



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 319 937**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/70 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
C12N 7/00 (2006.01)
C07H 21/00 (2006.01)
A61B 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **98910143 .1**
96 Fecha de presentación : **06.01.1998**
97 Número de publicación de la solicitud: **0975810**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.02.2000**

54 Título: **Método destinado al análisis por PCR de muestras de grupos sanguíneos.**

30 Prioridad: **06.01.1997 US 778610**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
14.05.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
14.05.2009

73 Titular/es: **ALPHA THERAPEUTIC CORPORATION**
5555 Valley Boulevard
Los Angeles, California 90032, US

72 Inventor/es: **Peddada, Lorraine, B.;**
Heldebrant, Charles, M. y
Conrad, Andrew, J.

74 Agente: **Gil Vega, Víctor**

ES 2 319 937 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

Método destinado al análisis por PCR de muestras de grupos sanguíneos.

5 Referencia a solicitudes relacionadas

La presente solicitud es una continuación de la solicitud 08/683.784 presentada el 16 de julio de 1996, que su vez es una solicitud divisional de la 08/419.620 presentada el 10 de abril de 1995.

10 Campo y antecedentes de la invención

La presente invención se refiere en general a sistemas y procesos para preparar y analizar muestras tomadas de donaciones de plasma a fin de identificar únicamente donaciones contaminadas con virus. En concreto, la invención se refiere a un aparato y a un proceso para formar recipientes individuales, cerrados herméticamente por separado y conectados que contienen muestras del mismo plasma que el de la donación. La invención también se refiere a un aparato y a un proceso para formar unos primeros reservorios comunes de análisis colectivo a partir de los recipientes y analizar los reservorios comunes para detectar la presencia de virus de acuerdo con un algoritmo a fin de identificar donaciones contaminadas individuales en el menor número de ciclos de análisis.

Los programas de donación de sangre, plasma y fluidos biológicos son las primeras fases esenciales en la fabricación de productos farmacéuticos y sanguíneos que mejoran la calidad de vida y se usan para salvar vidas en varias situaciones traumáticas. Tales productos se usan para el tratamiento de desórdenes inmunológicos, para el tratamiento de hemofilia, y también para mantener y restablecer el volumen de sangre en procesos quirúrgicos y en otros protocolos de tratamiento. Los usos terapéuticos de la sangre, el plasma y los fluidos biológicos necesitan que las donaciones de estos materiales tengan la menor contaminación viral posible. Normalmente, se analiza serológicamente una muestra de análisis de cada donación individual de sangre, plasma u otro fluido para detectar varios anticuerpos, que se obtienen en respuesta a virus específicos, tales como la hepatitis C (HCV) y dos formas del virus de inmunodeficiencia humano (HIV-1 y HIV-2). Además, la muestra de análisis serológico puede analizarse para detectar antígenos de virus específicos tales como la hepatitis B (HBV), y anticuerpos que se obtienen en respuesta a tales virus. Si la muestra es serológicamente positiva para la presencia de anticuerpos específicos o antígenos específicos, la donación se excluye para otros usos.

Aunque se piensa que un análisis de antígenos para detectar determinados virus, tales como la hepatitis B, está estrechamente relacionado con una infectividad, los análisis de anticuerpos no lo están. Se sabe desde hace mucho tiempo que un donante de plasma sanguíneo puede, de hecho, estar infectado con un virus aunque la muestra sea serológicamente negativa para la presencia de anticuerpos relacionados con ese virus. Por ejemplo, existe un periodo de ventana entre el tiempo en el que un donante puede llegar a infectarse con un virus y la aparición de anticuerpos, provocados en respuesta a ese virus, en el sistema del donante. El periodo de tiempo entre la primera aparición de un virus en la sangre y la presencia de anticuerpos detectables provocados en respuesta a ese virus se conoce como "periodo de ventana". En el caso del HIV, el periodo de ventana medio es de aproximadamente 22 días, mientras que para el HCV, el periodo de ventana medio se ha estimado en aproximadamente 98 días. Por tanto, los análisis destinados a la detección de anticuerpos pueden proporcionar una indicación falsa para un donante infectado si se realiza durante el periodo de ventana, es decir, el periodo entre la infección viral y la producción de anticuerpos. Además, incluso aunque los análisis convencionales para detectar la presencia de HBV incluyen análisis de anticuerpos y de antígenos, los análisis realizados con métodos más sensibles han confirmado la presencia de virus HBV en muestras que eran negativas en el análisis de antígenos HBV.

Un método de análisis de donaciones, que ha superado análisis disponibles de anticuerpos y antígenos, para asegurar también que está libre de contaminación viral incipiente, implica analizar las donaciones mediante un método de reacción en cadena de polimerasa (PCR). El PCR es un método altamente sensible para detectar la presencia de secuencias de ADN o ARN específicas relacionadas con un virus de interés en un material biológico amplificando el genoma viral. Como el análisis por PCR está destinado a detectar la presencia de un componente esencial del mismo virus, su presencia en un donante puede encontrarse casi inmediatamente después de la infección. Por tanto en teoría, no hay periodo de ventana durante el cual un análisis puede dar una indicación falsa de que no hay infectividad. Una descripción adecuada de la metodología y la aplicación práctica del análisis por PCR se encuentra en la patente U.S. 5.176.995.

Sin embargo, el análisis por PCR es muy caro y como la población general de donantes incluye un número relativamente pequeño de donantes positivos al PCR, el análisis individual de cada donación no es rentable o viable desde el punto de vista económico. De ahí que se necesite un método efectivo y rentable para analizar un gran número de donaciones de sangre y plasma a fin de eliminar unidades que sobrepasen un nivel predeterminado de contaminación viral.

Un método para analizar un gran número de donaciones de plasma consiste en agrupar por separado varias donaciones de plasma. El reservorio común se analiza después por PCR y las donaciones individuales que forman el reservorio común se guardan o desechan, dependiendo del resultado del análisis por PCR. Aunque se reduce el número de análisis por PCR, y los costes asociados a los mismos, este método tiene como resultado un desperdicio sustancial de una parte significativa de donaciones libres de virus. Ya que una única donación con una contaminación viral que sobrepasa un

nivel predeterminado va a hacer que un reservorio común sea positivo al PCR, es posible que las demás donaciones que forman un reservorio común sean individualmente negativas al PCR. Este resultado es altamente probable ya que en la población normal de donantes existe un número relativamente pequeño de donantes positivos al PCR. En el proceso de estancamiento convencional, todas las donaciones que forman el reservorio común se desechan al obtenerse un resultado positivo al PCR, incluidas aquellas donaciones que son individualmente negativas al PCR.

Además, es muy frecuente congelar las donaciones de plasma poco después de recibirlas. Cuando se necesitan muestras individuales de donaciones de plasma para agruparlas, cada donación tiene que descongelarse, retirar una parte alícuota de la sangre o plasma de la donación, y la donación tiene que volver a congelarse para su conservación. Múltiples ciclos de congelación-descongelación pueden afectar negativamente a la recuperación del ARN o ADN de interés, así como a las proteínas contenidas en el plasma, afectando así negativamente a la integridad del análisis por PCR. Por otra parte, cada vez que se retira una parte alícuota de cada una de las donaciones de plasma para formar un reservorio común, la donación está sujeta a la contaminación, tanto del medio ambiente circundante como del aparato utilizado para retirar la parte alícuota. Además, si la donación contiene un virus, puede contaminar otras donaciones. Con el fin de evitar la introducción de virus contaminantes en una donación libre de virus, el aparato de toma de muestras tiene que ser esterilizado después de cada uso, o utilizado para tomar únicamente una sola parte alícuota de una única donación individual y un nuevo aparato de toma de muestras para tomar una parte alícuota de cada donación individual posterior. Cualquiera de estos métodos implica un gasto considerable y supone una pérdida de tiempo.

En consecuencia, se necesita un proceso y un sistema para la obtención de múltiples muestras de sangre o plasma de donaciones individuales de manera que se puedan agrupar muestras concretas sin contaminar el resto de las muestras. También es conveniente que el proceso y el sistema puedan formar tales reservorios comunes de forma rápida y eficiente, sin contaminar a un técnico de laboratorio de análisis clínicos o al ambiente del laboratorio de análisis.

Además, es conveniente que el proceso y sistema proporcionen un análisis eficiente y rentable de las donaciones de sangre o plasma para identificar únicamente donaciones positivas al PCR en el menor número posible de ciclos de análisis.

Breve descripción de la invención

Por tanto, en la práctica de esta invención se proporciona un proceso rentable y efectivo para preparar y analizar muestras procedentes de una pluralidad de donaciones de sangre o de plasma a fin de identificar de forma exclusiva donaciones infectadas con virus, así como sistemas y dispositivos para poner en práctica el proceso.

El proceso de la presente invención da como resultado productos sanguíneos y plasmáticos sustancialmente más seguros, ya que se puede analizar fácilmente la contaminación por virus directamente en el suministro de sangre o plasma. Se pueden realizar análisis altamente sensibles y rentables de manera inmediata, y se pueden identificar donaciones contaminadas, sin tener en cuenta un período de ventana de infectividad.

En una realización de la práctica de la presente invención, el proceso comprende las fases que consisten en colocar una donación de sangre o plasma en un recipiente de recogida. Un segmento flexible de recogida está conectado al recipiente y abierto al interior del recipiente. El segmento de recogida se llena de sangre o plasma procedente del recipiente de recogida, y una parte de segmento de recogida se sella por ambos extremos. La parte sellada de segmento de recogida se retira del recipiente y, antes o después de retirar la parte sellada del segmento de recogida, se proporciona una pluralidad de juntas separadas a intervalos por la longitud del segmento de tubo entre los extremos sellados. Las partes de segmento de los intervalos entre juntas adyacentes definen recipientes, en donde cada uno de tales recipientes contiene una muestra de sangre o plasma, y en donde los intervalos entre las juntas proporcionan un volumen suficiente en cada uno de esos recipientes para realizar el análisis.

En una realización más detallada de la presente invención, las donaciones de plasma individuales se recogen en un envase de recogida de plasma que tiene un recipiente de análisis conectado al mismo por un segmento de tubo hueco flexible. Después de haberse llenado con plasma de donantes, el envase de plasma se inclina para transferir plasma al recipiente de análisis y al segmento de tubo flexible, llenando así el segmento de tubo. El segmento de tubo se sella a intervalos separados por su longitud, las partes de segmento de tubo de los intervalos entre juntas definen bolsas, cada una de las cuales contiene una muestra de la donación de plasma. El segmento de tubo, que se ha transformado en una serie de bolsas, se desconecta después del envase de recogida de plasma y se congela hasta que se necesita para análisis.

En otro aspecto de la presente invención, el segmento de tubo hueco comprende una serie de puntos en Y unidos entre sí, que incluyen un punto de inyección provisto en una pata de la Y, y en donde cada pata del ramal de un punto en Y determinado que no incluye un punto de inyección está conectada a la base del siguiente punto en Y en la cadena mediante un segmento de tubo de plástico flexible. Por la longitud de cada segmento de tubo de plástico flexible hay juntas térmicas separadas que separan los puntos en Y.

En otro aspecto de la presente invención, un dispositivo para proporcionar múltiples juntas térmicas por la longitud del segmento de tubo lleno de sangre o plasma de la donación comprende unas planchas de sellado opuestas primera y segunda. Cada una de las planchas de sellado incluye una pluralidad de partes elevadas separadas por su longitud alternando con partes rebajadas. Las partes elevadas y rebajadas de la primera plancha coinciden con partes elevadas

y rebajadas de la segunda plancha. Las planchas de sellado opuestas se mueven juntas por un segmento de tubo de plástico lleno de sangre o plasma de la donación para formar juntas térmicas en aquellas partes del segmento de tubo comprimidas entre las partes elevadas y para formar cámaras definidas por partes rebajadas opuestas. Las juntas térmicas definen entre medias una pluralidad de bolsas individuales en serie y cada cámara, definida por cada par cerrado de partes rebajadas, está configurada para albergar una bolsa.

En concreto, un dispositivo para proporcionar múltiples juntas térmicas por la longitud del segmento de tubo lleno de sangre o plasma de una donación se configura para montarlo en un aparato de termosellado disponible comercialmente, como una modificación no original.

En otra realización más de la invención, un sistema de recogida y preparación de muestras de plasma para análisis comprende un recipiente de recogida de plasma y un tubo de plástico hueco conectado al recipiente, cada uno de los cuales se forma de plástico y contiene índices codificados moldeados en el plástico. Los índices codificados se disponen por el eje principal del segmento de tubo y el código se repite a intervalos separados de modo que el segmento de tubo puede estar provisto de una pluralidad de juntas separadas por su longitud para definir así bolsas entre las juntas. Los intervalos codificados de los índices corresponden a los intervalos de las bolsas, de manera que cada bolsa va a contener al menos un ciclo del código.

Para empezar el proceso de análisis de la presente invención, se retira una primera bolsa de cada grupo de segmentos de tubo que corresponde a una pluralidad de donaciones de plasma diferentes. Una parte del contenido de cada primera bolsa se retira y el contenido formado en un reservorio común de un recipiente.

En una realización ejemplar de la presente invención, el primer reservorio común se analiza para detectar una indicación de carga viral. Cuando se analiza el primer reservorio y devuelve una indicación de carga viral positiva, se retira en serie la siguiente bolsa, o una segunda bolsa de cada uno de los segmentos de tubo que se han utilizado para formar el primer reservorio común. Las segundas bolsas se dividen en dos subgrupos aproximadamente iguales, y se analiza el contenido de uno de los reservorios comunes de los subgrupos para detectar la presencia de un virus específico. Cuando el reservorio común del subgrupo analizado es negativo para virus, se retira en serie otra bolsa de los segmentos de tubo correspondientes usados para formar el subgrupo no analizado. Las bolsas se dividen en dos subgrupos de nueva generación aproximadamente iguales, y el contenido de las bolsas de los subgrupos se forman como reservorios comunes. Uno de los reservorios comunes de subgrupos de nueva generación se analiza para detectar una indicación de carga viral.

Cuando el reservorio común del subgrupo analizado es positivo para tal indicación de carga viral, se retira una bolsa de los segmentos de tubo correspondientes usados para formar el subgrupo analizado. El proceso se repite, con cada reservorio común positivo que sigue dividiéndose en subgrupos cada vez más pequeños, comprendiendo cada uno de los subgrupos sucesivos una parte de las muestras del anterior subgrupo positivo, hasta que se identifica una bolsa final que corresponde a una sola donación de plasma.

En otra realización de la presente invención, un proceso para analizar una pluralidad de donaciones de plasma para identificar exclusivamente donaciones con una indicación de carga viral positiva en un único ciclo de análisis por PCR, incluye las fases que consisten en definir una cuadrícula n-dimensional que define elementos internos en las intersecciones de cada una de las n dimensiones de la cuadrícula. Una muestra de cada una de las donaciones de plasma se proyecta en un elemento correspondiente de la cuadrícula, siendo cada muestra definida por una notación matricial X_{res} , donde el subíndice de la notación del elemento de matriz define índices dimensionales de la cuadrícula. Se toman partes alícuotas de cada muestra de cada una de las donaciones de plasma y se forman como subgrupos. Cada subgrupo incluye una parte alícuota de todas las muestras de donaciones de plasma en donde se fija uno de los índices dimensionales. Todos los subgrupos se analizan al mismo tiempo, en un único ciclo de análisis por PCR, y los índices dimensionales de cada subgrupo que da positivo se evalúan de acuerdo con una reducción mediante el método de menores, identificando así de manera inequívoca un único elemento definido por los índices dimensionales de cada subgrupo positivo, e identificando así de manera inequívoca una única muestra positiva.

Breve descripción de los dibujos

Estas y otras características, aspectos y ventajas de la presente invención se entienden mejor cuando se consideran con respecto a la siguiente descripción detallada, a las reivindicaciones en anexo y a los dibujos que se acompañan, en donde:

La figura 1, es una vista en perspectiva semiesquemática de un ejemplo de un envase de donación de plasma y de un recipiente de muestras unido mediante un segmento de tubo útil para la práctica de la presente invención.

La figura 2, es una vista en perspectiva semiesquemática de un segmento de tubo conectado entre un envase de donación de plasma y un recipiente de muestras y dividido en bolsas de conformidad con la presente invención.

La figura 2a, es una vista en perspectiva semiesquemática de un segmento de tubo conectado entre un envase de donación de plasma y un recipiente de muestras e incluye una serie de puntos en Y unidos entre sí de conformidad con la presente invención.

ES 2 319 937 T3

La figura 3a, es una vista en planta superior aumentada de una parte del segmento de tubo que se muestra en la figura 2, que muestra otros detalles de las juntas que separan las bolsas.

La figura 3b, es una vista en corte semiesquemática de una junta de segmento de tubo.

La figura 4, es una vista en perspectiva semiesquemática de un dispositivo en conformidad con la práctica de la presente invención para sellar un tubo en bolsas individuales.

La figura 4a, es una vista en perspectiva semiesquemática de unas planchas superior e inferior de un dispositivo de termosellado provisto de conformidad con la práctica de la presente invención para montarlo en un termosellador disponible comercialmente.

La figura 5, es una vista en perspectiva semiesquemática de una placa de muestreo y una cubierta provistas de conformidad con la presente invención.

La figura 6, es una vista en corte parcial semiesquemática de una bolsa de plasma incluida en un pozo de muestras de la placa de muestreo de conformidad con la presente invención.

La figura 7, es una vista en perspectiva semiesquemática de un dispositivo provisto de conformidad con la presente invención para aplastar bolsas de muestras y conducir las muestras de fluido contenidas en las mismas a un reservorio común.

La figura 8, es una vista en corte semiesquemática de un cilindro aplastador del dispositivo de la figura 7.

La figura 9a, es una vista en corte parcial semiesquemática de una placa de tela metálica contra la que se aplastan paquetes que contienen muestras.

La figura 9b, es una vista superior semiesquemática de una placa de tela metálica que muestra ranuras de fluido radiales y concéntricas para recoger fluido de muestras procedente de recipientes de muestras aplastadas.

La figura 10, es una vista en corte parcial semiesquemática de un pistón aplastador del dispositivo de la figura 7.

La figura 11, es un organigrama que representa la metodología de análisis de acuerdo con la invención para determinar donantes positivos al PCR de un reservorio común de donación.

La figura 12, es un organigrama que representa una secuencia de análisis de acuerdo con la invención para identificar una única donación positiva al PCR de un reservorio común de 512 donaciones.

La figura 13, es un organigrama que representa una segunda metodología de análisis de acuerdo con la invención para determinar donantes positivos al PCR de un reservorio común de donación.

La figura 14 y última, es una representación de una cuadrícula tridimensional de acuerdo con la invención que muestra la definición de los índices r, c, y s.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a sistemas, procesos y dispositivos útiles para analizar donaciones de sangre o plasma a fin de detectar aquellas donaciones específicas que tienen un nivel de contaminación viral superior a un nivel predeterminado. Tales donaciones contaminadas se desechan después para impedir su incorporación en la corriente de materia prima para productos farmacéuticos o su transfusión a pacientes humanos. Los análisis de detección viral usados de acuerdo con la práctica de la presente invención pueden ser cualesquiera que detecten directamente un virus en vez de anticuerpos provocados en respuesta al virus. El análisis incluye análisis de reacción en cadena de polimerasa (PCR) y otros análisis suficientemente sensibles para detectar directamente un virus incluso después de agrupar muestras procedentes de diferentes donaciones.

En una realización en la que se pone en práctica la presente invención, se proporciona una pluralidad de donaciones de sangre o plasma diferentes. De cada donación, se saca una muestra de sangre o plasma y se introduce en un segmento de tubo hueco flexible correspondiente. Se proporciona una pluralidad de juntas separadas a intervalos por la longitud del segmento de tubo, de manera que los trozos de segmento de los intervalos entre las juntas definen bolsas, conteniendo cada bolsa una muestra de sangre o plasma. Como se describe después con más detalle, se proporciona una única metodología de acuerdo con la presente invención, para analizar muestras de plasma de bolsas después de haber agrupado las muestras para detectar y aislar de manera efectiva y eficaz cualquiera de tales donaciones de sangre o plasma contaminada con virus.

Refiriéndonos a la figura 1, se muestra una realización ejemplar de un sistema provisto de acuerdo con la práctica de la presente invención para realizar el proceso de muestreo. El sistema incluye un recipiente de donación de plasma estándar 20, construido con un material no reactivo tal como cloruro de polivinilo (PVC). El recipiente de donación

ES 2 319 937 T3

20 incluye una tapa 22 con dos adaptadores huecos en forma de codo 23 y 24, respectivamente, unidos a su superficie superior. Los adaptadores comunican con el interior del envase de donación a través de orificios provistos en la tapa 22 para tal fin. Un tubo de relleno hueco y flexible 26, de material biológicamente neutro, tal como plástico PVC, está conectado por un extremo al adaptador en forma de codo 23 y por el otro extremo, por ejemplo, a una aguja que se introduce en un donante con miras a obtener una donación. En la realización que se ilustra, también se proporciona un recipiente de análisis 28 para recoger una muestra de la donación a fin de analizarla serológicamente. El recipiente de análisis 28 tiene normalmente forma de tubo de ensayo y también se hace con un material biológicamente no reactivo. El recipiente de análisis 28 incluye un elemento de tapa integral 30 en el que se hacen orificios con miras a comunicarse con el interior del recipiente de análisis.

