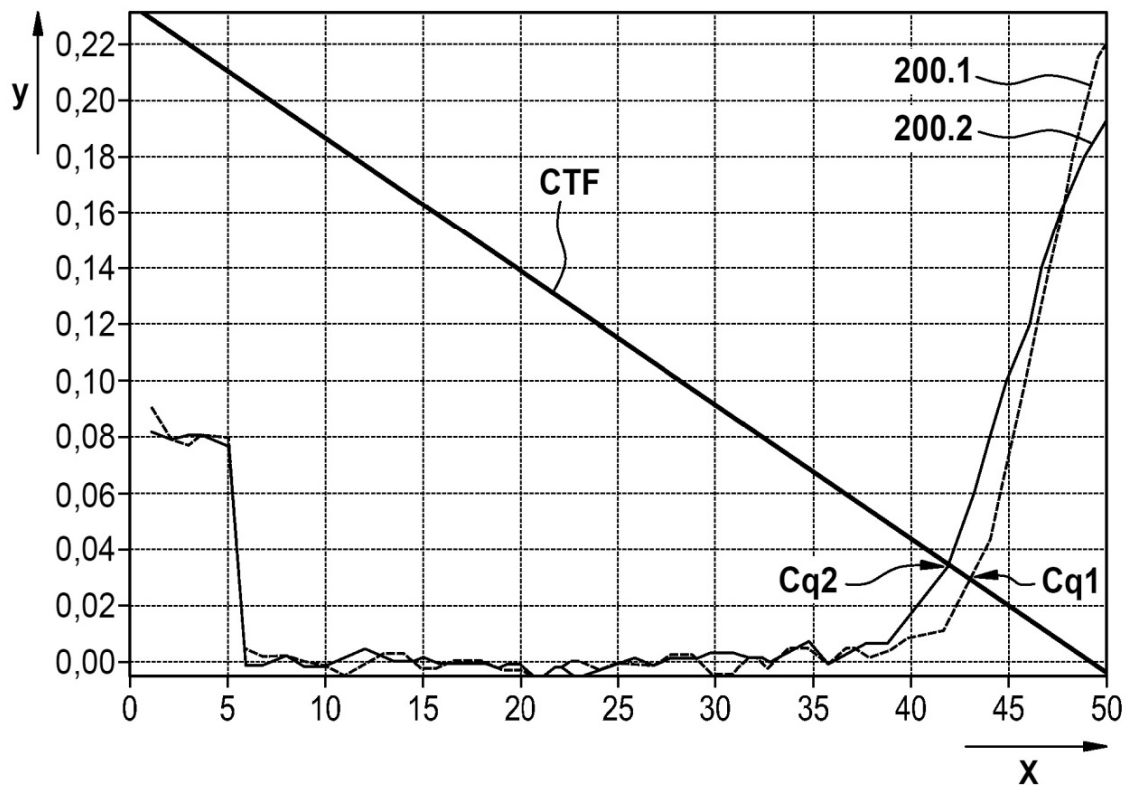


Fig. 6

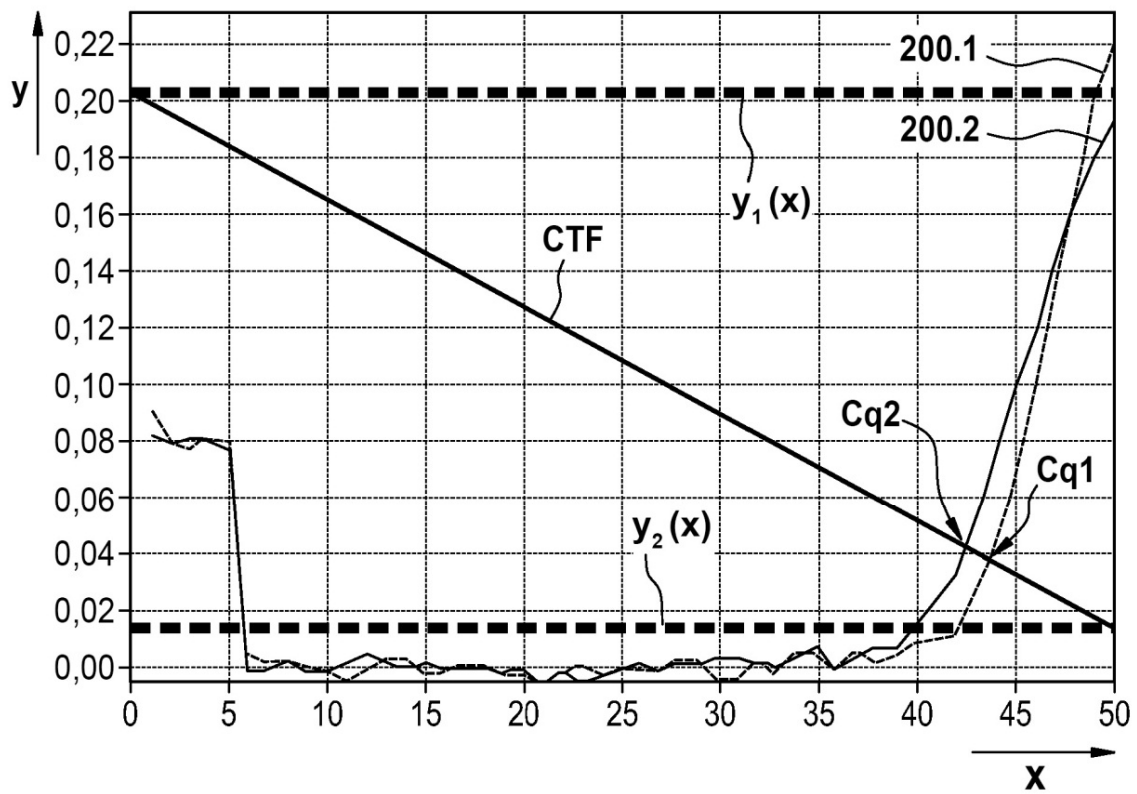


