

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 396 238**

51 Int. Cl.:

G01N 33/558	(2006.01)	G01N 33/52	(2006.01)
B65D 65/46	(2006.01)	B03C 1/28	(2006.01)
B65D 81/32	(2006.01)	B01J 19/00	(2006.01)
B03C 1/01	(2006.01)		
C11D 17/06	(2006.01)		
G01N 33/543	(2006.01)		
C12N 15/10	(2006.01)		
B01L 3/00	(2006.01)		
B05D 7/22	(2006.01)		
B65D 83/00	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.06.2005 E 05857484 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.10.2012 EP 1765502**

54 Título: **Películas solubles y procedimientos que las incluyen**

30 Prioridad:

28.06.2004 US 582821 P

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

20.02.2013

73 Titular/es:

**BECTON, DICKINSON AND COMPANY (100.0%)
1 Becton Drive
Franklin Lakes, New Jersey 07417-1880, US**

72 Inventor/es:

**LIZZI, MICHAEL JUSTIN y
COPERTINO, DONALD W.**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 396 238 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

Películas solubles y procedimientos que las incluyen.

- 5 La presente invención se refiere a un procedimiento de introducción de una primera sustancia en un recipiente según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22 adjuntas o a un kit según la reivindicación 23.

En la siguiente exposición se describirán algunos artículos y procedimientos a modo de antecedentes e introducción.

- 10 Existen muchas disposiciones y procedimientos científicos e industriales que implican la introducción de cantidades bastante precisas de una o más sustancias en un recipiente. Dependiendo de varios factores tales como la naturaleza de la sustancia introducida, la construcción y las propiedades del recipiente, así como de la técnica utilizada para introducir estas sustancias, es un hecho frecuente que alguna sustancia introducida en el recipiente se pega a las paredes del recipiente de manera que impide que se combinen y/o que interactúen con otras sustancias en el recipiente. Cuando la naturaleza del proceso requiere cantidades precisas de diversas sustancias que van a combinarse, el problema de "pegado" anteriormente descrito puede tener un impacto significativo e indeseable en el resultado deseado del proceso.

- 15 Además, aunque la automatización es deseable en la introducción de sustancias, puede resultar difícil administrar con precisión pequeñas cantidades de sustancias. Así, cuando se demandan cantidades exactas de sustancias, es una práctica corriente medir e introducir estas sustancias en un recipiente a mano. Este procedimiento de trabajo intensivo es claramente inferior al ideal desde un punto de vista de la eficiencia.

- 20 Un ejemplo del tipo de proceso científico o industrial mencionado anteriormente es el aislamiento y/o la separación de los componentes biológicos de una muestra. Una forma de lograr este aislamiento y/o separación implica la introducción de una muestra biológica, partículas magnetizables, y posiblemente otras sustancias en un tubo, generalmente por gravedad o mediante una pipeta. Uno o más de los componentes biológicos presentes en el tubo llegan a asociarse con las partículas magnetizables. Se hace entonces que los imanes se pongan muy cerca de la(s) pared(es) del tubo(s) que produce(n) las partículas magnetizables, con el/los componente(s) biológico(s) unido(s) a las mismas, sea(n) atraído(s) a la(s) pared(es) del tubo. El resto de los constituyentes presentes en el tubo puede entonces retirarse, separando de este modo el/los componente(s) biológico(s). Pueden emplearse otras varias etapas del proceso para conseguir un objetivo deseado.

- 25 Las paredes del tubo y la punta de la pipeta a menudo poseen una carga superficial que puede atraer a sustancias a las mismas. Así, por ejemplo, la introducción de partículas magnetizables en el tubo plantea el problema descrito anteriormente de que a menudo pueden adherirse a las paredes del tubo o a la pipeta de manera que les impide se asocien adecuadamente con el resto de los constituyentes en el tubo. Además, incluso si se tiene cuidado para evitar el problema de la adherencia cuando las partículas se introducen por primera vez, el movimiento posterior del tubo con las partículas contenidas en el mismo puede provocar que las partículas sean lanzadas contra las paredes del tubo y se adhieren a las mismas. Dado que los procedimientos tales como el descrito anteriormente a menudo conllevan tamaños pequeños de muestras y/o basarse en cantidades exactas de las diferentes sustancias a mezclar a fin de producir un resultado deseable o preciso, el fenómeno de adherencia plantea un problema significativo en la precisión y fiabilidad en dichas técnicas de aislamiento y/o separación.