Un segmento de tubo hueco y flexible 32, construido con material plástico biológicamente no reactivo, se conecta entre el elemento de tapa 30 del recipiente de análisis 28 y el adaptador hueco en forma de codo 24 de la tapa del recipiente de donación de plasma. El segmento de tubo 32 se conecta al elemento de tapa 30 de manera que el fluido que pasa a través del segmento de tubo va a entrar en el recipiente de análisis 28 a través de un orificio previsto en el elemento de tapa 30 para tal fin. El segmento de tubo 32 se puede ajustar por fricción en dicho orificio, soldar sónicamente al mismo o unirse al orificio en relación coaxial mediante técnicas que conocen bien los versados en la materia.

También se puede proporcionar un segundo orificio en el elemento de tapa 30, al que se conecta un tubo de ventilación de un modo similar al segmento de tubo 32. El tubo de ventilación 34 no tiene más de dos pulgadas de longitud, y normalmente termina en un filtro de exclusión de bacterias 36 de ajuste por fricción.

En una realización ejemplar, una donación de sangre o plasma se extrae de un donante y se recoge en el recipiente de donación de plasma 20 para almacenarlo hasta que se necesite. En el caso de una donación de plasma, normalmente se extrae sangre de un donante y se pasa por un aparato de centrifugación continua, en el que se centrifugan glóbulos del fluido de plasma de soporte y se devuelven al donante. El plasma se almacena después.

Una vez que se ha extraído una donación de plasma de un donante y se ha llenado el recipiente de donación 20, el recipiente de donación se inclina para elevar el nivel de fluido por encima del adaptador en forma de codo 24 que está conectado al segmento de tubo 32. El plasma entra en el segmento de tubo, circula por el segmento de tubo y llena el recipiente de análisis 28. Durante el llenado, el aire que está atrapado dentro del recipiente de análisis 28 sale por el tubo de ventilación 34, dejando que se llene completamente el recipiente de análisis. El filtro de exclusión de bacterias 36 filtra cualquier bacteria que haya en el aire de retorno, impidiendo así que el ambiente circundante contamine la muestra. Una vez lleno el recipiente de análisis, se deja que el plasma de la donación llene el segmento de tubo 32.

Refiriéndonos ahora a la figura 2, después de llevar la muestra de sangre de la donación al segmento de tubo 32, el segmento de tubo se sella con una soldadura térmica 38 o con otro medio de sellado adecuado tal como una soldadura sónica, en un lugar próximo a la conexión del segmento de tubo con el recipiente de donación de plasma. Se aplica otra junta térmica 40 al segmento de tubo en un lugar próximo a la conexión del segmento con el recipiente de análisis 28. De ese modo, se proporciona un tubo hueco alargado, cerrado por ambos extremos y que contiene una cantidad de la donación de plasma.

La parte llena del segmento de tubo 32 se retira de los recipientes de donación de plasma y de análisis cortando el segmento de tubo por el centro de las juntas 38 y 40. El recipiente de donación de plasma separado se retira después para congelarlo y almacenarlo, mientras que el recipiente de análisis separado se retira a un laboratorio para analizarlo serológicamente. Normalmente, se analizan varios anticuerpos de los contenidos que se obtienen en respuesta a virus específicos tales como hepatitis C (HCV), o HIV-1 y HIV-2.

También se proporcionan otras juntas 42 a intervalos separados por la longitud del segmento de tubo para definir bolsas individuales y conectadas en serie, comprendiendo cada una de manera adecuada un trozo de segmento de tubo hueco 44. Cada uno de tales trozos 44 contiene una cantidad determinada de sangre o plasma necesario para el reservorio común de generación específico que se va a formar. Por ejemplo, para bolsas que se van a formar para análisis por PCR, se pueden sellar entre 0,2 y 0,5 ml de sangre o plasma de la donación huésped.

El segmento de tubo se sella de un modo en el que se proporcionan entre 5 y 15 bolsas individuales y conectadas. El sellado, para definir las bolsas, puede hacerse una vez retirado el segmento de tubo de entre el recipiente de donación de plasma y el recipiente de análisis serológico o de preferencia, se hace mientras el segmento de tubo está todavía unido al recipiente de donación de plasma con miras a impedir que se cree presión hidrostática. El sellado se puede hacer usando cualquier método conocido tal como sellado por termocompresión (termosellado), soldadura sónica o equivalente, siempre que la longitud de la zona comprimida y sellada sea suficiente para permitir que las bolsas conectadas se separen entre sí cortando por el centro de la junta sin romper la integridad de la bolsa por ningún lado, como se indica más claramente en las figuras 3a y 3b. Una segunda realización del segmento de tubo adaptado para subdividirlo en partes de parte alícuota que contienen muestras de sangre o plasma se muestra la figura 2a que es una vista en perspectiva semiesquemática de una realización de segmento de tubo de recogida conectado entre un envase de donación de plasma 20 y un recipiente de muestras 28 y dividido en partes que contienen partes alícuotas según la presente invención.

ES 2 319 937 T3

El segmento de tubo de recogida 50 está conectado entre el elemento de tapa 30 del recipiente de análisis 28 y el adaptador hueco en forma de codo 24 de la tapa del recipiente de donación de plasma. El segmento de tubo 50 comprende de manera conveniente una pluralidad de puntos en Y 51 conectados entre sí en serie mediante segmentos de tubo de plástico de grado médico, huecos y flexibles 52. Los puntos en Y 51 son del tipo normalmente adaptado para conectarlo a un set de infusión intravenosa e incluyen una parte de cuerpo cilíndrico 53 con una trayectoria definida a su través, teniendo una salida 54 en un extremo de la trayectoria y un punto de acceso 55 en el otro extremo. Un puerto del ramal 56 está previsto en el cuerpo 53 del punto en Y e incluye un circuito de fluido que se comunica con la trayectoria a través del cuerpo 53.

Un punto en Y se conecta con el siguiente uniendo con disolvente un tubo de plástico de grado médico, hueco y flexible 52 entre el puerto de salida 54 que está en la parte inferior de un punto de Y, y el puerto del ramal 56 del siguiente punto en Y de la serie. Un primer tubo de entrada hueco 57 se une con disolvente al puerto del ramal del primer punto en Y de la serie. El primer tubo de entrada hueco 57 se conecta a su vez al adaptador en forma de codo 24 de la tapa del recipiente de donación de plasma. La conexión se puede hacer ajustando por fricción el primer tubo de entrada hueco 57 en el adaptador en forma de codo 24, soldando sónicamente el tubo al mismo, o uniendo el tubo en relación coaxial con el adaptador usando técnicas conocidas bien por los versados en la materia. Además, el primer tubo de entrada 57 puede terminar en un adaptador de tipo luer estándar 58 que va a permitir conectar de manera separable los puntos en Y conectados en serie a un recipiente de donación provisto de un conector de tipo luer coincidente en el extremo del codo 24.

De un modo similar, el punto en Y extremo está provisto de un tubo de salida extremo, hueco y flexible 59 unido con disolvente al punto en Y extremo por su puerto de salida. Este tubo también puede conectarse a un accesorio de tipo luer estándar por su extremo distal.

De un modo similar al descrito en correspondencia con la primera realización, después de extraer una donación de plasma de un donante y de llenar el recipiente de donación 20, el recipiente de donación se inclina para elevar el nivel de fluido por encima del accesorio en forma de codo 24 que está conectado al segmento de tubo de entrada 57. El plasma entra en el segmento de tubo y circula a través de los puntos en Y conectados en serie, entrando en cada punto en Y a través de su puerto del ramal 56 y circulando hasta el siguiente punto en Y desde el puerto de salida del anterior punto en Y 54. El plasma se decanta hasta que el recipiente de análisis 28 se llena. Una vez lleno el recipiente de análisis, la donación se sigue decantando hasta que también se llenan los puntos en Y conectados en serie que comprenden el segmento de tubo 50.

Después de retirar la muestra de plasma de la donación al segmento de tubo 50, el segmento de tubo de salida extremo 59 se cierra con una junta o soldadura térmica 40a o con otro medio de sellado adecuado tal como una soldadura sónica, por un lugar adecuado de su longitud, cercano a la conexión del segmento de tubo de salida extremo con el recipiente de análisis 28.

El segmento de tubo lleno 50 se retira del recipiente de análisis cortando el segmento de tubo de salida extremo 59 del recipiente de análisis por el centro de la junta 40a. Por otro lado, si el segmento de tubo 50 termina en un conector de tipo luer, el segmento de tubo 50 se retira del recipiente de análisis 28 desconectando el luer. Una segunda junta térmica 38a se aplica en el primer segmento de tubo de entrada 57 en un emplazamiento de su longitud cerca de la conexión del primer segmento con el recipiente de donación 20. La parte llena del segmento de tubo 50 se retira de la donación de plasma cortando el primer segmento de entrada 57 por el centro de la junta 38a, o desconectando el accesorio de tipo luer 58, si se proporciona. De ese modo, se proporciona un tubo articulado hueco y alargado, cerrado por ambos extremos que comprende una pluralidad de puntos en Y unidos en serie. Cada uno de los puntos en Y unidos entre sí contiene una parte alícuota de la donación de sangre o plasma.

Como se describe después con más detalle, los segmentos de tubo que conectan un puerto de salida de un punto en Y con un puerto del ramal del siguiente punto en Y también están provistos de juntas térmicas 42a para definir partes alícuotas de muestra individuales conectadas en serie, comprendiendo cada una de manera adecuada un punto en Y individual. Cada uno de tales puntos en Y contiene una cantidad determinada de sangre o plasma necesaria para un reservorio común de generación específico que se va a formar. El sellado para aislar cada punto en Y puede realizarse una vez retirado el segmento de tubo 50 del recipiente de donación de plasma o mientras el segmento de tubo está todavía unido. De preferencia, el sellado para aislar los puntos en Y se realiza mientras el segmento de tubo 50 está todavía unido al recipiente de donación de plasma para que la reducción de volumen producida al comprimir una parte del tubo durante el sellado no haga que aumente la presión hidrostática de la muestra. Cuando el segmento de tubo 50 permanece conectado al recipiente de donación de plasma, se deja que el exceso de fluido generado por la reducción de volumen del tubo creado por las juntas térmicas vuelva al recipiente de donación. De ese modo, se disipa de manera segura el exceso de presión hidrostática que puede salir a chorro durante la extracción de muestras.

El sellado se puede realizar usando cualquier método conocido, por ejemplo sellado por termocompresión (termosellado), soldadura sónica o equivalente, siempre que la longitud de la zona comprimida y sellada sea suficiente para permitir que los puntos en Y se separen entre sí cortando por el centro de la junta sin romper la integridad del segmento de tubo por ningún lado.

Refiriéndonos ahora a las figuras 3a y 3b, en una realización preferida, la junta entre bolsas (42 de la figura 2) y/o puntos en Y (51 de la figura 2a) incluye una zona de almohadilla plana 46 con una zona estrecha central 47 por

ES 2 319 937 T3

la que se corta o rasga la junta para separar las bolsas conectadas. El corte se hace por la parte central con miras a asegurar que cada bolsa separada permanezca sellada por partes de lengüeta comprimidas 48 que quedan en cada extremo después de la separación. La longitud de la almohadilla de sellado puede ser mayor o menor dependiendo del método de separación elegido. La separación se puede hacer usando un escalpelo, un cortador de guillotina o unas simples tijeras.

Refiriéndonos a la figura 4, se muestra una realización ejemplar de un dispositivo de sellado 60, útil para proporcionar bolsas de tamaño específico, que incluye un medio para separar las bolsas e identificar su número de orden por un segmento. El dispositivo de sellado 60 comprende de manera conveniente unas planchas primera y segunda 61 y 62, respectivamente, incluyendo cada una, una pluralidad de partes de cabeza de sellado elevadas dispuestas en una relación separada en las superficies opuestas de la plancha. El dispositivo de sellado 60 está preferiblemente formado de manera que las partes de cabeza elevadas 63 se pueden desplazar por sus planchas correspondientes de forma que la separación entre una parte de cabeza de sellado elevada y otra puede variar. Las cabezas de sellado elevadas 63 pueden colocarse por la plancha de manera que la distancia entre cabezas de sellado sucesivas vaya reduciéndose de manera progresiva para que el sellado se realice por la longitud de un segmento de tubo a intervalos separados que se vayan acortando de manera progresiva. De ese modo, se pueden formar bolsas de muestras que vayan reduciendo su tamaño progresivamente y, por tanto, que también vaya reduciéndose progresivamente el volumen, moviendo pares de cabezas de sellado opuestas por sus planchas correspondientes hasta un emplazamiento deseado.

Con miras a formar múltiples juntas térmicas por la longitud del segmento de tubo de plástico que tiene dentro una muestra de sangre o plasma, el segmento de tubo se coloca en el interior del dispositivo de sellado 60 entre las planchas de sellado superior e inferior 61 y 62, respectivamente. Las planchas opuestas se acercan entre sí, comprimiendo y sellando así los segmentos de tubo. Como se muestra en la figura 4, la pluralidad de partes de cabeza de sellado extendidas o elevadas 63 separadas por la longitud de cada plancha, alternan con partes rebajadas 64. A medida que las planchas opuestas se mueven juntas para formar juntas térmicas en aquellas partes de un segmento de tubo de plástico que tiene dentro una muestra de sangre o plasma y está comprimido entre las partes de cabeza de sellado elevada 63, se forman cámaras mediante las partes rebajadas opuestas 64. Las cámaras se proporcionan para acomodar aquellas partes del segmento de tubo que no se van a comprimir sino que se van a formar como bolsas. Cada cámara definida por cada par de partes rebajadas cerradas está configurada para alojar una bolsa.

Un calentador 65 está configurado para calentar cada una de las partes de cabeza de sellado de la plancha para que las partes elevadas opuestas formen una junta térmica en el segmento de tubo cuando se cierre el dispositivo de sellado. El calentador 65 puede ser de cualquiera de los tipos de calentador conocidos tales como calentadores radiantes, calentadores de inducción o de resistencia, o equivalentes. De preferencia, el calentador 65 se conecta directamente a cada una de las cabezas de sellado elevadas 63 para calentar las partes elevadas sin calentar excesivamente los huecos. Si se desea, se puede proporcionar aislamiento para reducir la transferencia de calor entre las partes elevadas y los huecos. En una realización ejemplar, también se puede conectar un dispositivo de refrigeración 66, tal como aletas de refrigeración o de radiación, una corriente de aire móvil o un dedo frío, al dispositivo de sellado 60. El dispositivo de refrigeración 66 se conecta directamente con cada una de las partes rebajadas 64 con lo cual las cámaras que se definen cuando las partes rebajadas opuestas se mueven juntas, se mantienen a una temperatura baja. De ese modo, las muestras de sangre o plasma que se encuentran en bolsas formadas en el interior de la cámara durante el proceso de sellado no se dañan debido a las altas temperaturas de la junta térmica.

La zona estrecha (47 de la figura 3b) que atraviesa aproximadamente el centro de la junta se forma por una estructura saliente alargada 67 prevista en el centro de la parte de cabeza de sellado extendida 64 de las planchas de sellado. Cuando se comprime el segmento de tubo entre las cabezas de sellado superior e inferior, el saliente 67 forma una indentación en la superficie superior e inferior de la parte de junta. Las indentaciones estrechan el material de plástico comprimiendo el centro de la junta, haciendo así que sea fácil separarlo.

En una realización de la invención, el saliente 67 puede ser estriado con miras a proporcionar perforaciones dispuestas en una dirección perpendicular al eje principal de los segmentos de tubo. Las perforaciones permiten separar entre sí las bolsas individuales y conectadas sin el riesgo que conlleva cortar con un objeto afilado que puede romper la integridad de una bolsa al cortar accidentalmente la zona que contiene la muestra. Las perforaciones se hacen preferiblemente durante el proceso de sellado proporcionando estrías a las cabezas de sellado. Por otro lado, se pueden proporcionar perforaciones poco después usando una plantilla o troquel perforador.

También se proporciona un medio 68 para abrir y cerrar el dispositivo de sellado 60 con miras a comprimir las planchas de sellado entre sí y formar de ese modo juntas por la longitud del segmento de tubo. Tal medio se conoce bien en el estado de la técnica y puede comprender de manera conveniente un aparato manual de apertura y cierre, tal como una empuñadura de palanca, unido a una armadura de soporte y que mueve la armadura haciendo frente, por ejemplo, a una bisagra. Otros dispositivos pueden incluir guías verticales, resortes o prensas de pistón de funcionamiento hidráulico, y otras prensas mecánicas, eléctricas o hidráulicas comunes.

Refiriéndonos ahora a la figura 4a, se muestra en una vista semiesquemática, una realización específica de un dispositivo de sellado 70, útil para proporcionar juntas térmicas por termocompresión a intervalos separados uniformes, para formar bolsas de tamaños específicos deseados, o para aislar puntos en Y unidos entre sí en partes alcuotas individuales que contienen muestras. El dispositivo de sellado 70 comprende de manera conveniente unas planchas superior e inferior 71 y 72, respectivamente, adaptadas para montarlas por la palanca de presión y una banda de sellado, respec-

ES 2 319 937 T3

tivamente, de un sellador de impulso comercialmente disponible, tal como uno de los selladores de impulso de la serie ALINE M, fabricado y vendido por la Compañía ALINE de Santa Fe Springs, California. La realización específica que se muestra en la figura 4a es una cabeza de termosellado en dos partes adaptada para unirla a un termosellador de impulso ALINE MC-15, como una modificación no original, y permite al MC-15 producir bolsas prellenadas de plasma para su procesamiento según el sistema y método de la presente invención.

La plancha inferior 72 de la cabeza de termosellado 70 está formada con un material termorresistente rígido adecuado tal como kevlar laminado[®] fabricado y vendido por DuPont Corporation. En la realización que se ilustra, la plancha inferior 72 tiene una longitud de aproximadamente 15 pulgadas para encajar en la superficie de montaje del termosellador de impulso MC-15. La plancha inferior 72 incluye una muesca longitudinal 73 dispuesta centralmente y que se desplaza por toda la longitud de la plancha inferior 72. La anchura de la muesca longitudinal 73 es de aproximadamente 0,2 pulgadas para recibir tubo médico estándar, que normalmente tiene un diámetro externo de aproximadamente 0,1875 (3/16) pulgadas, en una forma encajada por la longitud de la muesca.

Una pluralidad de muescas transversales 74 están previstas a intervalos separados por la longitud de la plancha inferior 72, colocadas en una dirección perpendicular a la de la muesca central 73. Las muescas transversales 74 tienen una anchura de aproximadamente 0,5 pulgadas y están colocadas en centros de 1,125 (1-1/8) pulgadas. Cada muesca transversal está, por tanto, separada de sus muescas vecinas mediante un bloque residual del material de la plancha dividido centralmente por la muesca longitudinal central 73 que tiene una anchura de aproximadamente 0,625 (5/8) pulgadas.

Tanto las muescas longitudinales como las transversales 73 y 74, respectivamente, se cortan sólo parcialmente a través del material de la plancha inferior 72, formándose así una plataforma sustancialmente plana 75 que define la superficie inferior de las muescas longitudinales y transversales. Cuando el aparato se usa para formar juntas térmicas, una longitud de 0,1875 (3/16) pulgadas de tubo médico estándar se encaja en posición por la muesca longitudinal 73 y queda apoyado en la plataforma 75 de la plancha inferior que funciona como superficie de apoyo durante el proceso de termosellado.

Un elemento calefactor 76, tal como un hilo resistivo de níquel-cromo (NiCr), se proporciona en forma de serpiente entre muesca y muesca, dispuesto longitudinalmente por cada muesca transversal, comprendiendo la plancha inferior más o menos en el centro de la muesca. Cuando el elemento calefactor 76 atraviesa el centro de las muescas transversales 74, se impide que el hilo de níquel-cromo se ponga en contacto con el tubo de plástico termosensible, cubriendo el hilo con un trozo, por ejemplo, de cinta de Teflon[®]. Por esa razón, las muestras de sangre o plasma que se encuentran en las bolsas formadas dentro del dispositivo de sellado durante el proceso de sellado no se dañan debido a las altas temperaturas de la junta térmica.