Fig. 7

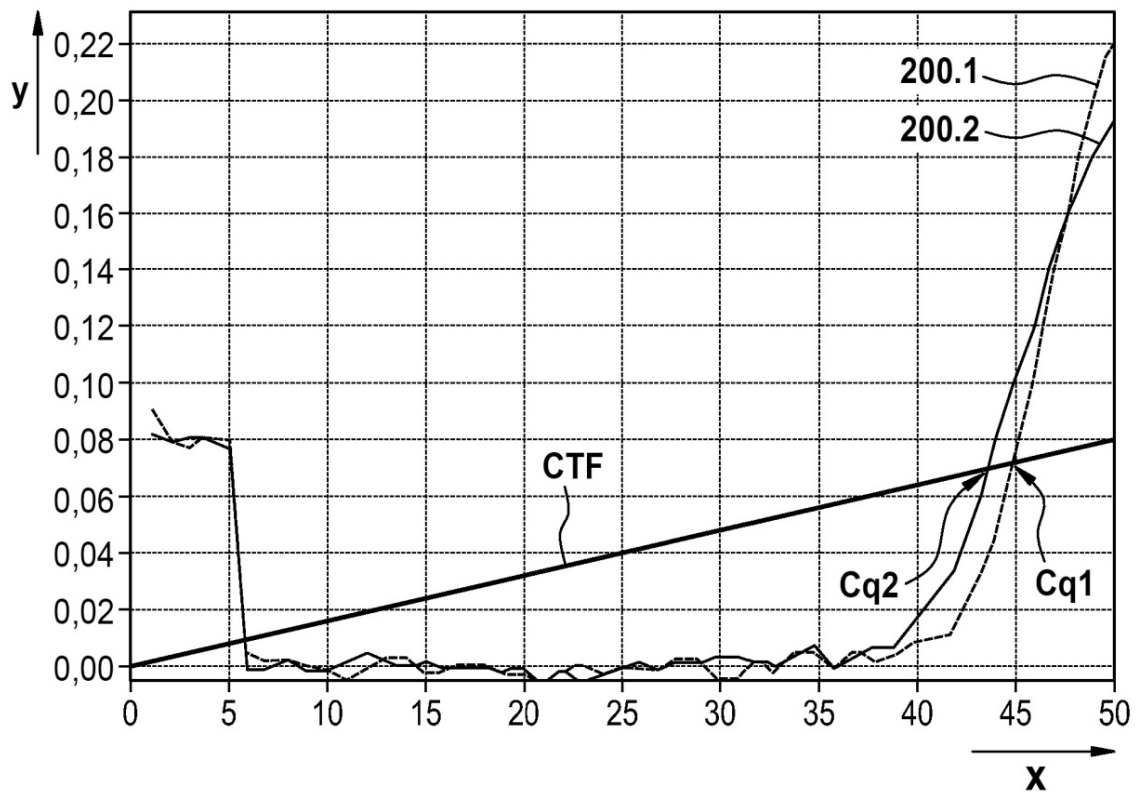


Fig. 8

Funciones de transición