- 30 Por lo tanto, existe la necesidad en la técnica, en general de proporcionar arreglos y procedimientos que facilitan la introducción más precisa y la asociación de sustancias dentro de un recipiente. También existe la necesidad en la técnica de arreglos y procedimientos que favorezcan la introducción más precisa y eficiente y la asociación de sustancias implicadas en el aislamiento y/o la separación de los componentes biológicos de una muestra.

- 35 El documento US-A-4 522 923 describe un aparato y un procedimiento para realizar reacciones inmunoquímicas en una unidad autónoma sellada que requiere únicamente la adición de una muestra desconocida y agua. El aparato comprende un tubo de ensayo con tres cámaras por lo menos que contiene cada una diferentes productos químicos, incluyendo una esfera sólida, y separadas entre sí por una barrera soluble en agua.

- 40 El documento WO 03/040360 describe un sistema de suministro de muestras que incluye un soporte soluble en agua.

Descripción de la invención

- 45 La presente invención satisface las necesidades descritas anteriormente, y otras, proporcionando disposiciones y procedimientos que reducen, si no eliminan, la adherencia de una o más sustancias a una pared de un recipiente de una manera que impide su correcta asociación con otras sustancias y componentes dentro del recipiente. La presente invención también proporciona disposición y técnicas que facilitan la automatización. La presente invención proporciona además disposiciones y procedimientos que permitan que una cantidad precisa de una sustancia se introduzca en un recipiente.

Según un aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento como se ha definido en la reivindicación 1. Otros aspectos se definen en las reivindicaciones adjuntas.

5 Según otro aspecto, la presente invención proporciona un kit según la reivindicación 23 independiente.

Breve descripción de los dibujos

10 Las anteriores y otras características, aspectos y ventajas de la presente invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción, reivindicaciones adjuntas y las formas de realización ilustrativas mostradas en los dibujos, que se describen brevemente a continuación. Cabe señalar que, a menos que se especifique lo contrario, los elementos similares tienen los mismos números de referencia.

15 Las Figs. 1A-1G son ilustraciones esquemáticas de procesos y disposiciones según los principios de un primer aspecto de la presente invención.

Las Figs. 2A-2G son ilustraciones esquemáticas de otros procesos y disposiciones.

20 Las Figs. 3A-3F son ilustraciones esquemáticas de otros procesos y disposiciones practicables por la aplicación de los principios de la presente invención.

La Fig. 4 es una imagen de los resultados de un procedimiento de RCP llevado a cabo según un aspecto de la presente invención.

25 Los principios de la presente invención se describen además mediante la siguiente exposición de determinadas formas de realización ilustrativas de la misma y haciendo referencia a las figuras de los dibujos anteriores.

30 Como se utiliza en la presente memoria, "muestra biológica" significa cualquier sustancia que comprende un líquido o materia corporal incluyendo, pero sin limitarse a, sangre, plasma, suero, orina, aspirados de médula ósea, fluido espinal cerebral, tejido, células, alimentos, heces, saliva, pelo, secreciones orales, secreciones nasales, células bucales, lavado bronquial, fluidos cervicales, fluidos linfáticos, esputo y exudados de cualquiera de los anteriores. El líquido o materia corporal mencionado anteriormente puede recogerse de cualquier fuente. Por ejemplo, la fuente no está limitada a seres humanos.

35 Como se utiliza en la presente memoria, "partícula magnéticamente sensible" significa una partícula que es capaz de tener un momento magnético comunicado a la misma, o sino móvil bajo la acción de un campo magnético.

40 Como se utiliza en la presente memoria, "recubre" significa una orientación que, durante la utilización ordinaria o el campo de referencia, está verticalmente por encima del objeto o sustancia de referencia.