La plancha superior 71 también tiene una longitud de aproximadamente 15 pulgadas y queda suspendida de la plancha inferior 72 debido a la palanca de presión del termosellador MC-15. La plancha superior 71 se construye con material plástico termorresistente tal como Lexan[®] o kevlar laminado[®] y comprende un conjunto de dientes normalmente rectangulares y separados entre sí la misma distancia que sobresalen de su superficie inferior y se extienden en una dirección que va hacia la plancha inferior. Los dientes 77 tienen una longitud de aproximadamente 0,5 pulgadas y están separados en centros de 1,125 (1-1/8) pulgadas. Por tanto, se puede apreciar que cada uno de los dientes 77 está dimensionado para encajar en la cavidad definida por las muescas transversales 74 de la plancha inferior 72. Cada uno de los dientes 77 de la plancha superior 71 está colocado de manera que queda suspendido sobre una intersección correspondiente de una muesca transversal 74 y la muesca longitudinal 73 de la plancha inferior 72. Por tanto, cada diente 77 está configurado para encajar en la cavidad definida de ese modo cuando las planchas de termosellado se acercan entre sí al retirar el dispositivo MC-15.

Después de colocar un segmento de tubo flexible en el interior de la muesca longitudinal 73, la plancha superior 71 se empuja para que se ponga en contacto con la plancha inferior 72, haciendo descender la tapa del aparato de termosellado. Cuando se baja la tapa, los dientes 77 de la plancha superior 71 entran en la cavidad definida por las muescas transversales 74 de la plancha inferior 72 y se ponen en contacto con la parte del segmento de tubo que queda expuesto en la plataforma 75, en la intersección de cada muesca transversal 74 con la muesca longitudinal central 73. Se proporciona corriente al hilo térmico resistivo de níquel-cromo (NiCr) que hace que se ablande el material de plástico del segmento de tubo. Al mismo tiempo, la plancha superior 71 se comprime sobre la plancha inferior, aplicando así una presión sobre el material de plástico que se ablanda mediante el elemento calefactor 76.

Después del sellado, el segmento de tubo se etiqueta, al menos en un extremo, con un único identificador que corresponde a la donación de plasma original. Esto se puede conseguir, por ejemplo, pegando una etiqueta en el segmento o imprimiendo un código de barras directamente en el material del tubo. Se proporciona de manera conveniente un hueco 78 preparado en el termosellador 70 para sujetar y alinear una etiqueta identificadora de código de barras. Tal etiqueta se forma a partir de un material termosellable adecuado y se termosella en el segmento de tubo, en la primera posición de sellado con fines de identificación. El segmento de tubo, incluidas las bolsas que contienen muestras, se congela para conservarlo.

Volviendo a la figura 2, es importante poder identificar de manera inequívoca todas las partes del sistema que comprenden una donación de plasma individual. De ese modo, se pueden colocar identificadores tales como filamentos codificados, puntos codificados, códigos de barras u otra estructura codificada con el identificador único, en la

ES 2 319 937 T3

estructura física del sistema de recogida de plasma. Por ejemplo, en una realización, un filamento codificado 37 se moldea en el recipiente de donación 20, un filamento codificado 39 se moldea por el borde de la tapa 22 del envase, un filamento codificado 41 se moldea en el lateral del recipiente de análisis 28 y un filamento codificado 43 se moldea en los segmentos de tubo a intervalos separados. El único identificador del segmento de tubo se desplaza por la longitud de los segmentos de tubo y el código se repite con miras a permitir la segmentación de los segmentos de tubo al mismo tiempo que se mantiene la integridad de identificación de cada segmento preparado de ese modo. Además, cada parte del sistema de donación se identifica con el mismo código de manera que la identidad de la donación se mantiene para todas las partes del sistema.

Volviendo ahora a las figuras 3a, 3b y 4, puede resultar también conveniente tener cada bolsa individual a lo largo de un segmento identificada con un código alfa o numérico que equivalga a la posición de la bolsa por la longitud lineal del segmento de tubo original. Tal código puede imprimirse, por ejemplo, en la parte comprimida de la almohadilla de sellado situada entre bolsas adyacentes usando un troquel estampador. Tal troquel estampador puede comprender una parte integral del dispositivo de sellado como se muestra en las figuras 4 y 4a, con lo cual el sellado, la formación de bolsas de diferentes tamaños y la provisión de zonas estrechas o perforadas para obtener una fácil separación, además de números de identificación, se obtienen en una sola fase efectiva. Como alternativa, el identificador alfa o numérico puede comprender parte de una plantilla o troquel perforador. Se conocen troqueles estampadores que incluyen medios para hacer avanzar el carácter alfa o numérico a un siguiente carácter para que bolsas en serie que están en un segmento de tubo sean identificadas mediante una secuencia de caracteres alfa (a, b, c, ...) o numéricos (1, 2, 3 ...) correspondientes.

Por tanto, si se prepara un primer grupo de análisis a partir de bolsas procedentes de varias donaciones, se puede realizar un chequeo de control de calidad confirmando que todas las bolsas que se van a agrupar de cada segmento de tubo tienen el mismo código de ubicación, por ejemplo, el número 1. Del mismo modo, cuando se prepara un segundo grupo de análisis a partir de muestras de las mismas donaciones, se puede realizar un chequeo de control de calidad confirmando que todas las bolsas que se van a agrupar de cada segmento de tubo tienen, por ejemplo, el número 2 impreso en algún punto de la parte comprimida de la bolsa.

Para realizar un análisis por PCR efectivo de una donación, la muestra de análisis de serología tomada de cada donación individual del recipiente de análisis 28 se analiza para detectar varios antígenos y/o anticuerpos conocidos de virus específicos. Si una muestra es positiva para uno o más análisis de antígenos o anticuerpos conocidos, la donación individual y su segmento de tubo correspondiente se excluyen para seguir analizando y se pueden desechar ambos de un modo adecuado.

Los segmentos de tubo que corresponden a las donaciones serológicamente negativas se dividen en grupos identificados, comprendiendo cada grupo un número seleccionado de donaciones. Como se describe después, el número de donaciones se determina en base a la sensibilidad de los análisis de alta sensibilidad específicos, tales como análisis por PCR, la concentración anticipada de ARN o ADN viral de interés en la muestra de plasma, y la frecuencia anticipada de una muestra positiva por PCR que se produce en la población de donantes general. Por ejemplo, para la detección del virus de hepatitis C, que contiene el ARN de interés, en una población de donantes de plasmaféresis repetida, es conveniente agrupar muestras de entre 100 y 700 donaciones individuales. Para una población en la que se produce una contaminación viral con más frecuencia, pueden ser adecuados grupos de entre 50 y 100 donaciones individuales.

A continuación, se describe una realización de un proceso de preparación de reservorios comunes de análisis por PCR según la presente invención con relación a las figuras 5 y 6. Se proporciona una placa de muestreo 80, que normalmente tiene una aplicación similar a la de una placa de valoración aunque configurada de acuerdo con la práctica de la invención. La placa de muestreo 80 está configurada para contener normalmente pozos de muestras normalmente semicilíndricos 81 dispuestos horizontalmente en la placa en un conjunto normalmente regular. Una placa de muestreo adecuada usada para poner en práctica el método de la invención tiene 64 pozos de muestras semejantes dispuestos de manera rectangular en columnas/filas de 8 X 8. También se proporciona una placa de cobertura 82 con las mismas dimensiones externas que las de la placa de muestreo 80. La placa de cobertura 82 está adaptada para cubrir la superficie de la placa de muestreo 80 con una unión de ajuste apretado. Unos agujeros pasantes 83 están dispuestos en la placa de cobertura en la misma forma de conjunto que los pozos de muestras de la placa de muestreo 80. Cuando la cubierta 82 se coloca sobre la superficie de la placa de muestreo 80, los agujeros pasantes 83 se alinean verticalmente sobre los pozos de muestras 81, permitiendo así la comunicación con los pozos de muestras a través de los agujeros pasantes. El diámetro de los agujeros pasantes es sustancialmente menor que el área de superficie de las bolsas de muestras de análisis y de los pozos de muestras correspondientes. Sin embargo, el diámetro de los agujeros pasantes es suficientemente grande para permitir que una aguja u otro objeto en forma de cánula los atraviese y entre en los pozos de muestras por debajo.

Como se muestra con relación a la figura 6, una bolsa extrema 84 (primera generación, "número 1") se retira de cada segmento de tubo que se ha identificado como perteneciente a un grupo PCR determinado a analizar. Cada bolsa extrema 84 se lava, aunque no se abre, y se coloca en un pozo de muestras correspondiente 81 de la placa de muestreo 80. La placa de cobertura 82 se asegura en la parte superior de la placa de muestreo 80 y la placa, la cubierta y las bolsas se descongelan a una temperatura adecuada.

ES 2 319 937 T3

Un volumen igual de entre aproximadamente 0,02 y 0,5 ml de plasma se retira de cada bolsa y se agrupa en un recipiente de análisis. Una aguja 85 u otro dispositivo de tipo cánula atraviesa el agujero pasante de la placa de cobertura y se coloca directamente en el pozo de muestras de la placa de muestreo que está debajo, perforando así el material del tubo de la pared lateral de la bolsa accediendo a la muestra de plasma que está en el interior. En una
5 realización ejemplar, la aguja se conecta a un dispositivo que proporciona un vacío continuo o succión para extraer toda la sangre o plasma que se encuentra en la bolsa y minimizar cualquier escape de fluido hacia la bandeja circundante. La aguja puede sostenerse en un dispositivo que permite a la aguja desplazarse a través del agujero pasante y por la pared superior de la bolsa, aunque restringe su avance hacia abajo de manera que se impide que la aguja toque o perforo la pared inferior de la bolsa cuando la bolsa se asienta en el pozo de muestras. Cuando la cánula se retira después de
10 extraer la muestra, el material 86 de la placa de cobertura que rodea el agujero pasante impide que se retire de manera accidental la bolsa con la cánula, como se muestra en la figura 6.

Aunque el método para preparar un reservorio común de análisis por PCR se describe en cuanto a la extracción manual de una muestra insertando una cánula individualmente en cada pozo de muestras, el método se puede poner en
15 práctica usando un proceso automatizado. La placa de muestreo que contiene bolsas en cada pozo puede sujetarse para poder apretar un conjunto de cánulas, dispuestas de un modo que corresponde a la distribución de agujeros pasantes en la placa de cobertura, sobre la placa de muestreo, permitiendo así perforar al mismo tiempo todas las bolsas de muestras y extraer las muestras de las mismas. Por otro lado, se puede automatizar o programar una sola cánula o un dispositivo de sujeción de cánula para perforar y retirar sucesivamente fluido de cada bolsa. Con miras a evitar la
20 contaminación residual, se usa una cánula limpia para retirar muestras para cada reservorio común.

Además, queda claro para cualquiera versado en la materia que la combinación de la placa de muestreo, los pozos de muestras, la cubierta, los agujeros pasantes y la cánula, aunque se describen en relación a la extracción de fluido de un paquete de muestras, se puede aplicar igualmente a la extracción de fluido de muestras de los recipientes de muestra
25 con puntos en Y de la figura 2a. La configuración de los pozos de muestras de las figuras 5 y 6 está determinada por la forma el recipiente que contiene fluido y sólo se necesitan modificaciones menores con miras a reconfigurarlos para los puntos en Y. Por ejemplo, los pozos de muestras pueden comprender un cilindro alargado, orientado verticalmente, en el que se inserta cada punto en Y. Se puede proporcionar una hendidura en algún emplazamiento adecuado alrededor de la periferia superior de cada pozo de muestras que funcione como un retén en la que se puede colocar el puerto del ramal del punto en Y. Esto también funciona para orientar cada punto en Y, y proporcionar seguridad posicional
30 adicional. Del mismo modo que se describe en relación a las figuras 5 y 6, se puede extraer fluido de cada punto en Y insertando la cánula en cada puerto de acceso del punto en Y, y en comunicación de fluido con la muestra. Cuando se retira la cánula del puerto de acceso, el material de la placa de cobertura que rodea cada agujero pasante actúa como tope e impide retirar el punto en Y del pozo de muestras.

También queda claro para cualquiera versado en la materia que esta configuración es igualmente adecuada para
35 poner en práctica la invención usando un proceso automatizado. Un conjunto de cánulas puede colocarse de modo que corresponda a la distribución de los agujeros pasantes de la placa de cobertura, permitiendo así perforar todos los puertos de acceso de los puntos en Y y extraer muestras de los mismos al mismo tiempo. Por otro lado, se puede automatizar o programar una única cánula o un dispositivo de sujeción de cánula para perforar sucesivamente cada puerto de acceso y retirar fluido de cada punto en Y.

A continuación, se describe otra realización de un aparato y método adecuados para preparar un grupo de análisis por PCR según la presente invención en relación a las figuras 7, 8, 9a, 9b y 10. Refiriéndonos ahora a la figura 7, un
45 grupo de donación de plasma que comprende fluidos extraídos de una pluralidad de muestras de plasma, se prepara a partir de varios paquetes de muestras de donación de plasma en una prensa hidráulica electroaccionada 90. La prensa hidráulica 90 comprende de manera conveniente un cilindro aplastador 91 en el que se colocan paquetes muestras, y un pistón accionado hidráulicamente 92 que aplasta los paquetes de muestras. Las muestras que están en los paquetes se extraen del cilindro aplastador 91 mediante un gas a presión, tal como aire o nitrógeno comprimido, y se recogen
50 en un recipiente de estancamiento como un reservorio común.

Al principio, una bolsa de generación (por ejemplo, bolsa # 1) se retira de cada segmento de tubo que se ha identificado como perteneciente a un grupo PCR determinado a analizar. Cada bolsa de generación se lava, aunque
55 no se abre, y se coloca dentro del cilindro aplastador 91 de la prensa 90. La carga del cilindro aplastador se realiza dentro del ambiente de una campana de bioseguridad de clase II y de una trayectoria de corriente de aire para impedir la contaminación accidental del ambiente circundante debida a un paquete que ha perdido integridad estructural. De un modo que se describe con más detalle después, el pistón aplastador 92 se asienta firmemente en el cuello abierto 91a del cilindro aplastador 91 de manera que se asegura el confinamiento del contenido del cilindro aplastador 91 y la combinación del cilindro 91 y el pistón 92 encierra completamente los paquetes de muestras. El modo en el que
60 el pistón aplastador 92 se acopla con el cilindro aplastador 91 se diseña para asegurar que el ambiente que está fuera del cilindro 91 se proteja de contaminación debida a virus dañinos que pueden estar presentes en cualquiera de las muestras que están en los paquetes de muestras.

El cilindro aplastador 91 se monta después en un asiento de cilindro 91 que alinea el cilindro en una posición
65 correcta en la prensa hidráulica 90 y permite también que un eje hidráulico 94 conectado operativamente al cilindro hidráulico 94, se alinee y case con el pistón hidráulico 92. De un modo que se describe después con más detalle, el pistón aplastador 92 está conectado de manera liberable con el eje hidráulico 94, de manera que el pistón 92 puede desplazarse hacia arriba y hacia abajo mediante el funcionamiento del cilindro hidráulico 95.

ES 2 319 937 T3

Una vez alineados el cilindro 91 y el pistón 92 de manera adecuada en el asiento de cilindro 93 y conectados al cilindro hidráulico 95 a través del eje 94, se acciona una válvula de control 96 para hacer que el cilindro hidráulico ejerza una fuerza sobre el eje 94 y el pistón 92 que, a su vez, aplasta los paquetes de muestras dentro del cilindro aplastador 91. El cilindro hidráulico 95 funciona en conjunto con un motor eléctrico AC 240 V de cuatro caballos 97 que acciona una bomba oscilante hidráulica 98 que bombea fluido hidráulico en conjunto con un depósito de fluido 99 para accionar así el cilindro 95. Aproximadamente 4.000 libras de fuerza se cargan de manera concentrada en el eje hidráulico 94 que desarrolla una presión de aproximadamente entre 800 y 900 psi aplicada a los paquetes de muestras mediante el pistón 92.

Una vez aplastados los paquetes de muestras, las muestras de donación de fluido que se encuentran dentro se extraen del cilindro aplastador 91 mediante un gas a presión suministrado, por ejemplo, por un cilindro de aire comprimido 100 que se conecta a través de un regulador de presión 101 a una válvula de seguridad de vaciado rápido 102 prevista en el pistón aplastador 92. Para permitir que la válvula de seguridad de vaciado rápido 102 funcione correctamente, en primer lugar el pistón 92 se eleva un poco desde su posición de aplastamiento completamente extendida. Se descarga aire comprimido en el cilindro 91 a través del regulador de presión 101 hasta que se alcanza la presión de umbral de la válvula de seguridad de vaciado rápido. La válvula 102 se abre después, dejando que el gas comprimido presurice el interior del cilindro que empuja el reservorio común de plasma hacia el exterior del cilindro aplastador 91 a través de un puerto de recogida 103 previsto en la parte inferior del cilindro. El reservorio común de plasma se recoge después en un recipiente de estancamiento conectado al puerto de recogida 103 mediante un conducto o tubo de extracción a medida que el fluido es sacado del cilindro mediante el aire comprimido. El aire comprimido se descarga en una campana de bioseguridad de clase II, después de haber pasado a través de un colector de blanqueador.

Refiriéndonos ahora a la figura 8, se representa una vista en sección parcialmente en corte de un cilindro aplastador 91 construido de acuerdo con los principios de la invención. El cilindro aplastador 91 comprende de manera conveniente una placa de base normalmente circular 105 que tiene una superficie inferior, una superficie superior y un labio circunferencial 106 que se extiende en dirección ascendente desde la superficie superior, con roscas cortadas en su cara interior. Una pared de cilindro 107, abierta por ambos extremos, está roscada en la cara externa de su extremo inferior. Un rebajo o hendidura 108 está cortado en la cara interna del extremo inferior de la pared de cilindro 107 para definir un labio anular 109 dispuesto en paralelo a la superficie superior de la placa de base 105 y presenta una cara opuesta. Cuando la pared de cilindro 107 se atornilla en la placa de base 105, una placa de tela metálica 110 dispuesta en la superficie de la placa de base 105, se acopla mediante el labio anular 109 de la pared de cilindro 107 y se comprime entre el labio anular 109 y la superficie superior de la placa de base.

Refiriéndonos ahora a las figuras 9a y 9b, la placa de tela metálica 110 es normalmente una placa en forma de disco circular hacia la que se empujan paquetes que contienen muestras cuando las ha aplastado el pistón aplastador 92. Como se muestra en la figura 9b, la placa de tela metálica 110 incluye ranuras de fluido que comprenden muescas radiales 111 y muescas circulares concéntricas 112, teniendo todas una anchura de aproximadamente 1/32 pulgadas, cortadas en la superficie superior de la placa de tela metálica. Las muescas radiales 111 se cortan con un ángulo que se inclina hacia el centro de la placa de tela metálica 110 donde terminan en un desagüe o sumidero situado axialmente 113 que desagua a través de un tubo de desagüe 114 de ¼ de pulgada (ver mejor la figura 8) taladrado en la placa de base 105.

Volviendo ahora a la figura 8, entre la pared de cilindro 107 y la placa de tela metálica 110 se forma una junta acoplando y comprimiendo una junta tórica 115, prevista en un canal de sellado 116 cortado en la placa de base 105 para tal fin. El canal de sellado 116 está situado en la placa de base de manera que la junta tórica 115 queda situada debajo de la intersección vertical entre la placa de tela metálica 110 y la pared de cilindro 107. Un escalón 117 está cortado en la placa de base 105, y un surco correspondiente 118 está cortado en la placa de tela metálica, con lo cual un retén positivo puede colocar de manera exacta la placa de tela metálica sobre la placa de base para alinearla de manera adecuada con la junta tórica de forma que la pared de cilindro 107 se acopla de manera adecuada con la placa de tela metálica y su intersección se acopla de manera adecuada con la junta tórica 115.

Refiriéndonos ahora a la figura 10, se muestra, en una vista en sección parcial, un pistón aplastador 92 provisto de acuerdo con los principios de la invención. El pistón aplastador 92 comprende una cabeza de pistón normalmente cilíndrica 120, que tiene una copa situada centralmente, que se extiende axialmente 121 y que sobresale de la cabeza 120, teniendo la copa 121 paredes normalmente cilíndricas y un extremo abierto para definir de ese modo una cavidad 123 destinada a recibir un eje de cilindro hidráulico normalmente cilíndrico 94.

Una brida anular 122 está prevista alrededor de la circunferencia de la copa cilíndrica 121 y rodea la boca abierta de la copa. La superficie exterior de la brida 122 es biselada, de manera que la superficie biselada aumenta de diámetro en dirección al cuerpo volumétrico de la cabeza de pistón 120. A medida que el eje hidráulico 94 avanza hacia la cavidad 123, un par de sujetadores de retención accionados por resorte 124 avanzan sobre la superficie biselada de la brida anular 122 hasta que se bloquean en su posición y agarran la parte inferior de la brida anular.