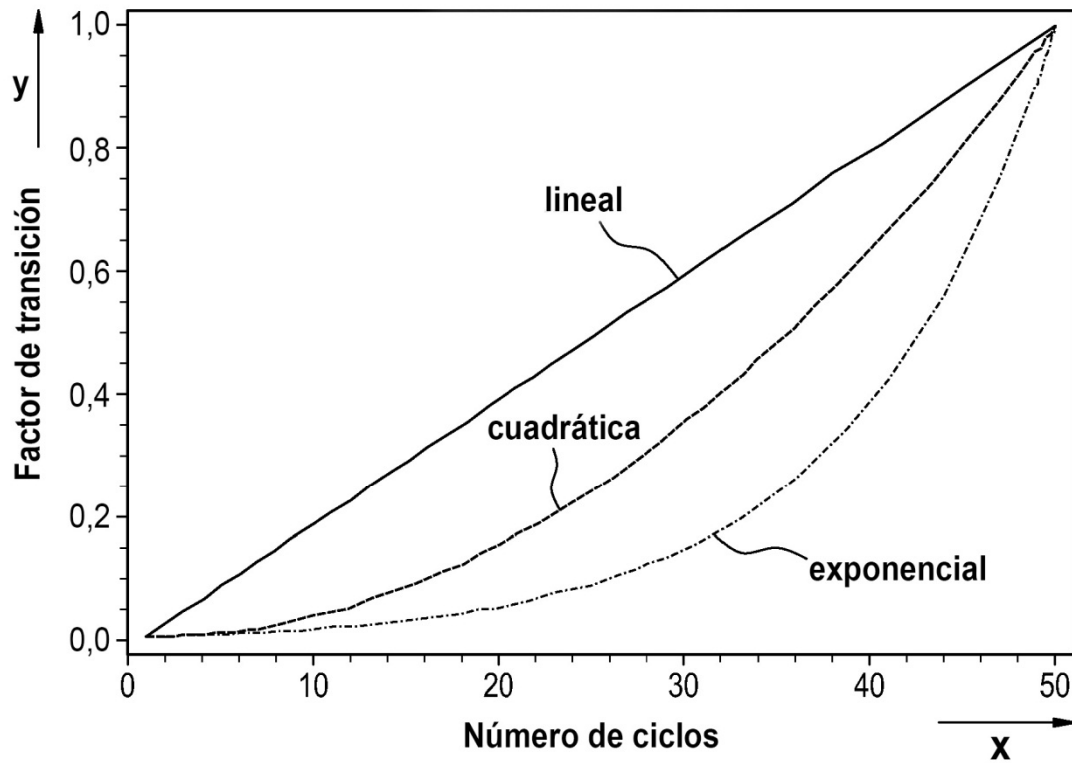


Fig. 9

Curvas de crecimiento