Para acoplarse en la cavidad 123, cada sujetador de retención 124 incluye un diente biselado 125 que se desplaza por la superficie biselada de la brida anular 122 de la cabeza de pistón, abriendo así las mordazas de los sujetadores de retención accionados por resorte 124. A medida que el eje hidráulico 94 sigue avanzando, los dientes biselados 125 de los sujetadores de retención 124 avanzan finalmente sobrepasando la superficie biselada de la brida anular 122. El accionamiento por resorte de los sujetadores de retención empuja los dientes biselados para que se pongan en

ES 2 319 937 T3

contacto con la superficie exterior de la pared lateral de la copa. Los dientes de los sujetadores de retención 124 se acoplan así en la superficie inferior del collar de retención anular 122, agarrando de ese modo el pistón aplastador 92 y proporcionando medios para hacer que el pistón se mueva en ambas direcciones.

5 Además, queda claro para cualquiera versado en la materia que los sujetadores de retención accionados por resorte 124 pueden desengancharse fácilmente de la anilla de retención anular 122 simplemente comprimiendo entre sí los extremos de los sujetadores opuestos a los dientes de retención biselados 125. Por tanto, la cabeza de pistón 120, la copa cilíndrica montada axialmente 121, la anilla de retención anular 122 y los sujetadores de retención 124, en combinación, proporcionan medios para desconectar rápida y fácilmente el eje hidráulico 94 del pistón aplastador 92. Esta característica de desconexión rápida permite separar la combinación de pistón 92 y cilindro 91 del asiento de cilindro 93 de la presión hidráulica 110 para limpiar, esterilizar, rellenar con paquetes de muestras adicionales, y equivalentes.

15 Como se muestra en la figura 10, el pistón aplastador 92 incluye también varias juntas tóricas 126 dispuestas en canales de sellado 178 previstos alrededor de la periferia de la cabeza de pistón 120. Las juntas tóricas se proporcionan con objeto de formar un cierre estanco a la presión entre la superficie circunferencial exterior de la cabeza de pistón 120 y la superficie circunferencial interior de la pared de cilindro 107 del cilindro aplastador. Una pluralidad de juntas tóricas proporcionan una medida de seguridad para confinar fluido de muestras potencialmente contaminadas en los límites del cilindro 91. Aunque en la realización de la figura 10 se muestran tres juntas tóricas 126, queda claro que se puede usar un número mayor o menor de juntas tóricas de acuerdo con la invención. Todo lo que se necesita es formar una junta entre el pistón aplastador 92 y el cilindro aplastador 91 para asegurar el confinamiento de fluido potencialmente contaminado en el interior del cilindro.

25 Volviendo ahora a la figura 8, la pared lateral del cilindro aplastador comprende un escalón biselado 130 de 0,020 pulgadas mecanizado en la superficie interior de la pared lateral. Aproximadamente la primera pulgada desde la parte superior de la pared lateral de cilindro 107 se mecaniza de este modo para tener un diámetro interior (ID) aproximadamente 0,040 pulgadas mayor que el ID de la parte restante de la pared lateral de cilindro 107 que se extiende hacia abajo, hacia la placa de tela metálica 110 y la base 105. La interfaz entre el escalón y la parte de pared lateral restante es biselada, para proporcionar una superficie de transición inclinada, relativamente lisa desde el ID superior un poco mayor hasta el ID inferior un poco menor.

30 El escalón de la pared lateral cilíndrica 107 se proporciona para que el pistón aplastador 92 pueda insertarse manualmente en el cuello abierto del cilindro aplastador 91 haciendo un ligero contacto entre las juntas tóricas (126 en la figura 10) y la superficie del ID del cilindro. Una vez montada manualmente la combinación de pistón y cilindro en el asiento de cilindro (93 en la figura 7), se hace avanzar el eje hidráulico 94 para que encaje en la cavidad 123 del pistón y se extienda hasta que los sujetadores de retención 124 se bloqueen contra la superficie inferior del collar de retención anular 122 de la cabeza de pistón. El eje hidráulico 94 avanza más después para empujar el pistón más hacia el cilindro, empujando así las juntas más allá del escalón 130 que está en el ID de la pared de cilindro. Cuando se han empujado más allá del escalón, las juntas tóricas se comprimen completamente entre el ID de la pared lateral de cilindro 107 y los canales de sellado de pistón 127, formando así una junta hermética.

45 En operación, el pistón aplastador 92 desarrolla una presión de aproximadamente entre 800 y 900 psi (4.000 libras de punta de fuerza cargada en el eje hidráulico) que es una presión suficiente para aplastar los paquetes de muestra que se encuentran en el interior del cilindro. El fluido de las muestras de sangre o plasma circula por la ranura de fluido prevista en la placa de tela metálica hasta el sumidero central, donde se recoge y se le permite salir del puerto de extracción y entrar en el recipiente de estancamiento. Después de la operación de aplastamiento, el cilindro hidráulico 95 se acciona para elevar el pistón aplastador 92 una distancia pequeña (aproximadamente entre $\frac{1}{2}$ y 1 pulgadas) por encima de la masa de los paquetes de muestras aplastadas, creando así una cámara dentro del cilindro. Un gas a presión, tal como aire comprimido, es forzado hasta la cámara a través de la válvula de seguridad de vaciado rápido 102 que está en el pistón 92. La presurización de la cámara hace que el fluido de las muestras de sangre o plasma sea extraído del cilindro a través del puerto de salida 103 hasta el recipiente de estancamiento.

55 Una vez terminada la operación de aplastamiento y estancamiento, el conducto de extracción que está conectado al puerto de salida 103, se fija para impedir que cualquier otro fluido de las muestras salga del cilindro. El conducto de extracción se coloca dentro de un contenedor de blanqueador y se hace que el cilindro hidráulico 95 eleve más el pistón en el cilindro, creando así una aspiración que desvía blanqueador del recipiente al cilindro. De preferencia, las fases de aplastamiento y de desvío de blanqueador se repiten otras dos veces, para que cualquier fluido "inverso" de las muestras de sangre o plasma sea extraído completamente del cilindro aplastador 91 y el blanqueador tenga oportunidades de sobra para llenar el volumen interno de la cámara de aplastamiento, reduciendo así cualquier contaminación viral a gran escala que pueda encontrarse dentro.

65 A continuación, se accionan las pinzas de desenganche rápido y la combinación pistón/cilindro se retira de la prensa hidráulica 90 y se somete a procesos de esterilización, por ejemplo en autoclave. El pistón y el cilindro pueden limpiarse después químicamente sumergiéndolos en una solución del 10% de blanqueador durante 15 minutos, seguido de un ciclo de aclarado con H_2O , surfactante con 1% de SDS (dodecilsulfato de sodio) y H_2O de nuevo, antes de pasarlos por el autoclave. Si no hay tiempo suficiente para la esterilización por autoclave, se puede dar por terminada la limpieza química con un 70% de ETOH y una solución de H_2O estéril. Si se desea tal limpieza química adicional, se realiza en una campana de bioseguridad de clase II que descarga a través de un filtro HEPA. Mientras está en la

ES 2 319 937 T3

campana, el cilindro aplastador se carga con un siguiente grupo de paquetes de muestras para aplastarlas y el pistón aplastador 92 se inserta manualmente en la boca abierta del cilindro aplastador 91 y es empujado hacia abajo hasta que las juntas tóricas del pistón hacen contacto con el escalón biselado formado en la pared lateral del cilindro. La combinación cilindro/pistón nuevamente recargada está ahora lista para ser colocada en el asiento de cilindro 93 del aplastador 90. El cilindro hidráulico 95 es accionado para hacer que el eje hidráulico 94 descienda hasta el pistón 92 de manera que las pinzas de desenganche rápido enganchen el anillo de retención anular en el pistón. Entonces se repite el proceso de aplastado, extracción y limpieza con blanqueadores.

De lo anterior, queda claro para cualquiera versado en la materia que la prensa hidráulica electroaccionada (el aplastador) 90 permite recoger muestras de sangre o plasma de un gran número de paquetes de muestras en una mínima cantidad de tiempo. El número de paquetes de muestras que se pueden aplastar con tal aparato está limitado primeramente por la magnitud del dispositivo y la presión que puede desarrollar el pistón aplastador contra la masa de paquetes de muestras contenidos en el cilindro. Las entre 800 y 900 psi de presión desarrollada por la prensa hidráulica de la realización que se ilustra es suficiente para aplastar completamente hasta 64 paquetes de muestras del tipo descrito en relación a la figura 2. Por tanto, la gran proporción de reservorios comunes que comprenden hasta 512 muestras, pueden formarse en 8 ciclos de funcionamiento del aplastador de la presente invención. Esto proporcionaría una reducción significativa del tiempo de formación del reservorio común en un método en el que se accede individualmente a 512 paquetes de muestras con una cánula para recoger las muestras de allí.

Además, queda claro para cualquiera versado en la materia que un único reservorio común grande, que comprenda hasta 512 muestras o más, puede formarse con un aparato aplastador suficientemente grande para acomodar el mayor número de bolsas de muestras en el cilindro. También se aumentaría el tamaño de la prensa hidráulica para proporcionar una mayor potencia de aplastamiento para vencer la mayor resistencia del mayor número de bolsas. Como ya se ha mencionado, el tamaño del reservorio común quedaría únicamente limitado por el tamaño deseado del aplastador.

Refiriéndonos ahora a la figura 11, se muestra un organigrama de una metodología de análisis por PCR según la invención, que permite la identificación de una única donación positiva por PCR con el menor número de análisis individuales.

El proceso comienza en un bloque 200 con la definición de un tamaño de reservorio común inicial adecuado que, a su vez, depende de varios factores tales como la frecuencia de ocurrencia del virus que nos interesa en la población de donantes general, la concentración final probable de ADN o ARN viral después de la disolución en el reservorio común, y equivalentes.

Aunque el análisis por PCR es altamente sensible y puede detectar un único virus de una muestra contaminada, un virus tiene que estar necesariamente presente en la muestra para el análisis por PCR a fin de proporcionar un resultado positivo. Si, por ejemplo, una muestra procedente de una donación contaminada que tiene una concentración de virus relativamente baja se mezcla con un gran número de muestras no contaminadas, la concentración de virus en el reservorio común resultante puede ser tan baja que hay una probabilidad estadística de que no haya virus presentes en una muestra tomada del reservorio común para los análisis por PCR. De hecho, puede parecer de manera equivocada que tales reservorios comunes no tienen contaminación viral.

Por ejemplo, si se prepara una muestra de 0,02 ml a partir de una donación de plasma contaminado con virus en una concentración de 500 virus por ml de muestra, la muestra de 0,02 ml comprendería, por término medio, 10 virus. Si estos 0,02 ml de muestra contaminada se mezclaran con aproximadamente otras 500 muestras de 0,02 ml de donaciones no contaminadas, el reservorio común de 10 ml comprendería virus en una concentración de 1 por ml. Por tanto, si se tomase una muestra de 1 ml del reservorio común para análisis por PCR, habría una probabilidad estadística significativa de que la muestra PCR no contendría virus.

Tales concentraciones bajas contaminadas con virus entrañan una pequeña amenaza a productos producidos a partir de plasma, ya que disponemos de varios métodos para inactivar virus presentes en tales donaciones de concentración baja. Tales métodos de inactivación viral incluyen el uso de disolvente-detergente o de un calentamiento superior a 60°C durante un periodo de tiempo adecuado o equivalente. Estos métodos, normalmente se describen como capaces de reducir la concentración de virus un número de "unidades log". Por ejemplo, el método disolvente-detergente puede reducir la contaminación viral de la hepatitis C a menos de 10^7 por ml o "7 unidades log". De ese modo, productos plasmáticos tales como factor VIII, factor IX o complejo de protrombina pueden prepararse a partir de donaciones de plasma tratadas de manera rutinaria, por ejemplo, con el método disolvente-detergente después de haberse probado que son negativas al analizarlas por PCR.

Para productos sanguíneos, transfundidos de manera rutinaria directamente a un recipiente, existe un pequeño riesgo de contaminación viral de baja concentración, después de haber comprobado que son negativos al analizarlos por PCR.

En la realización que se ilustra en la figura 11, se evalúan factores tratados antes, tales como la frecuencia de ocurrencia de los virus que nos interesan en la población de donantes y la probable concentración de virus después de la disolución. Se diseña un reservorio común de análisis por PCR de primer nivel dimensionado de manera adecuada que minimiza la probabilidad estadística de que pasen inadvertidos virus presentes en concentraciones bajas. El reservorio común se prepara en el bloque 201 agrupando los contenidos de bolsas extremas de secciones de tubo identificadas,

ES 2 319 937 T3

del modo que ya se ha descrito. En el bloque 202, se realiza un análisis por PCR en el reservorio común PCR de primer nivel.

5 El bloque 203 representa un punto de decisión en la metodología de la invención que depende de los resultados del análisis por PCR realizado en el bloque 202. En el caso de un resultado negativo en el análisis, se supone que todas las donaciones que corresponden a muestras usadas para componer el reservorio común PCR de primer nivel están libres de contaminación viral y se descargan para seguir procesándolas y convertirlas en productos farmacéuticos. La metodología termina así al recibir un resultado negativo del análisis por PCR.

10 Cuando el análisis por PCR devuelve una indicación de carga viral positiva, esto indica que un contaminante viral está presente en una o más de las donaciones que componen el reservorio común de primer nivel PCR. En el bloque 204, una bolsa de muestras adicional, la bolsa que sigue a la que se ha quitado, se quita de los segmentos de tubo que corresponden a donaciones que comprenden el reservorio común de primer nivel PCR original. Estas bolsas de muestras adicionales se dividen en dos subgrupos más o menos iguales, designados aquí como A y B por razones de claridad.

15 Estos subgrupos se agrupan después por separado usando una cánula limpia diferente para formar cada reservorio común de subgrupos del mismo modo que se ha descrito, y sólo uno de los reservorios comunes de subgrupos se analiza por PCR, como se indica en el bloque 205. Para los fines de la invención, no importa cuál de los dos subgrupos se analiza. En el bloque 205, el subgrupo A se identifica como el subgrupo a analizar, aunque también se podría haber designado el subgrupo B sin afectar a la metodología de la invención.

20 En el bloque 206, la decisión se toma dependiendo del resultado del análisis por PCR del reservorio común del subgrupo A. En el caso de que se compruebe que el reservorio común del subgrupo A es negativo para una indicación de carga viral PCR, no se realiza otro análisis de las muestras de las donaciones comprendidas en el subgrupo A. En vez de eso, como se indica en el bloque 207, se toman en orden las siguientes bolsas de muestras de los segmentos de tubo comprendidas en el subgrupo B que después, a su vez, se dividen en dos subgrupos más o menos iguales A' y B'. Cada subgrupo en esta fase comprende aproximadamente la mitad del número de muestras que las comprendidas en el grupo inmediatamente anterior. Los contenidos de las bolsas de muestras del subgrupo se agrupan después por separado del mismo modo que se ha descrito. En el caso de que se compruebe que el subgrupo A es positivo, indicando que al menos una de sus donaciones componentes está contaminada con virus, el otro subgrupo no analizado (subgrupo B en el ejemplo de la figura 11) se analiza ahora por PCR en el bloque 208 para confirmar que tampoco es PCR positivo. El subgrupo A ahora se convierte en el subgrupo subdividido de nuevo en dos subgrupos aproximadamente iguales (A' y B'), como se indica en el bloque 209.

35 En el bloque 210, el análisis por PCR se realiza sólo en uno de los subgrupos, A' o B', definido en la fase anterior 207 ó 209. El método ahora se repite y vuelve al bloque 206, en donde se aplica la fase de decisión a los resultados del análisis por PCR realizado en el bloque 210. De nuevo, si se comprueba que los resultados del análisis por PCR son negativos para el subgrupo analizado, el subgrupo no analizado se dividiría de nuevo en dos subgrupos aproximadamente iguales, comprendiendo cada uno aproximadamente la mitad de muestras que el subgrupo precedente. Si el grupo analizado da un resultado PCR positivo, el subgrupo analizado se subdividiría otra vez en dos subgrupos aproximadamente iguales, cada uno de los cuales comprendería la mitad de las muestras que el subgrupo precedente. En ese caso, el subgrupo no analizado se analizaría de nuevo por PCR para confirmar que tampoco sería PCR positivo.

45 La metodología de análisis se sigue repitiendo del bloque 206 al bloque 210 hasta que se determina que se han completado los análisis. La finalización de los análisis se determina cuando la división de un subgrupo da como resultado la creación de dos subgrupos, conteniendo cada uno una sola bolsa de muestras que corresponde a una sola donación. Una de las muestras se analiza por PCR en el bloque 210 y, si los resultados del análisis son negativos, la otra muestra se identifica como perteneciente a una donación de plasma contaminada con virus. Si se comprueba que la muestra analizada es positiva, el resto de la muestra se analiza también después por PCR para confirmar que tampoco es PCR positiva.

55 Al terminarse todos los análisis, la metodología de la invención termina en el bloque 211. Debe quedar claro del organigrama de la figura 11, que la metodología de análisis de la invención sólo necesita que se realicen dos análisis por PCR en cada nivel de análisis cuando el reservorio común analizado inicialmente es positivo: un primer análisis para uno de los dos subgrupos, y un análisis posterior para confirmar que el reservorio común correspondiente no analizado al principio es de hecho negativo. La metodología de análisis requiere únicamente un único análisis por PCR en cada nivel de análisis cuando el reservorio común analizado inicialmente es negativo.

60 La aplicación del sistema y método para analizar muestras de la invención se describe ahora en relación a un tamaño particular de reservorio común de análisis por PCR, como se muestra en la figura 12. En la figura 12, las bolsas extremas de 512 donaciones individuales se forman en un reservorio común de análisis por PCR inicial en el punto 212. Por razones de ilustración, se supone que sólo una de las 512 muestras se toma de una donación contaminada con un virus que nos interesa. El segmento de tubo que se muestra en la figura 12 que comprende 10 bolsas individuales y conectadas representa los segmentos de tubo originalmente conectados al recipiente de donación de plasma contaminado y quitados del mismo.

ES 2 319 937 T3

El reservorio común inicial de 512 muestras se analiza por PCR y debido a la presencia de la muestra contaminada, devuelve una indicación de carga viral positiva. En la fase 213, se preparan dos reservorios comunes de donación 256 (256A y 256B) de las siguientes bolsas en orden tomadas de segmentos que formaban el anterior reservorio común positivo. El reservorio común 256B se analiza ahora por PCR y, como se muestra en la figura 12, devuelve una indicación de carga viral negativa, indicando así que el reservorio 256A contiene una muestra de la donación contaminada.

En la fase 214, se preparan en orden dos reservorios comunes 128 de las siguientes bolsas de segmentos de tubo que formaban el reservorio común 256A. De ese modo, según la invención, el reservorio común 256A se ha subdividido sin haber sido analizado por PCR. En la fase 203, un reservorio común 128A se analiza ahora por PCR y, como devuelve una indicación de carga viral negativa, se sabe ahora que el reservorio común 128A incluye una bolsa de muestras de la donación contaminada. El reservorio común 128B se subdivide después en dos reservorios comunes de 64 donaciones (64A y 64B) retirando la siguiente bolsa en orden de aquellos segmentos de tubo cuyas bolsas precedentes formaban el reservorio común 128B.

A continuación, el reservorio común 64B se analiza por PCR y, en el ejemplo de la figura 12, devuelve una indicación de carga viral positiva. En ese caso, los análisis por PCR se realizan en el reservorio común 64A con miras a verificar que, de hecho, es negativo y que no hay más muestras contaminadas aparte de las que están en el reservorio común 64B. En la fase 216, el reservorio común 64B se subdivide de nuevo en dos reservorios comunes de donación 32, 32A y 32B, retirando en orden la siguiente bolsa de los segmentos de tubo usados para formar el reservorio común anterior 64B. El reservorio común 32B se analiza por PCR, devuelve una indicación de carga viral negativa, como se indica, y por esa razón el reservorio común 32A se subdivide otra vez en dos reservorios comunes de donación 16, 16A y 16B. De nuevo, los reservorios comunes de donación 16 se preparan retirando en orden la siguiente bolsa de muestras de los segmentos de tubo que formaban el anterior reservorio común positivo 32A.

En la fase 217, el reservorio común 16B se analiza por PCR y devuelve una indicación de carga viral positiva. Por tanto, el reservorio común 16A, se analiza por PCR con miras a confirmar que es negativo, y que todas las muestras contaminadas están presentes en el reservorio común 16B.

En la fase 218, el reservorio común 16B se subdivide en dos reservorios comunes de donación 8, 8A y 8B, retirando en orden la siguiente bolsa de muestras de los segmentos de tubo que formaban el anterior reservorio común 16B. El reservorio común 8B se analiza después por PCR y, como se ilustra, devuelve una indicación de carga viral negativa, que indica que el reservorio común 8A contiene una muestra de una donación contaminada. El reservorio común 8A se subdivide otra vez en dos reservorios comunes de donación 4, 4A y 4B, en la fase 219. Los análisis por PCR se realizan en el reservorio común 4B, que devuelve una indicación de carga viral negativa, indicando así que el reservorio común 4A contiene una muestra de una donación contaminada. El reservorio común 4A se subdivide después, en la fase 220, en los reservorios comunes 2A y 2B del mismo modo que se ha descrito. Al realizar los análisis por PCR, el reservorio común 2A devuelve una indicación negativa, indicando que una de las dos muestras que comprende el grupo 2A se tomó de un segmento de tubo de una donación contaminada correspondiente.

En la fase 221, las donaciones individuales se analizan retirando la bolsa extrema de los segmentos de tubo que formaban el grupo 2B. Las donaciones individuales extremas se analizan por PCR con miras a identificar la donación positiva específica, que después se saca del almacén y se desecha de manera adecuada. Las restantes 511 donaciones libres de virus se guardan para transformarlas más tarde en productos farmacéuticos.

En el ejemplo anterior, se ha identificado una única donación contaminada de un grupo de 512 de tales donaciones, realizando únicamente 13 análisis por PCR diferentes, incluido el primer análisis por PCR en el reservorio común de 512 donaciones. El método de la invención permite omitir un análisis por PCR en un subgrupo particular, siempre que el subgrupo analizado correspondiente devuelva una indicación de carga viral negativa. Al omitirse de ese modo determinados análisis por PCR, el método de la invención reduce el número de análisis por PCR que hay que hacer para identificar una donación positiva específica, sin sacrificar la resolución de la metodología de análisis por PCR. Con el método de la invención, se van a identificar todas las donaciones positivas sin tener que analizar todas las donaciones.

De la realización ejemplar de la figura 12, queda claro que cada uno de los subgrupos que cada vez son más pequeños se puede analizar por PCR y que puede variar la posición arbitraria de la muestra positiva. De ese modo, si una muestra procedente de la donación positiva estuviera presente en cada subgrupo analizado al principio, se necesitarían 18 análisis para identificar exclusivamente la donación positiva (un primer análisis que devuelve una indicación de carga viral positiva y otro análisis para asegurar que el subgrupo correspondiente es negativo).

Por la misma razón, si cada subgrupo analizado al principio devuelve una indicación de carga viral negativa, se necesitan 10 análisis para identificar la donación positiva. En la práctica, los resultados positivos y negativos en los subgrupos tienden a distribuirse igual, por tanto, se necesitan 14 análisis por término medio para identificar una única donación positiva procedente de un primer reservorio común de donación para 512 unidades.

Queda por tanto claro de lo anterior, que el sistema y método de la presente invención, incluido el conjunto de segmentos de tubo que comprenden bolsas individuales y conectadas que contienen una muestra de una donación de sangre, es conveniente para proporcionar una pluralidad de reservorios comunes de análisis por PCR. A diferencia

ES 2 319 937 T3

de la preparación de reservorios comunes convencionales, en los que se forma al mismo tiempo una secuencia de reservorios comunes primeros y posteriores a partir de una única muestra de cada donación, la presente invención permite la formación de un reservorio común de análisis inmediatamente antes del análisis. Este modo de formación de reservorios comunes “justo a tiempo” permite la formación de reservorios comunes de análisis a partir de bolsas individuales, según se necesiten. La posibilidad de contaminación se evita ya que los reservorios comunes se forman en diferentes momentos, cada uno a partir de bolsas de muestra selladas. Además, las bolsas de muestra permanecen congeladas hasta que se necesitan para formar un reservorio común de análisis. Se evitan los ciclos de congelación-descongelación que pueden afectar de manera negativa a la recuperación de ADN o ARN de interés, asegurando así la integridad del análisis por PCR.

Aunque el método descrito es efectivo para identificar una donación con carga viral positiva con el menor número de análisis por PCR que son relativamente costosos, también se proporcionan otros métodos para identificar donaciones positivas individuales de acuerdo con la práctica de la presente invención. En concreto, tal método tiene la característica de poder identificar donaciones positivas individuales en dos o tres ciclos de análisis por PCR, reduciendo así de manera significativa la cantidad de tiempo y los gastos administrativos necesarios para examinar un gran número de donaciones.

Por ejemplo, en el método descrito, una vez que se ha identificado que un subgrupo determinado contiene una donación positiva, un técnico tiene que identificar aquellas donaciones que contribuyen a que las muestras formen un subgrupo determinado. Esas donaciones tienen que revisarse y recogerse un paquete de muestras adicionales de cada segmento de tubo correspondiente. Después tienen que formarse dos subgrupos de nueva generación y repetirse los análisis por PCR. Este proceso de recogida, de formación de un reservorio común de subgrupos y de análisis por PCR se repite para subgrupos de formación cada vez más pequeños hasta que el método identifica exclusivamente la donación contaminada de virus.

Sin embargo, se desperdicia una gran cantidad de tiempo en cada ciclo de análisis por PCR (recogida, formación de un reservorio común de subgrupos y análisis por PCR). Si se coge como modelo el primer reservorio común de generación de 512 muestras, queda claro que al menos se van a necesitar 10 ciclos de análisis por PCR para identificar una única donación contaminada con virus. Aunque resulta muy rentable, el método descrito puede presentar problemas en un laboratorio de análisis por PCR cuando el tiempo es primordial.

A continuación y con relación a las figuras 13 y 14, se describe una metodología para identificar en exclusiva donaciones de sangre o plasma con carga viral positiva en el menor número de ciclos de análisis por PCR.

Refiriéndonos ahora a la figura 13, se representa un organigrama de una metodología de análisis por PCR, de acuerdo con la invención, para detectar de manera efectiva una donación individual positiva PCR en un reservorio común con el mínimo número de ciclos de análisis por PCR. Como pasaba con el método de análisis por PCR descrito, el método de la figura 13 supone que el análisis por PCR tiene suficiente sensibilidad para detectar la presencia de una muestra positiva en un reservorio común de tamaño adecuado. Sólo con fines ilustrativos, el agrupamiento inicial se ha elegido para que represente 512 donaciones de sangre o plasma. Aquellos versados en la materia entenderán que el tamaño del agrupamiento inicial puede ser mayor o menor dependiendo del marcador del genoma particular que se evalúe, de la sensibilidad del proceso de análisis por PCR usada, del valor esperado de la concentración de marcador del genoma dentro de la parte alícuota de muestra, y del tamaño de la parte alícuota de muestra.

El método empieza en el bloque 301 definiendo una matriz o cuadrícula N -dimensional. La matriz puede tener cualquier tamaño y comprende cualquier dimensión comprendida entre 2 y N , aunque de preferencia es una matriz regular tridimensional, organizada como un cuadrado.

Un ejemplo de tal matriz se representa en la figura 14, que es una ilustración gráfica de una matriz cuadrada, caracterizada por índices tridimensionales; fila, columna y capa (r , c , s). En la matriz modelo de la figura 14, hay tres filas, 3 columnas y 3 capas, definiendo así 3^3 ó 27 elementos. En la realización ejemplar, se considera que una fila comprende todos los elementos definidos tomando una sección vertical imaginaria a través de la matriz regular cuadrada. En la realización de la figura 14, los elementos que comprenden, por ejemplo, la fila 3 de la matriz, se identifican con la letra r_3 en sus caras de fila.

Asimismo, una columna comprende todos los elementos de una matriz que se definen tomando una segunda sección vertical imaginaria a través de la matriz, en una dirección perpendicular a la dirección de una fila. En la realización ejemplar de la figura 14, los elementos que comprenden, por ejemplo, la columna 1 tienen la letra c_1 en sus caras de columna. Una capa se define como todos los elementos que comprenden una sección horizontal a través de la matriz modelo de la figura 14. Del mismo modo que la definición de fila, y columna, los elementos que comprenden la capa 1 se identifican con la letra s_1 en sus caras de capa.

Por tanto, se puede observar que cada uno de los 27 elementos de la matriz de la figura 14 pertenecen únicamente a una de las tres filas, a una de las tres columnas y a una de las tres capas. Matemáticamente, esto se puede expresar mediante la relación X_{rcs} , donde X indica un elemento, y rcs es un índice dimensional, donde cada uno de los índices puede tomar un valor de 1 a 3. El elemento específico X_{113} puede identificarse como el elemento en la intersección de la fila 1, la columna 1 y la capa 3.

ES 2 319 937 T3

De lo anterior, queda claro que aunque la matriz modelo de la figura 14 es una matriz $3 \times 3 \times 3$, los principios de definición de matriz y de formación de elementos van a valer para matrices con un número mucho mayor de filas, columnas y capas. En concreto, todavía se puede representar matemáticamente una matriz con 8 filas, 8 columnas y 8 capas como X_{rcs} , donde r c y s pueden tomar ahora valores de 1 a 8. De ese modo, una matriz tridimensional $8 \times 8 \times 8$ puede alojar identificadores para 512 elementos.

Volviendo ahora al organigrama de la figura 13 y siguiendo la definición de una matriz de muestra N -dimensional, se proyectan muestras de donaciones de sangre o plasma en cada uno de los elementos definidos por la matriz. En una matriz modelo tridimensional de $8 \times 8 \times 8$, una muestra de cada una de las 512 donaciones individuales se asocia con un elemento de matriz y se identifica con un único indicador X_{rcs} correspondiente.

A continuación, se toma una parte alícuota de cada muestra y se forma una pluralidad de reservorios comunes secundarios de subgrupos. Cada reservorio común secundario comprende las partes alícuotas de todas las muestras (X_{rcs}) en donde se fija uno de los índices dimensionales. Es decir, según la matriz modelo descrita, todas las muestras (X_{rcs}) que tienen $r=1$, independientemente del valor de la columna o de la capa, se forman en un reservorio común secundario; igualmente para $r=2, r=3 \dots r=N$; igualmente para $c=1$, independientemente del valor de la fila o de la capa, $c=2, \dots c=N$; igualmente para $s=1$, independientemente del valor de la fila o de la columna, $s=2 \dots s=N$. Cada reservorio común secundario representa así cada fila, cada columna, cada capa, u otro índice dimensional, de manera que si se ha definido una matriz N - dimensional, va a haber N - dimensiones veces los reservorios comunes secundarios (número total de muestras)^{1/n}. Para la matriz tridimensional modelo de $8 \times 8 \times 8$ que contiene 512 muestras, va a haber 24 reservorios comunes de subgrupos secundarios (8 reservorios comunes de filas, 8 reservorios comunes de columnas y 8 reservorios comunes de capas). La creación de reservorios comunes secundarios, según la invención, puede verse como similar al método matemático de reducción de un determinante con el método de menores. Igualmente, se va a entender que cada muestra va a estar representada en N reservorios comunes secundarios, 1 para cada dimensión de la matriz.

Además de formar los reservorios comunes secundarios, se combina una parte alícuota de cada muestra, o una parte alícuota de cada uno de los reservorios comunes secundarios para formar un único reservorio común principal que contiene una muestra de todas las 512 donaciones que comprende el presente espacio de donación. Una vez formados todos los reservorios comunes, las demás muestras y los reservorios comunes secundarios y el reservorio común principal pueden volverse a congelar y almacenarse hasta el momento en el que se quiere hacer un análisis por PCR.

Cuando se quieren hacer análisis por PCR, se realiza en primer lugar un análisis por PCR en el reservorio común principal que representa una parte alícuota de cada muestra que comprende la matriz. Si los resultados del análisis para el reservorio común principal son negativos, no hay, al menos para el nivel de sensibilidad del análisis por PCR, donaciones con carga viral positiva representadas por muestras que forman la matriz. Las donaciones de sangre o plasma que han aportado muestras a la matriz pueden descargarse para otros usos. Sin embargo, si el análisis por PCR del reservorio común principal es positivo para un marcador de genoma determinado, se introduce un segundo ciclo de análisis por PCR, en 300, en el que se analiza ahora cada uno de los reservorios comunes secundarios.

En un modo similar al descrito, los tamaños de reservorio común principal se eligen de manera que sea pequeña la probabilidad estadística de haber más de una muestra positiva en el reservorio común principal (las 512 muestras), de preferencia inferior a entre el 1% y el 2%. Esto se puede hacer evaluando la frecuencia de existencia del virus que nos interesa en la población de donantes normal con un nivel de confianza de entre el 98% y el 99%. Por ejemplo, si se determina que sólo un donante de una población de 1.000 donantes normales está contaminado con el virus que nos interesa en un nivel de confianza de hasta un 98%, existe un 2% de probabilidades de encontrar más de un donante contaminado en los siguientes 1.000 donantes que se examinen. Esto asegura que el algoritmo va a ser capaz de identificar, en general, la única unidad reactiva en un reservorio común de un tamaño adecuado en el ciclo de análisis por PCR. Según la invención, dada una única muestra positiva en la matriz, 3 de los reservorios comunes secundarios van a contener una parte alícuota de la donación positiva, 1 en cada dimensión. En la realización ejemplar (la matriz de 512 muestras), hay 8 reservorios comunes secundarios de filas, 8 reservorios comunes secundarios de columnas y 8 reservorios comunes secundarios de capas. Si el reservorio común principal es positivo, un reservorio común de 1 fila, 1 columna y 1 capa va a ser positivo durante el segundo ciclo de análisis por PCR como se muestra en 307. La intersección del índice de elemento de fila, columna y capa identifica de modo inequívoco la donación reactiva como se muestra en 309.

Como ejemplo, si la muestra reactiva se ha proyectado en el elemento de matriz X_{113} , el reservorio común secundario de la fila 1 va a devolver un resultado de análisis por PCR positivo, mientras que la fila 2 y los siguientes reservorios comunes secundarios van a ser negativos. Además, el reservorio común secundario de la columna 1 va a devolver un resultado de análisis positivo, mientras que la columna 2 y los siguientes reservorios comunes de columna van a ser negativos. Asimismo, los reservorios comunes secundarios de las capas 1 y 2 van a devolver un resultado negativo, el reservorio común de la capa 3 va a ser positivo y los siguientes reservorios comunes de capa van a ser negativos. Los 3 reservorios comunes positivos (fila 1, columna 1 y capa 3) sólo tienen un único elemento en común X_{113} . De ese modo, la donación positiva se identifica exclusivamente como se representa mediante la muestra proyectada en el elemento X_{113} .

Si hay más de una donación reactiva en la matriz, las donaciones reactivas pueden todavía identificarse de manera inequívoca con el método de la invención, mediante 1 solo ciclo de análisis por PCR adicional. Si se observa que más

ES 2 319 937 T3

de 1 reservorio común secundario de un único índice dimensional devuelve un resultado de análisis positivo, mientras que un único reservorio común secundario que representa cada uno de los índices dimensionales restantes devuelve un resultado de análisis positivo, se puede identificar de manera inequívoca las más de una donaciones positivas evaluando matemáticamente los resultados de los análisis sin que sea necesario un tercer ciclo de análisis por PCR.

Por ejemplo, si un reservorio común secundario de la fila 1, y no otro, es positivo; un reservorio común secundario de la columna 1, y no otro, es positivo; y un reservorio común secundario de la capa 1 y un reservorio común secundario de la capa 3 son ambos positivos, sólo hay dos donaciones positivas que comprenden la matriz, y pueden identificarse de manera inequívoca como X_{111} y X_{113} . No se necesitan más análisis para llegar a este resultado.

Si, por otro lado, se observa que una pluralidad de reservorios comunes secundarios son positivos y sus identidades indican cambios por dos índices dimensionales, como se muestra en 310, queda claro que va a haber z^2 elementos identificados como potencialmente proyectados en una donación positiva, donde z es el número real de donaciones positivas que comprende la cuadrícula.

Por ejemplo, si el reservorio común secundario de la fila 1, y no otro, es positivo; los reservorios comunes de la columna 1 y la columna 3 son positivos; y los reservorios comunes de la capa 1 y la capa 3 son positivos, esto sugiere que los elementos candidatos potencialmente positivos son X_{111} , X_{113} , X_{131} y X_{133} . Como hay un múltiplo únicamente en dos de los índices dimensionales (columna y capa), y para elementos candidatos, se puede observar que sólo hay dos donaciones positivas reales que comprenden la matriz. En esta circunstancia, todas las 4 donaciones pueden identificarse de manera arbitraria como positivas, y desecharse o, por otro lado, se puede tomar una parte alícuota de cada uno de los 4 elementos candidatos y analizarlos por PCR de manera individual durante un tercer ciclo de análisis por PCR en 311, para identificar de manera exclusiva qué 2 de los 4 comprenden las donaciones positivas reales.

Asimismo, resulta evidente desde el punto de vista matemático que si hay más de 2 donaciones positivas en la matriz, y sus identificadores varían en más de 2 dimensiones, va a haber, como máximo, z^n elementos candidatos potencialmente positivos identificados, en donde z es el número real de donaciones positivas, y en donde n es el número de dimensiones que cambian. En esta circunstancia, se toman partes alícuotas de todos los elementos sospechosos de la matriz y se analizan directamente.

De este modo, se puede observar que el método de la invención permite una identificación inequívoca de donaciones que son reactivas para un marcador de genoma determinado en un ciclo de análisis por PCR para un reservorio común principal inicialmente positivo, en 2 ciclos de análisis por PCR para todas las matrices que contienen una única donación reactiva o una pluralidad de donaciones reactivas que varían únicamente en un único índice dimensional, y en 3 ciclos de análisis por PCR para cualquier otra situación.

Por tanto, la práctica de la presente invención da como resultado el suministro de sangre, y de productos sanguíneos o plasmáticos preparados a partir de la misma, siendo sustancialmente más seguro debido a que está lo más exento posible de contaminación viral. De manera conveniente, se realiza fácilmente un análisis altamente sensible y de coste efectivo para detectar directamente la presencia de un virus. Por tanto, se evitan falsas indicaciones de contaminación viral normalmente asociada a los análisis de anticuerpos durante el periodo de ventana de infectividad. Además, la presente invención permite el uso rentable de análisis altamente sensibles que pueden detectar la presencia de un único virus en la muestra de análisis, ayudando así a liberar el suministro de sangre de contaminación viral incipiente.

Los versados en la materia entienden que los ejemplos y las descripciones anteriores de las diferentes realizaciones preferidas de la presente invención son en conjunto solamente ilustrativas y que los cambios de forma, tamaño y número de los diferentes componentes de la presente invención, además de los tipos de análisis aplicados, pueden estar dentro del objeto de la invención. Por ejemplo, queda claro para cualquiera versado en la materia que la longitud de las bolsas individuales y conectadas, y por tanto su contenido volumétrico, puede aumentar de manera progresiva por la longitud del segmento de tubo. A medida que se forman diferentes subgrupos de análisis a partir de un número cada vez más pequeño de muestras, disminuye necesariamente el volumen de plasma que contiene el reservorio común. Debe quedar claro que con miras a mantener un volumen suficiente de plasma en cada subgrupo consecutivo, las bolsas de muestras consecutivas pueden contener un volumen mayor con miras a alojar un volumen de reservorio común final deseado. Para alojar reservorios comunes con un tamaño que oscila entre aproximadamente 1 ml y aproximadamente 10 ml, se entiende que los volúmenes de las bolsas de muestra sucesivas aumentan entre aproximadamente 0,02 ml y aproximadamente 0,5 ml, en fases sucesivas. En una realización ejemplar, el volumen de bolsa es de 0,02 ml en la primera bolsa para usar en el reservorio común más grande y de 0,2 ml en la última bolsa.

También entiende cualquiera versado en la materia que el sistema de la invención no se limita al recipiente de recogida de plasma ejemplar ni al segmento de tubo asociado. Las bolsas de sangre u otros recipientes de fluido biológico pueden usarse con igual facilidad y pueden unirse a los mismos segmentos de tubo adecuados una vez terminada la recogida de fluido o antes de la misma. Lo único que se necesita es que las cantidades de muestra de fluidos biológicos se transfieran a un segmento de tubo que después se transforma en bolsas de acuerdo con la práctica de la invención.

Por tanto, la presente invención no se limita a las realizaciones específicas descritas aquí sino que queda definida mejor por el objeto de las reivindicaciones en anexo.