de la serie de diluciones

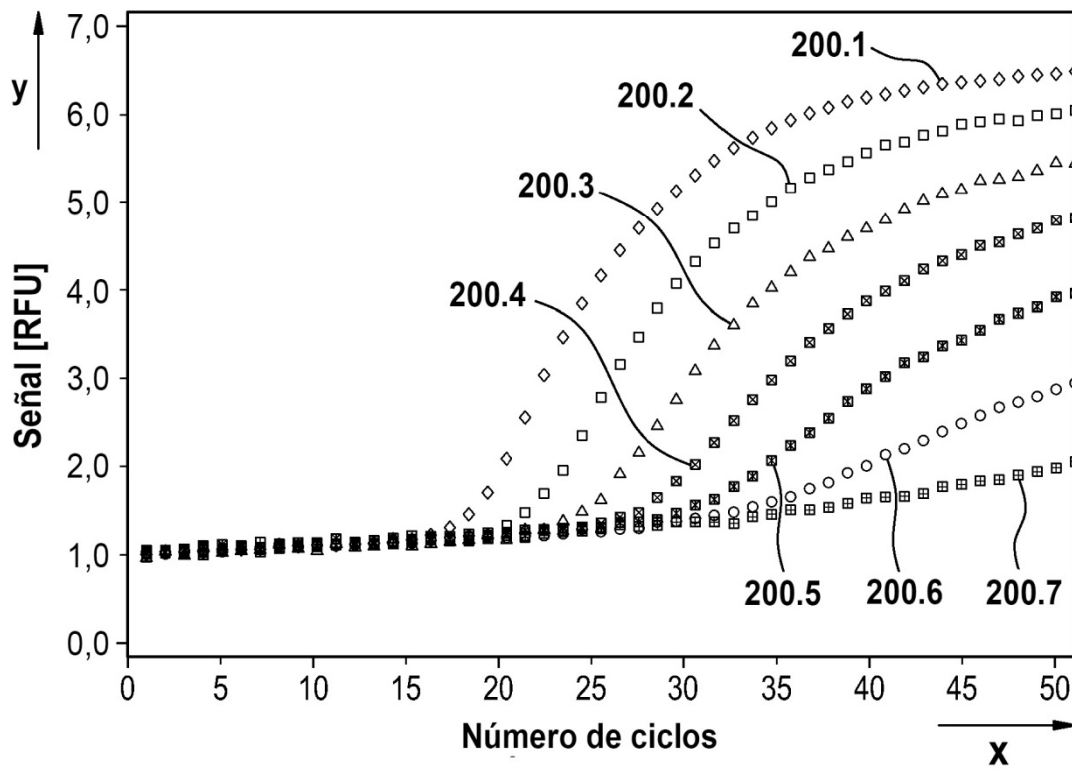


Fig. 10