ES 2 319 937 T3

REIVINDICACIONES

5 1. Método para identificar de manera exclusiva donaciones de fluido biológico con carga viral positiva, comprendiendo el método las fases que consisten en:

- proporcionar una pluralidad de donaciones de fluido biológico;

10 - definir una matriz n-dimensional, donde n es un número entero, comprendiendo también la matriz una pluralidad de elementos internos, estando definido cada elemento por una intersección de n dimensiones de la matriz, siendo identificado cada elemento individual por una notación matricial correspondiente y comprendiendo la notación matricial correspondiente un índice para cada dimensión del conjunto;

- tomar una muestra de cada una de las donaciones de fluido biológico;

15 - proyectar cada muestra en un elemento determinado correspondiente de cada elemento de la matriz, siendo cada muestra individual identificada por su notación matricial respectiva del elemento correspondiente;

20 - tomar partes alícuotas de cada muestra, siendo el número de partes alícuotas tomadas de cada muestra definido por el número de dimensiones que caracterizan la matriz;

- formar subgrupos de las partes alícuotas de cada muestra, conteniendo cada subgrupo una parte alícuota procedente de todas las muestras identificadas por una notación matricial, en la que se fija un índice dimensional, siendo identificado cada subgrupo correspondiente por dicho índice dimensional fijado;

25 - analizar cada subgrupo mediante un análisis por PCR para detectar una indicación de carga viral positiva;

- determinar los índices dimensionales correspondientes de subgrupos que devuelven una indicación de carga viral positiva; y

30 - combinar dichos índices dimensionales en una notación matricial, identificando así de manera inequívoca un elemento de matriz único definido por la notación matricial, e identificando así de manera inequívoca una muestra de carga viral positiva exclusiva.

35 2. Método según la reivindicación 1, en donde la matriz es una matriz regular y cada una de las n dimensiones de dicha matriz se **caracteriza** por un número entero igual de elementos.

40 3. Método según la reivindicación 2, en donde la matriz regular comprende una matriz tridimensional, subdividida además la matriz en filas, columnas y capas, y en donde cada elemento se **caracteriza** por una notación matricial X_{rcs} , cuyos índices dimensionales r, c y s, respectivamente, identifican elementos que comprenden una fila, una columna y una capa de la matriz.

4. Método según la reivindicación 3, en donde la fase de formación de subgrupos comprende además:

45 - formar subgrupos de partes alícuotas de muestras identificadas por índices r idénticos pero índices c y s diferentes;

- formar subgrupos de partes alícuotas de muestras identificadas por índices c idénticos pero índices r y s diferentes;

50 - formar subgrupos de partes alícuotas de muestras identificadas por índices s idénticos pero índices r y c diferentes;

y - evaluar cada uno de los subgrupos r, c y s para detectar una indicación de carga viral positiva devuelta mediante el análisis por PCR.

55 5. Método según la reivindicación 4, que comprende además las fases que consisten en:

- determinar el índice entero de cada subgrupo r que devuelve una indicación de carga viral positiva;

- determinar el índice entero de cada subgrupo c que devuelve una indicación de carga viral positiva; y

60 - determinar el índice entero de cada subgrupo s que devuelve una indicación de carga viral positiva.

65 6. Método según la reivindicación 5, que comprende además la fase que consiste en sustituir los índices enteros de cada subgrupo r, c y s que devuelve una indicación de carga viral positiva por los índices dimensionales r, c y s de la notación matricial identificando así un elemento único de la matriz definido por dicha notación matricial, identificando así de manera exclusiva la muestra de carga viral positiva correspondiente.

ES 2 319 937 T3

7. Método según la reivindicación 6, en donde la matriz tridimensional comprende una matriz regular de $8 \times 8 \times 8$, tomando cada índice dimensional r , c y s valores de números enteros del 1 al 8.

5 8. Método según la reivindicación 7, en donde se toman tres partes alícuotas de cada muestra correspondiente de donaciones de fluido biológico.

9. Método según la reivindicación 8, que comprende además las fases que consisten en:

10 - formar ocho subgrupos de filas, identificándose exclusivamente cada subgrupo de filas mediante un número entero comprendido entre 1 y 8, estando cada subgrupo de filas formado por 64 partes alícuotas de muestras;

15 - formar ocho subgrupos de columnas, identificándose exclusivamente cada subgrupo de columnas mediante un número entero comprendido entre 1 y 8, estando cada subgrupo de columnas formado por 64 partes alícuotas de muestras; y

- formar ocho subgrupos de capas, identificándose exclusivamente cada subgrupo de capas mediante un número entero comprendido entre 1 y 8, estando cada subgrupo de capas formado por 64 partes alícuotas de muestras.

20 10. Método para identificar de manera exclusiva donaciones de fluido biológico con carga viral positiva viral, comprendiendo el método las fases que consisten en:

- proporcionar una pluralidad de donaciones de fluido biológico;

25 - definir una matriz n -dimensional, donde n es un número entero, comprendiendo también la matriz una pluralidad de elementos internos, estando definido cada elemento por una intersección de n dimensiones de la matriz, siendo identificado cada elemento individual por una notación matricial correspondiente $X_{i,\dots,N}$, en donde el subíndice de la notación matricial define los índices dimensionales del conjunto;

30 - tomar N partes alícuotas de cada muestra de cada una de las donaciones de fluido biológico, estando el número de partes alícuotas tomadas de cada muestra definido por el número de índices dimensionales que comprende el grupo;

- formar subgrupos de las partes alícuotas de cada muestra, conteniendo cada subgrupo una parte alícuota de todas las muestras identificadas por una notación matricial en la que se fija un índice dimensional;

35 - analizar cada subgrupo mediante un análisis por PCR para detectar una indicación de carga viral; y

40 - evaluar los índices dimensionales de cada subgrupo que devuelve una indicación de carga viral positiva en el primer análisis por PCR, de acuerdo con una reducción mediante el método de menores, identificando la evaluación un elemento exclusivo definido por los índices dimensionales de cada subgrupo positivo si sólo un único subgrupo que represente cada índice dimensional devuelve una indicación de carga viral positiva, identificando así de manera inequívoca una muestra de carga viral positiva.

45 11. Método según la reivindicación 10, en donde la matriz es una matriz tridimensional regular, estando además la matriz subdividida en filas, columnas y capas, y en donde cada elemento se **caracteriza** por una notación matricial X_{rcs} , donde los índices dimensionales r , c y s , respectivamente, identifican elementos que comprenden una fila, una columna y una capa de la matriz.

50 12. Método según la reivindicación 11, en donde la evaluación de índices dimensionales identifica una pluralidad de elementos definidos por los índices dimensionales de cada subgrupo positivo si más de un subgrupo de un único índice dimensional devuelve una indicación de carga viral positiva, mientras que únicamente un solo subgrupo que representa cada uno de los índices dimensionales restantes devuelve una indicación de carga viral positiva, identificando así de manera inequívoca más de una muestra de carga viral positiva.

55 13. Método según la reivindicación 12, en donde la evaluación de índices dimensionales identifica elementos candidatos de carga viral positiva z^n si cada subgrupos que representa un índice dimensional devuelve una indicación de carga viral positiva, donde z representa el número real de muestras con carga viral positiva y donde n representa el número de dimensiones que tiene una pluralidad de subgrupos positivos.

60 14. Método según la reivindicación 13, que comprende además la fase que consiste en tomar una parte alícuota más de cada muestra identificada en cada elemento candidato con carga viral positiva z^n , analizar las partes alícuotas mediante un segundo análisis por PCR para detectar una indicación viral, e identificar de manera inequívoca todas las muestras con carga viral positiva.

65 15. Método según la reivindicación 11, en donde la fase de formación de subgrupos comprende también:

- formar subgrupos de partes alícuotas de muestras identificadas por índices r idénticos pero índices c y s diferentes;

- formar subgrupos de partes alícuotas de muestras identificadas por índices c idénticos pero índices r y s diferentes;

ES 2 319 937 T3

- formar subgrupos de partes alícuotas de muestras identificadas por índices s idénticos pero índices r y c diferentes;
y

5 - evaluar cada uno de los subgrupos r, c y s para detectar una indicación de carga viral positiva devuelta mediante el análisis por PCR.

16. Método según la reivindicación 15, que comprende además las fases que consisten en:

10 - determinar el índice entero de cada subgrupo r que devuelve una indicación de carga viral positiva;

- determinar el índice entero de cada subgrupo c que devuelve una indicación de carga viral positiva; y

- determinar el índice entero de cada subgrupo s que devuelve una indicación de carga viral positiva.

15 17. Método según la reivindicación 16, que comprende además la fase que consiste en sustituir los índices enteros de cada subgrupo r, c y s que devuelve una indicación de carga viral positiva por los índices dimensionales r, c y s de la notación matricial identificando un único elemento de la matriz definido por dicha notación matricial, identificando así de manera exclusiva la muestra de carga viral positiva correspondiente.

20 18. Método según la reivindicación 17, en donde la matriz tridimensional comprende una matriz regular de $8 \times 8 \times 8$, tomando cada índice dimensional r, c y s valores de números enteros del 1 al 8.

19. Método según la reivindicación 18, que comprende además las fases que consisten en:

25 - formar ocho subgrupos de filas, identificándose exclusivamente cada subgrupo de filas mediante un número entero comprendido entre 1 y 8, estando cada subgrupo de filas formado por 64 partes alícuotas de muestras;

30 - formar ocho subgrupos de columnas, identificándose exclusivamente cada subgrupo de columnas mediante un número entero comprendido entre 1 y 8, estando cada subgrupo de columnas formado por 64 partes alícuotas de muestras; y

- formar ocho subgrupos de capas, identificándose exclusivamente cada subgrupo de capas mediante un número entero comprendido entre 1 y 8, estando cada subgrupo de capas formado por 64 partes alícuotas de muestras.

35

40

45

50

55

60

65

Fig. 1

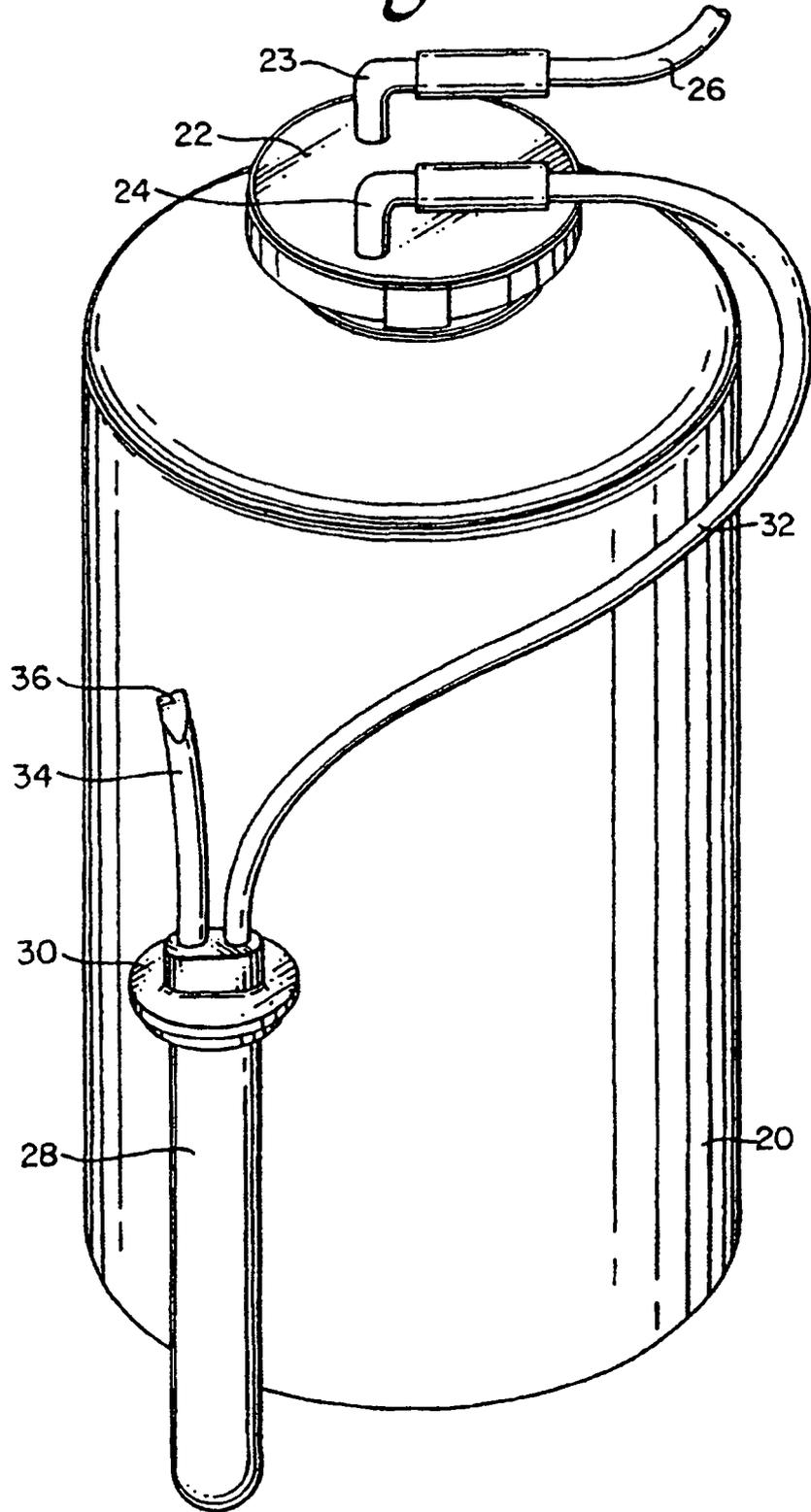


Fig. 2

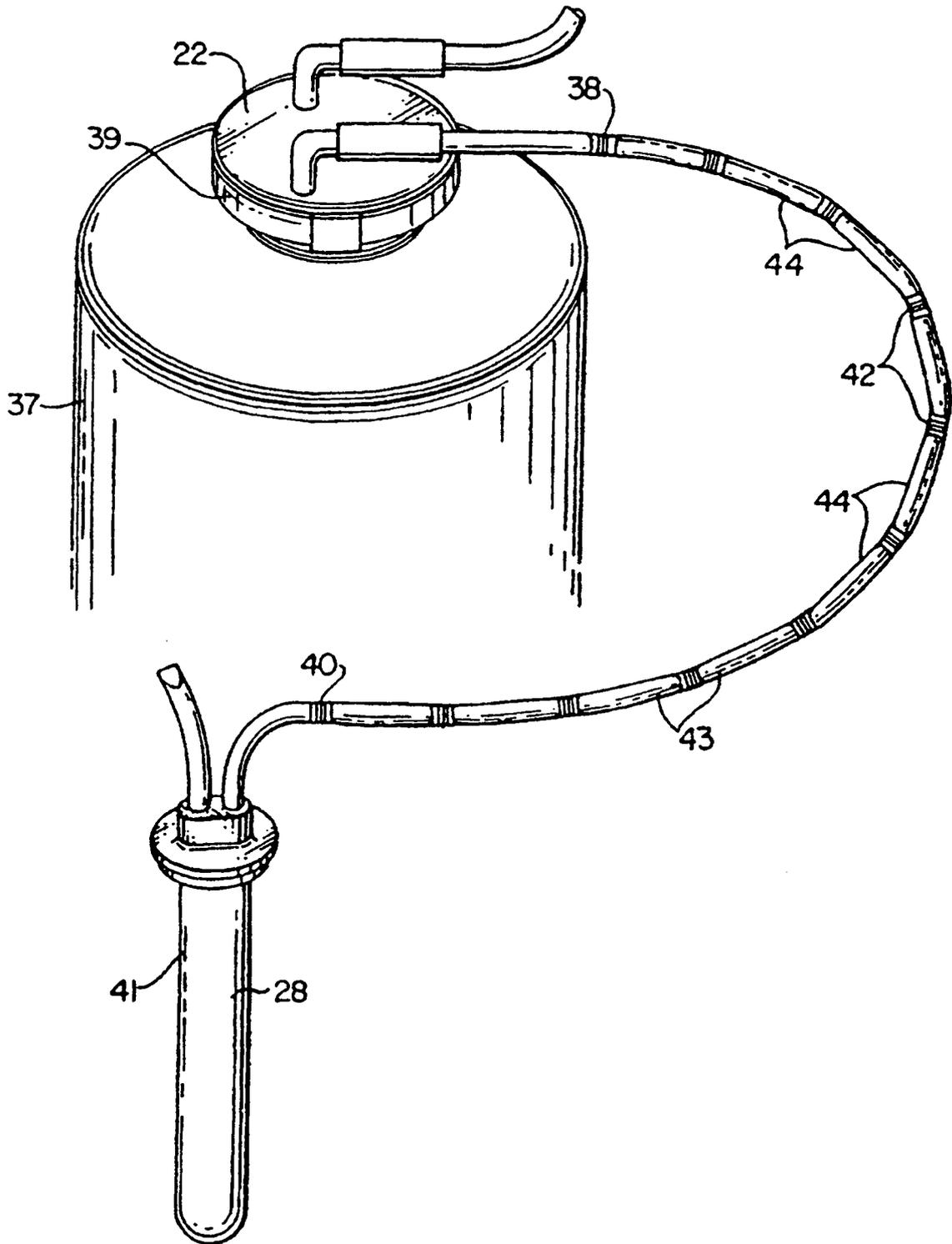


Fig. 2a

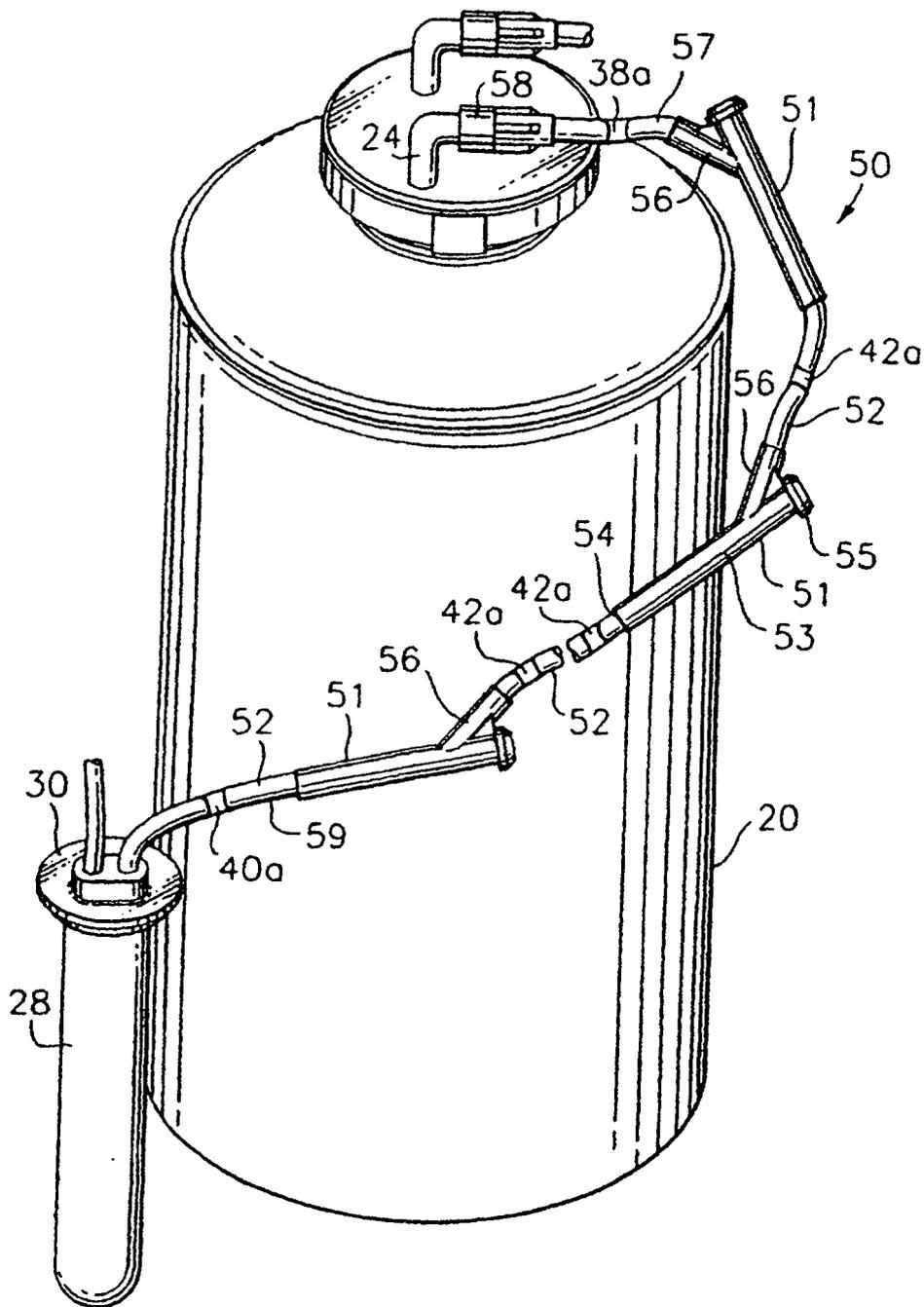


Fig. 3a

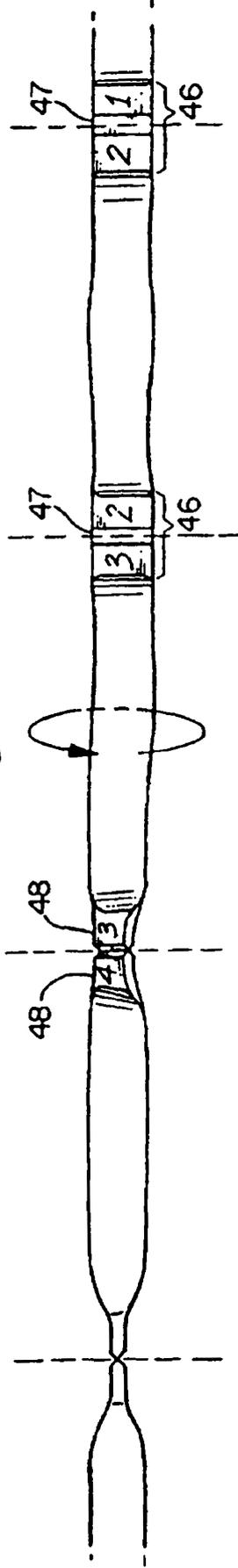
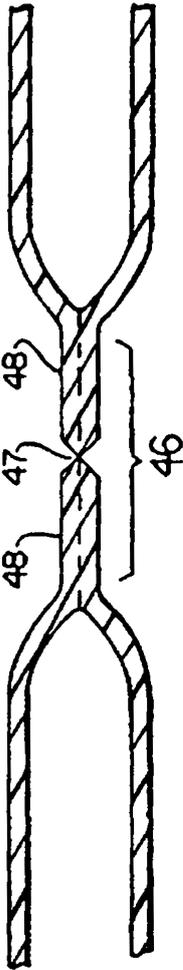
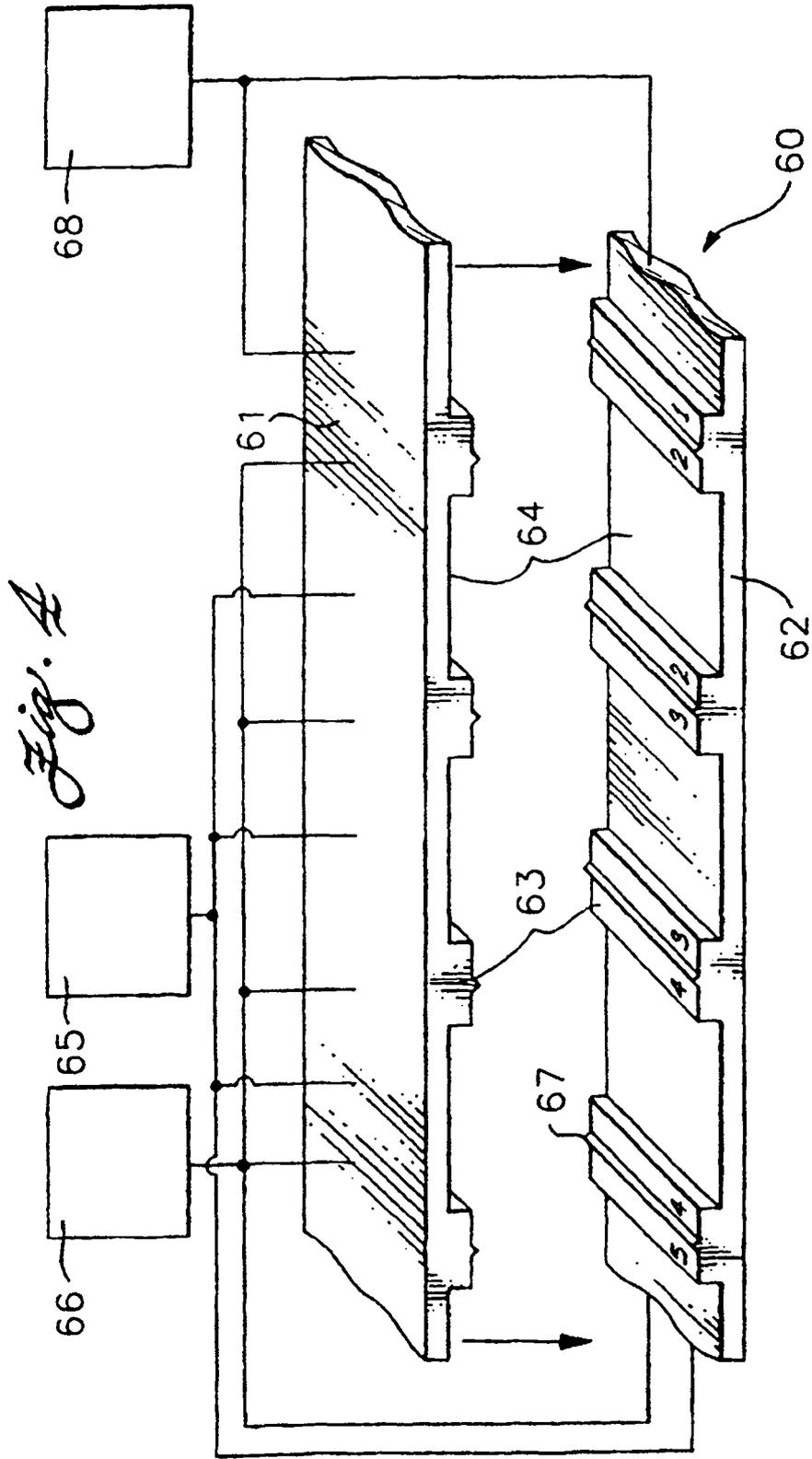
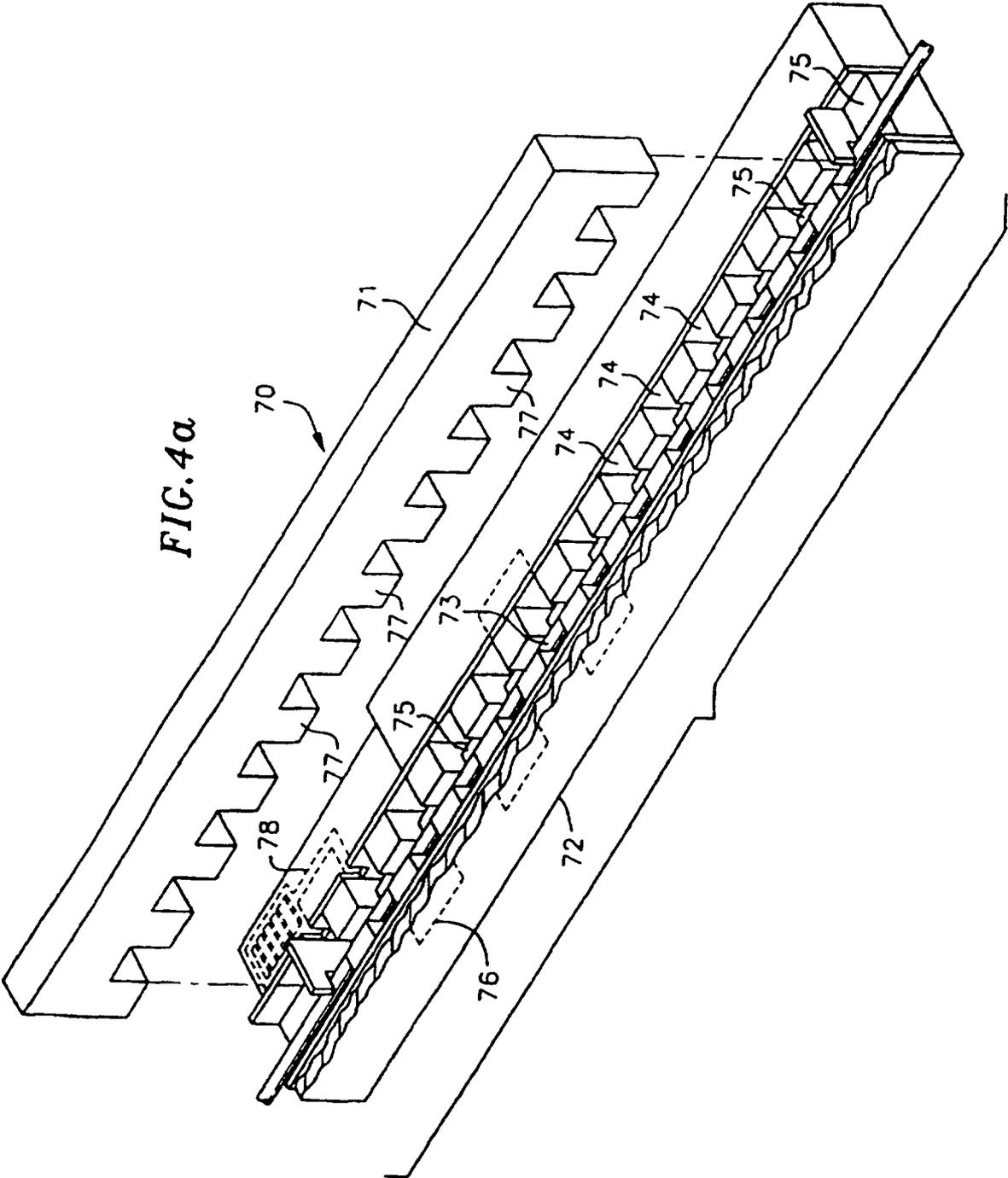