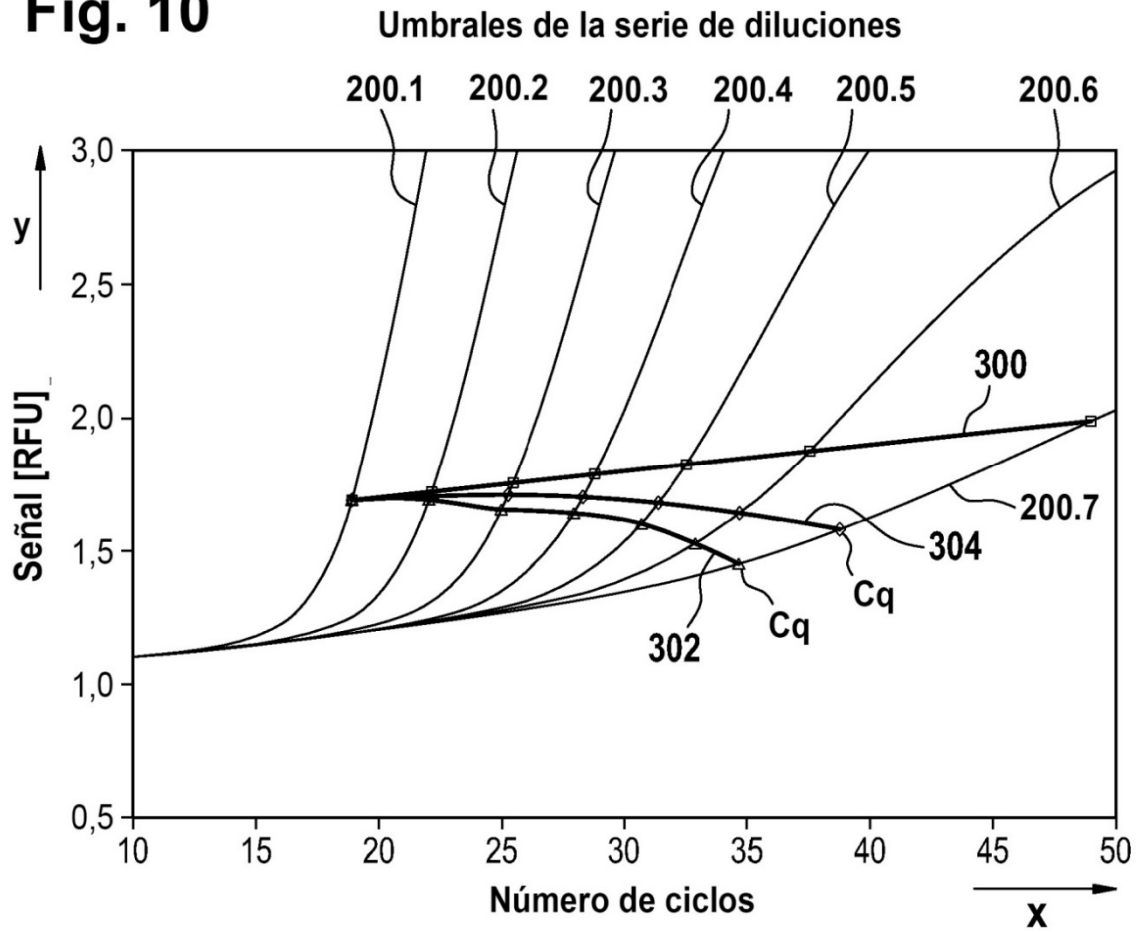
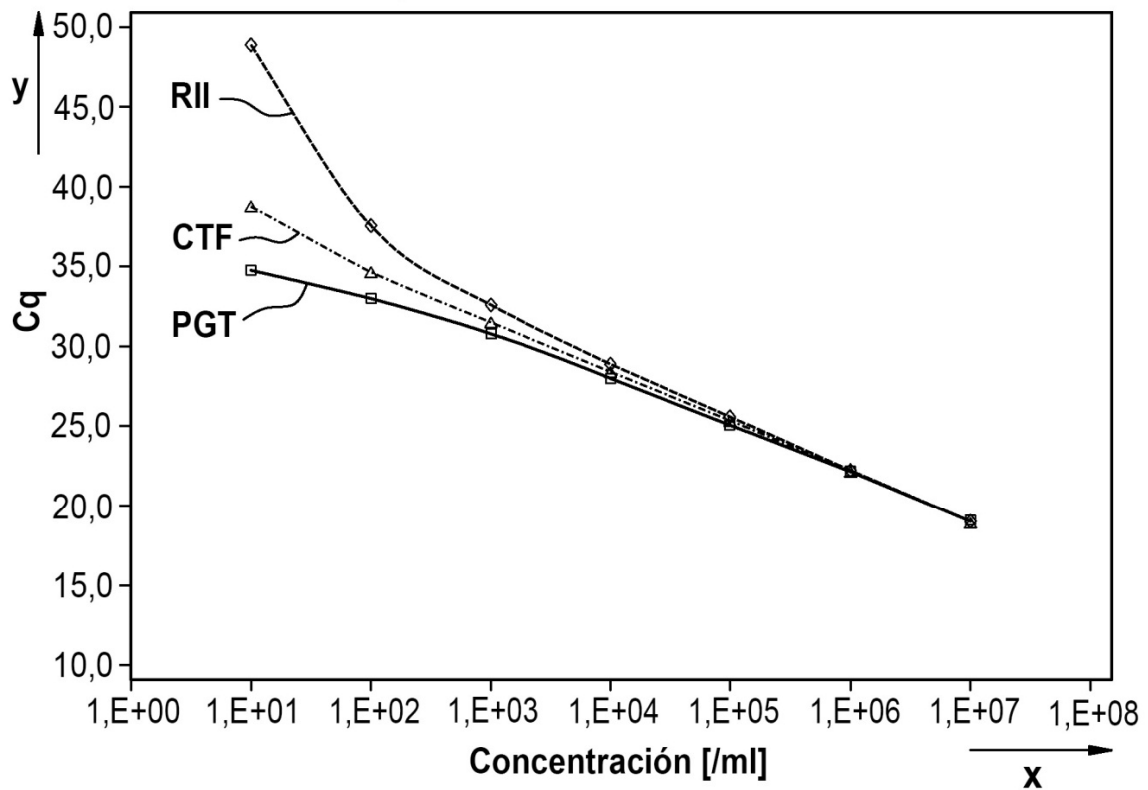