Fig. 3b







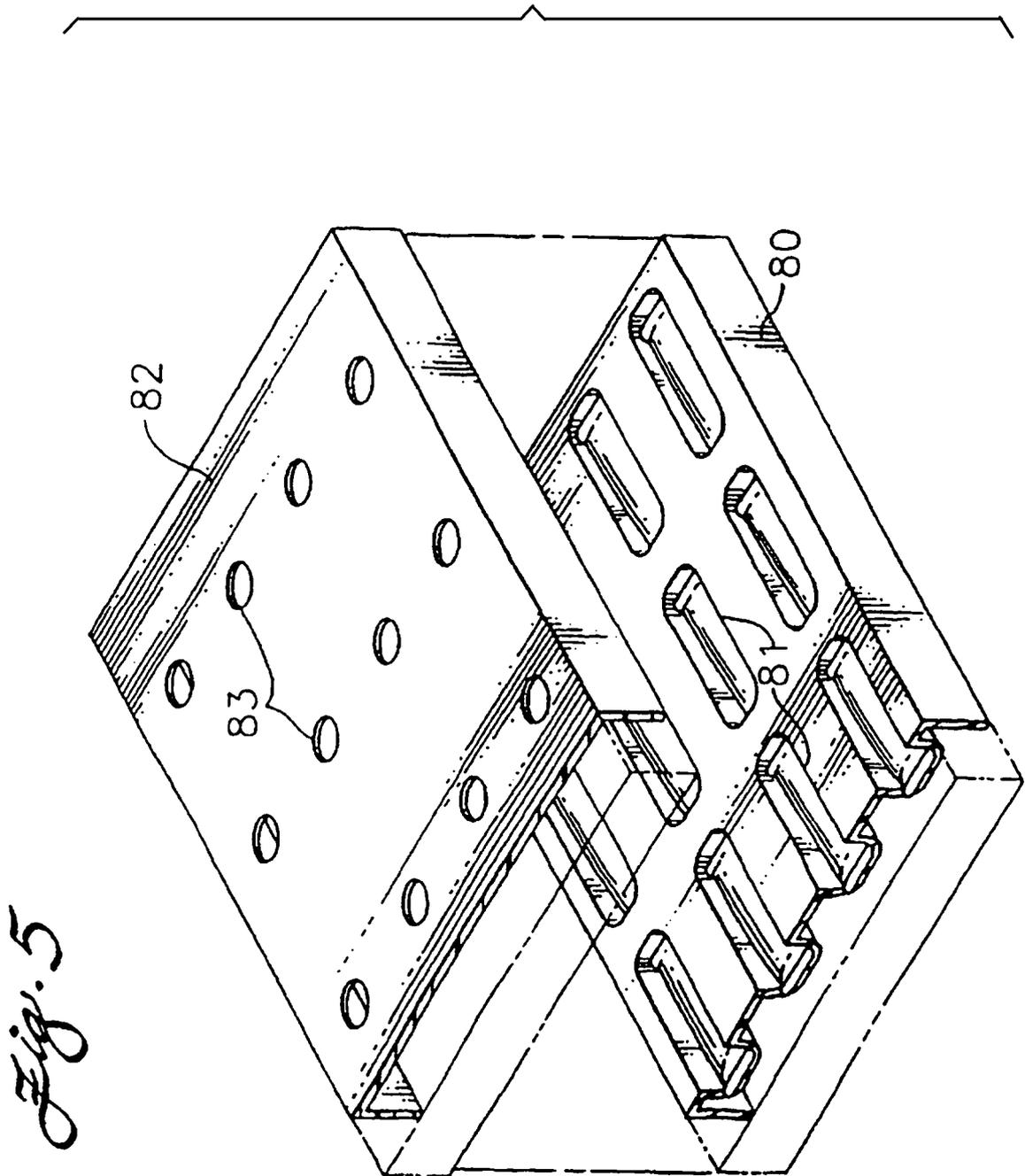


Fig. 5

Fig. 6

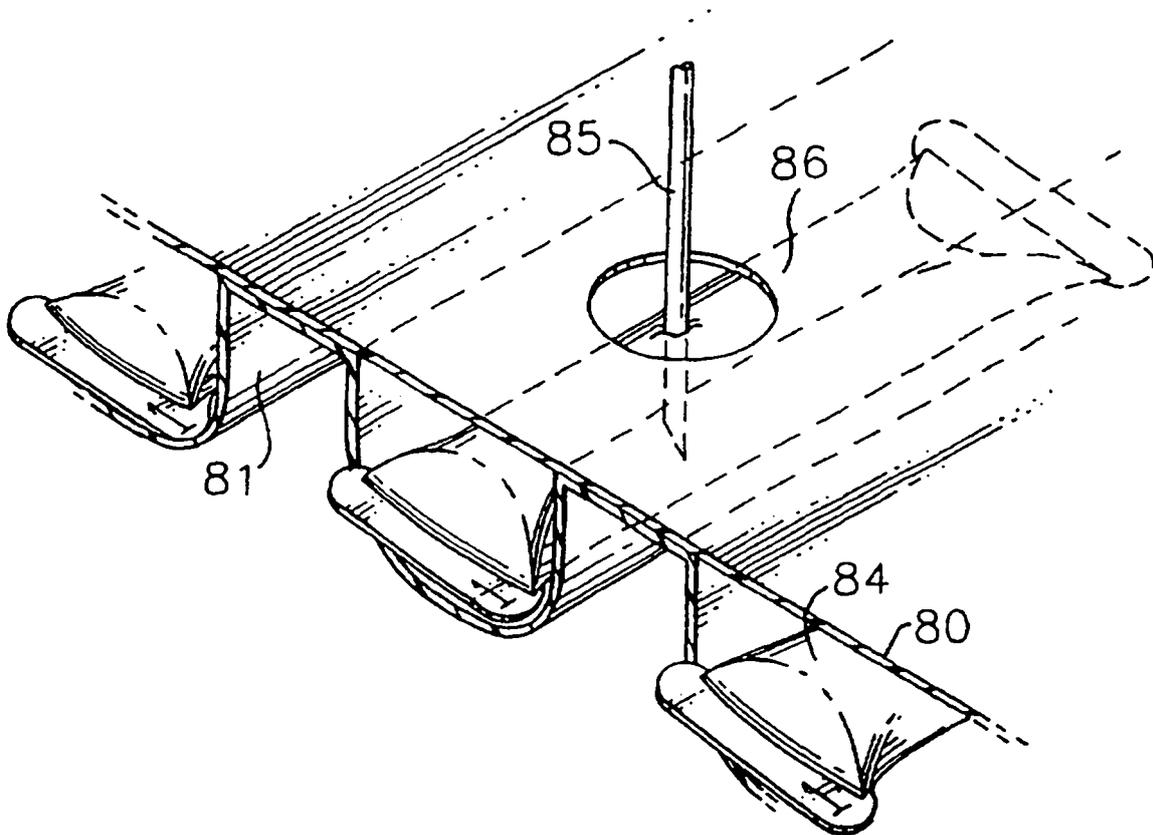


Fig. 7

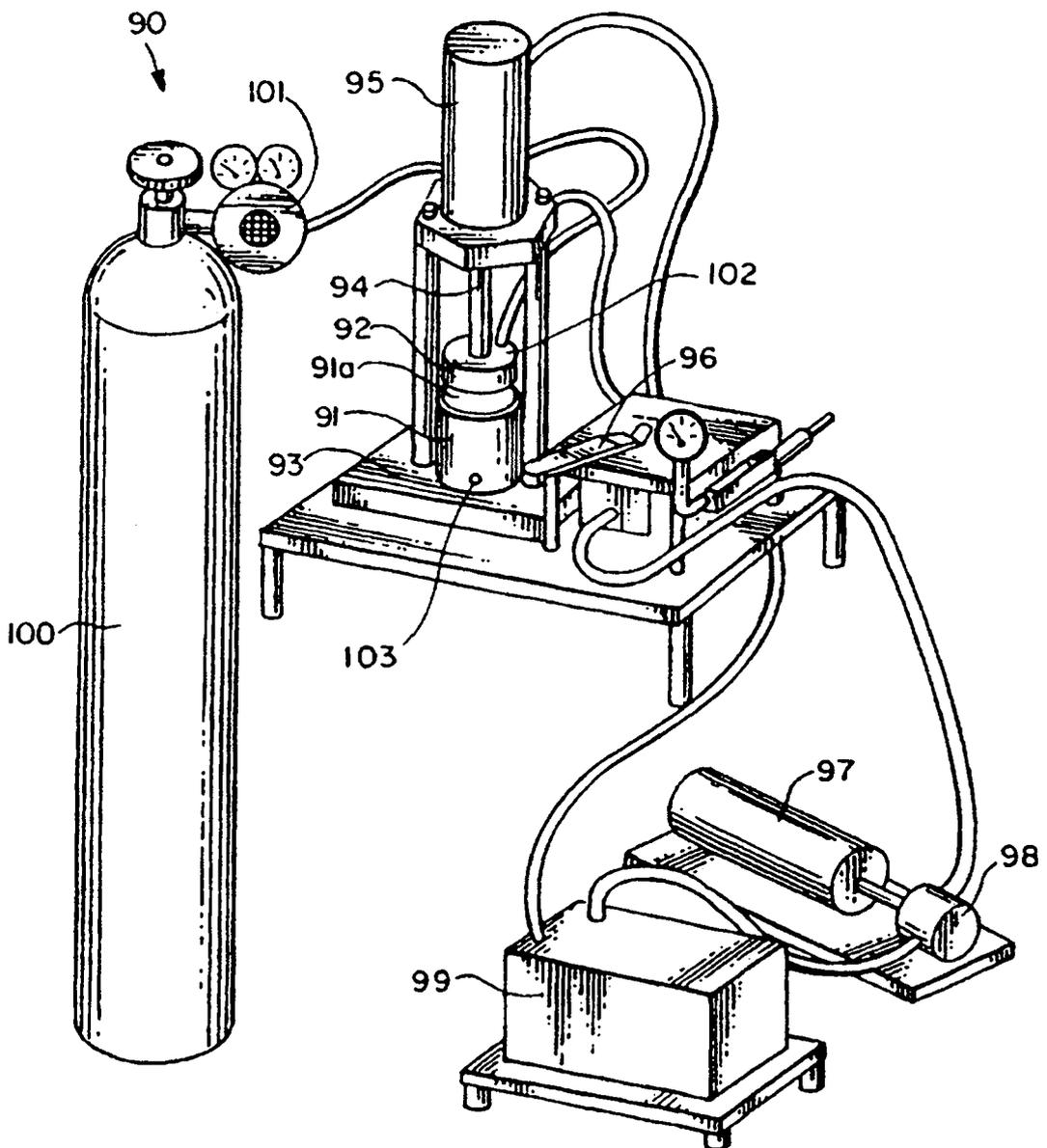


FIG. 8

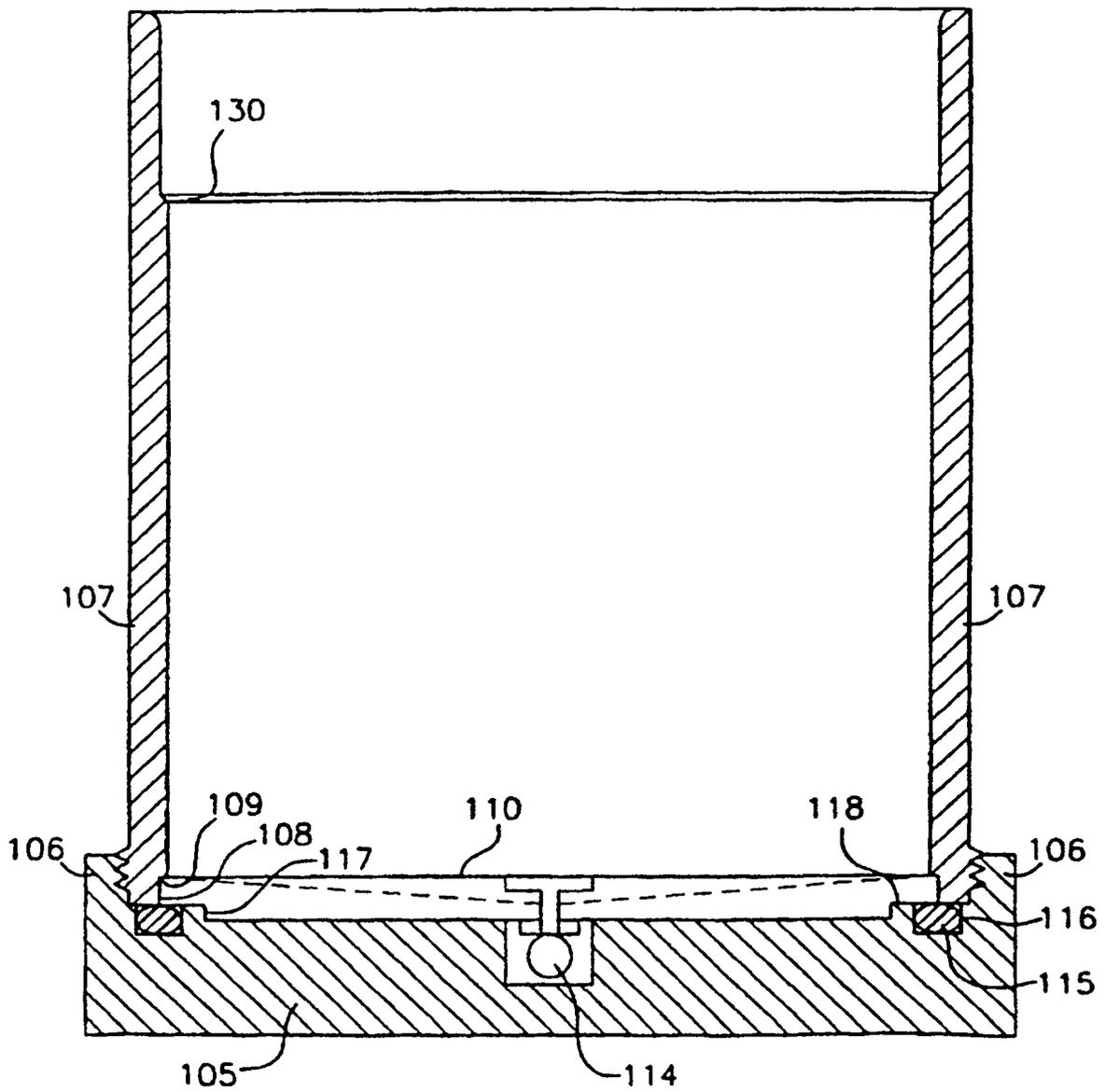


FIG. 9a

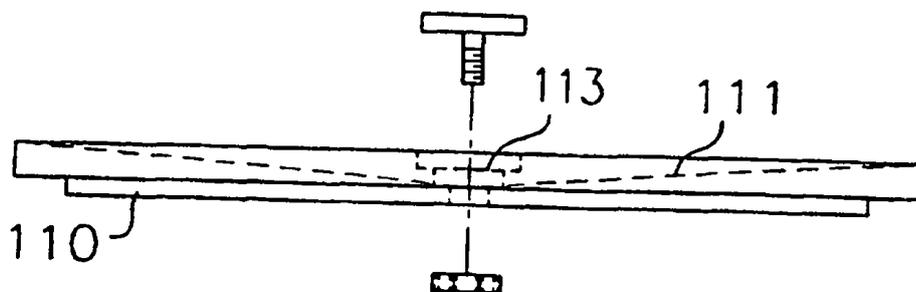


FIG. 9b

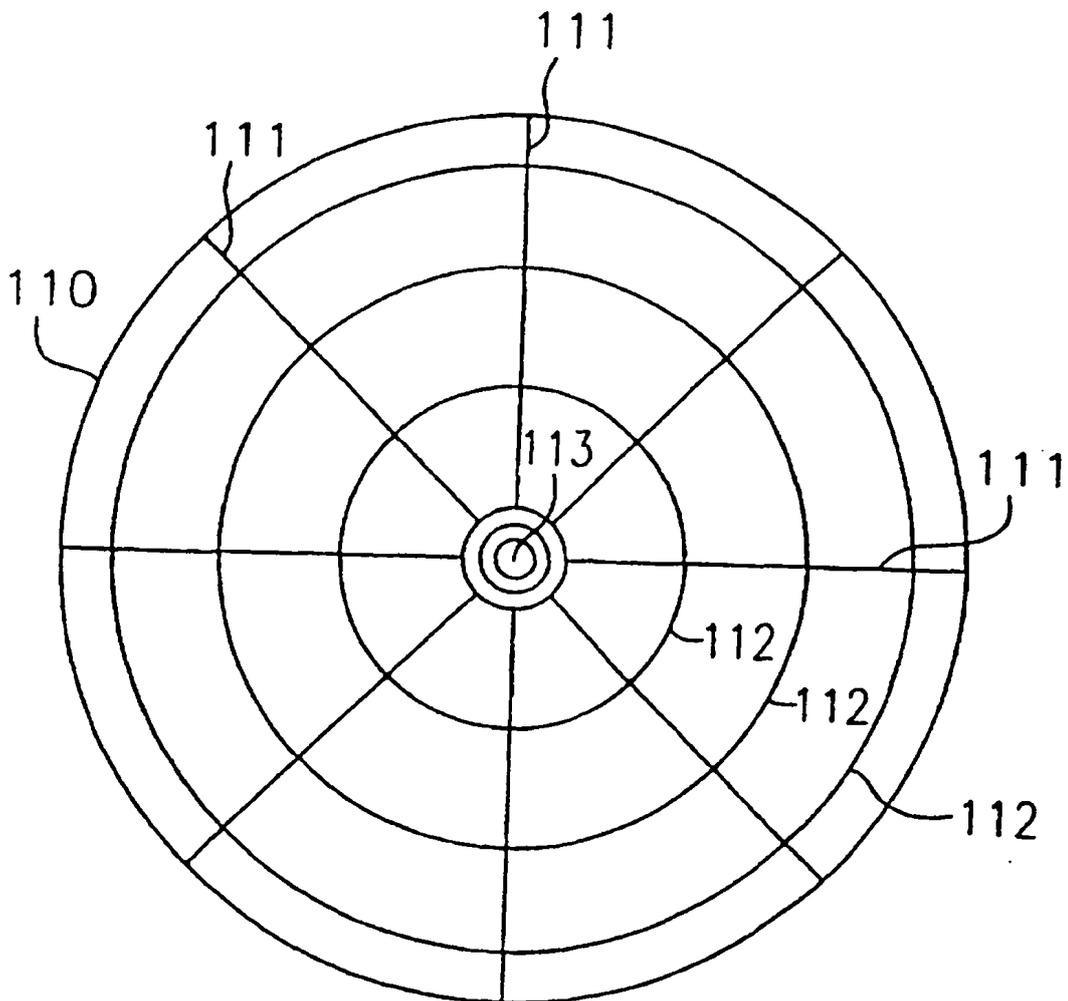


FIG. 10

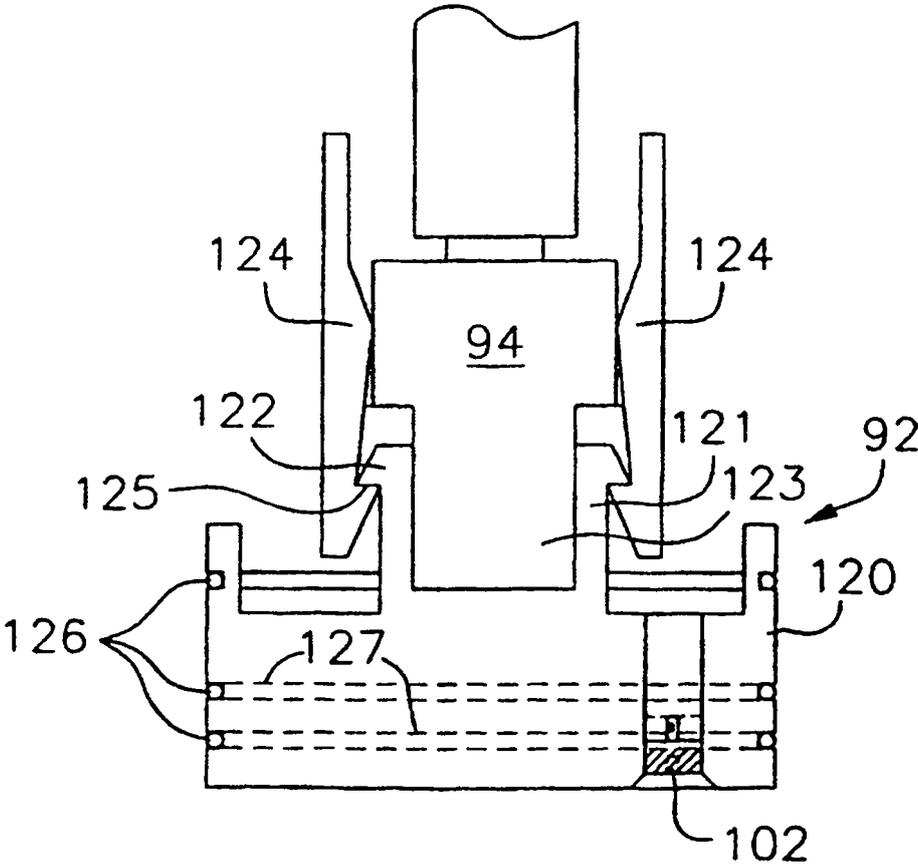


FIG. 11

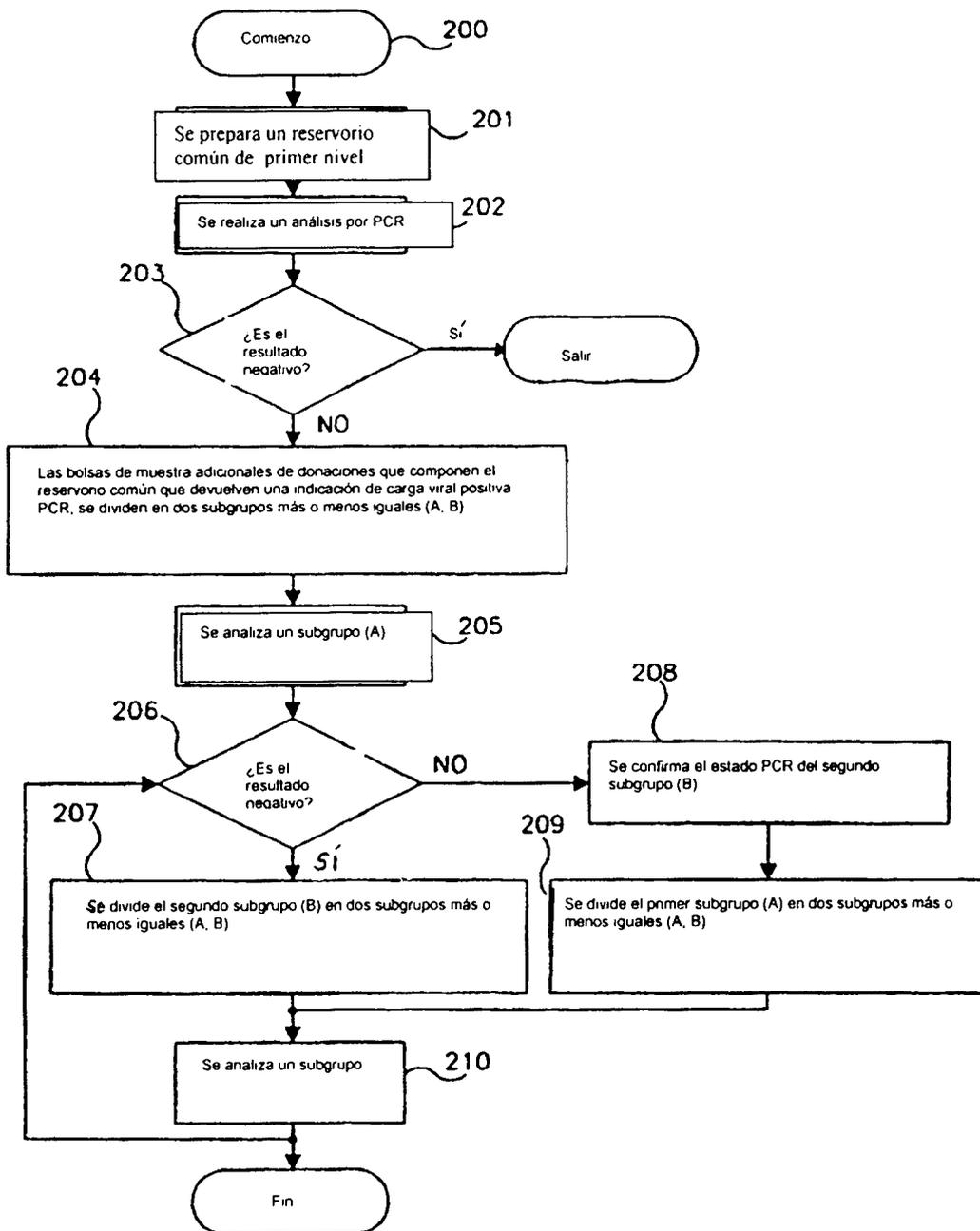


FIG. 12

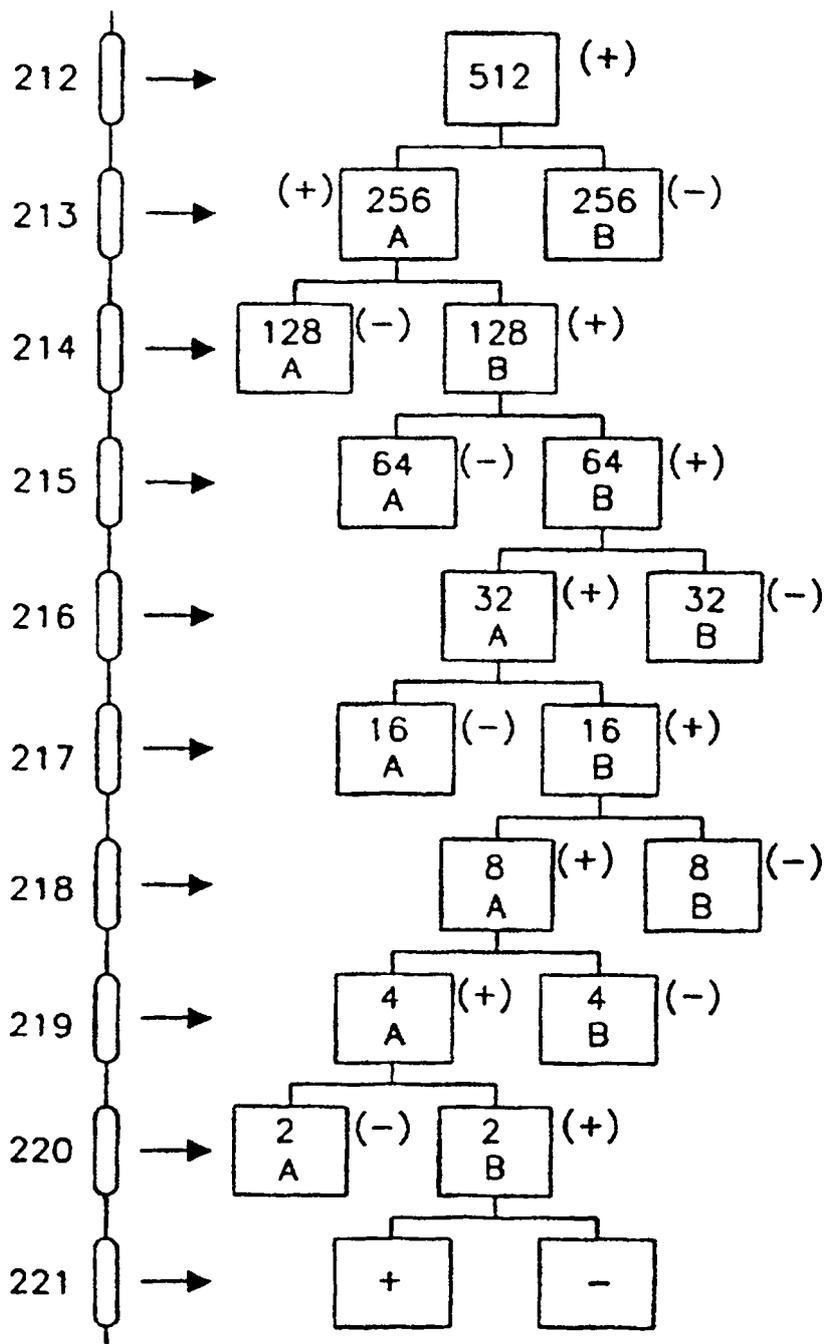


FIG. 13

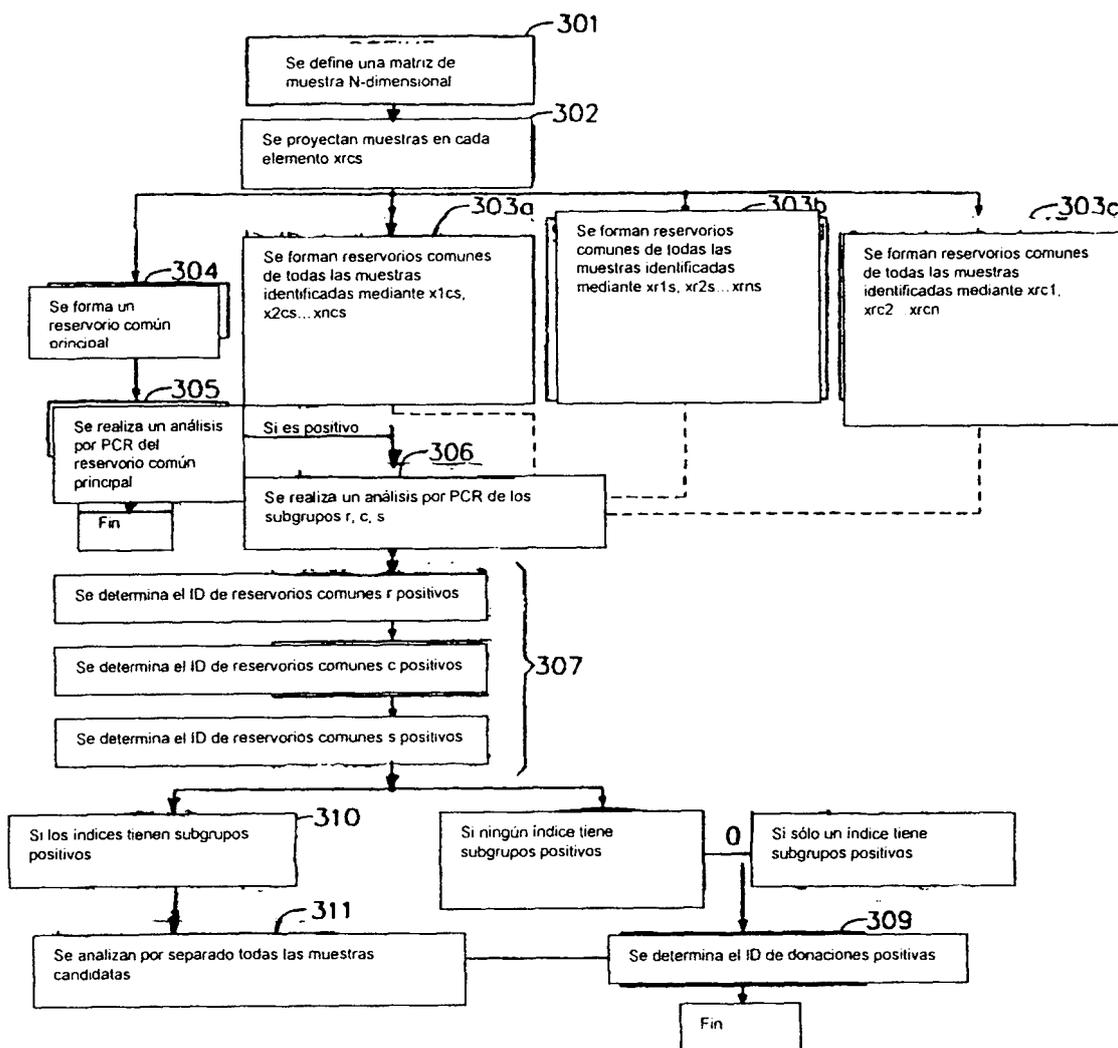


FIG. 14