Fig. 11

Cq en función de la concentración

**Fig. 12**

Curvas de crecimiento de interferencias

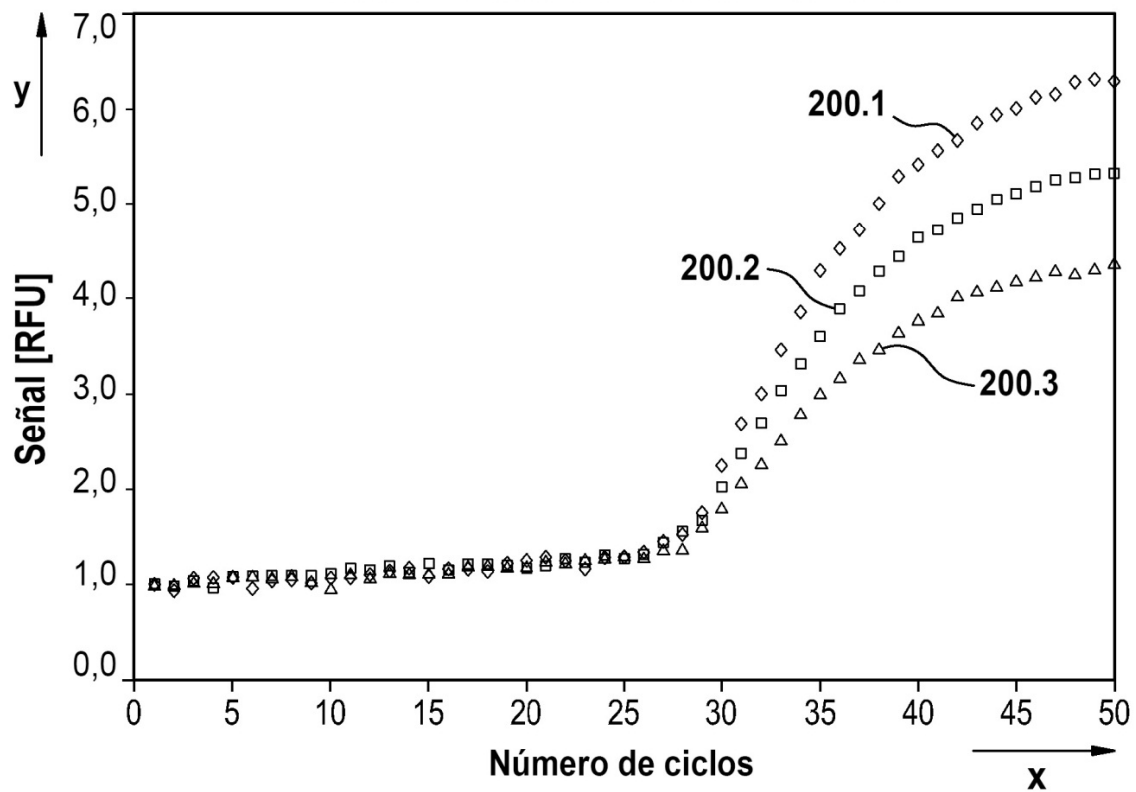


Fig. 13

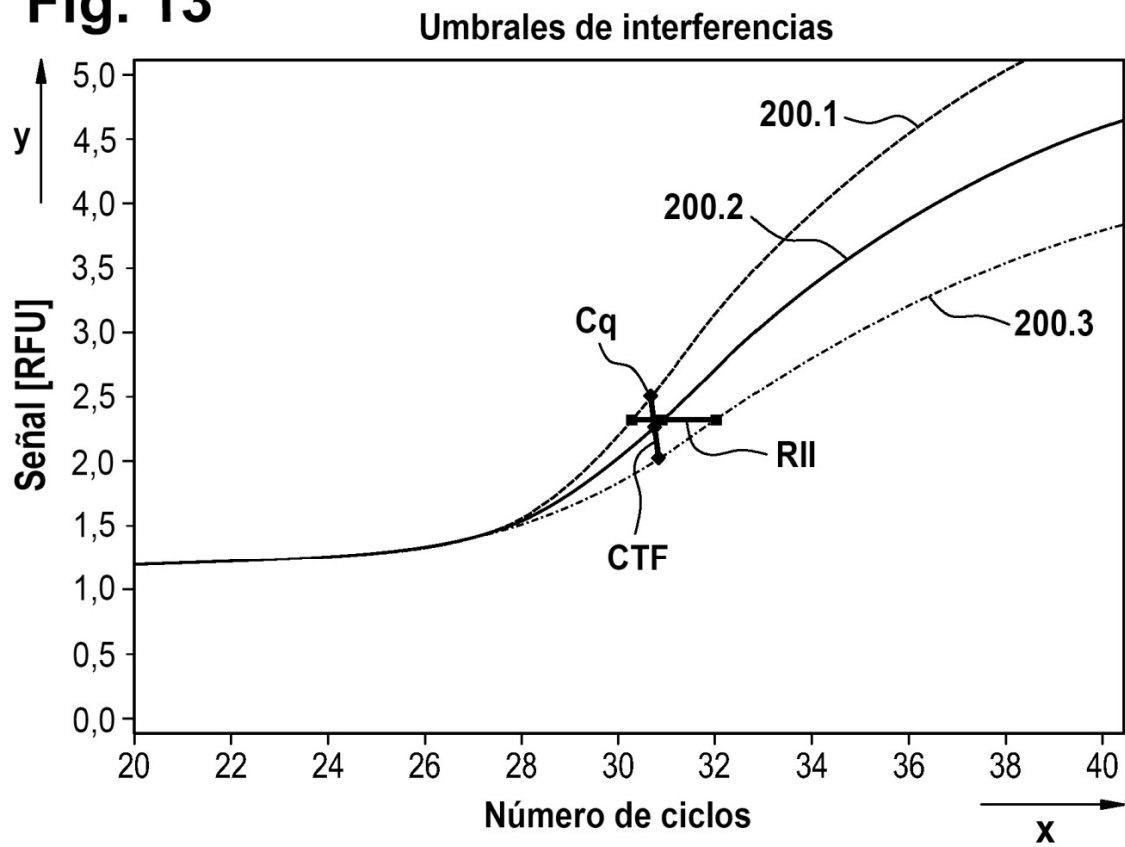


Fig. 14