45 Como se utiliza en la presente memoria, "fácilmente soluble" se refiere a la capacidad de un material o película que se descompone cuando se pone en contacto con una(s) sustancia(s) seleccionada(s) en una cantidad, y hasta una medida, tal que el material puede utilizarse fácilmente en un proceso científico o industrial deseado sin causar demoras innecesarias. Por ejemplo, "fácilmente soluble" significa que los parámetros Hansen para un disolvente seleccionado están situados dentro del volumen o área de solubilidad del material, como se representa en un mapa de solubilidad de Hansen. Véase, por ejemplo, "Hansen Solubility Parameter System", DuPont Nylon Intermediates and Specialties, publicación W-400473, 12/2000.

50 Como se utiliza en la presente memoria, "no específicamente unido" significa un mecanismo de unión que no se produce a través de un receptor, agente de captura, o similar, que se acoplaría selectivamente con una sustancia diana específica.

55 Como se utiliza en la presente memoria, "específicamente unido" significa un mecanismo de unión que se produce mediante un receptor, agente de captura, o similar, que se acoplaría selectivamente con una sustancia diana específica.

60 Como se utiliza en la presente memoria, "película" significa un miembro con superficies principales opuestas. El término "película" no se pretende que esté restringido a una geometría o forma específica. Por ejemplo, la presente invención contempla que la película puede ser sustancialmente plana, o puede estar provista en forma de un polígono, esfera o cuerpo oblongo macizo o hueco. Los términos "película" y "membrana" se utilizan indistintamente en la presente memoria.

65 La película soluble utilizado en la presente invención puede tener cualquier composición adecuada siempre que consiga los objetivos funcionales descritos en la presente memoria. La película fácilmente soluble de la presente invención puede estar formada, por lo menos en parte, de conocidas sustancias solubles. Por ejemplo, cualquier material polimérico orgánico o inorgánico, o un material derivado de uno o más de dichos materiales, caracterizables

como fácilmente solubles podrían utilizarse. Dichas sustancias pueden incluir materiales a base de celulosa o derivados de celulosa tales como hidroxialquilmetil de baja viscosidad o carboximetilcelulosa. Otros materiales adecuados pueden incluir una combinación de monómero éster hidroxialquil carboxílico con un hidroxialquil (met)acrilato etoxilado o propoxilado, polietilenglicol (PEG) y alcohol de polivinilo (APV). También se contemplan formulaciones que contienen diferentes cantidades o combinaciones de las sustancias mencionadas anteriormente.

Se utilizan dichas sustancias conocidas, por ejemplo, para preparar películas solubles que se utilizan como portadores para agentes refrescantes del aliento. Dicha película se describe en la patente US nº 6.419.903. La película descrita en la misma se compone generalmente de una combinación de una hidroxialquilmetil celulosa de baja viscosidad, almidón y un agente aromatizante. Las películas utilizadas en relación con la presente invención opcionalmente pueden omitir componentes tales como agentes aromatizantes, colorantes, antibacterianos y refrescantes del aliento.

Las películas adecuadas para su uso en conjunción con la presente invención se pueden preparar por técnicas conocidas para los expertos en la materia, tal como la técnica descrita en la patente US nº 6.419.903. Una técnica adecuada generalmente implica la formación de una solución o suspensión que contiene los componentes constituyentes de la película, moldeando y secando la solución o suspensión para formar una película. Una vez seca la película puede cortarse en segmentos. Alternativamente, la película puede fundirse en continuo y acumularse en forma de rollo. La incorporación de sustancias o componentes en la película implica la producción de una película por cualquier técnica adecuada, y la incorporación de un componente o sustancia en la película a través de una técnica de aplicación en la superficie. Por ejemplo, la película puede estar en un estado en el que no esté completamente seca o se cura, el componente o la sustancia se introduce entonces sobre la superficie de la misma, y se completa el proceso de secado o curado. La película resultante comprende el componente en la superficie de la película o cerca de la misma. Las modificaciones de esta técnica son también posibles. Por ejemplo, una película completamente seca o curada puede formar el material de partida. La película seca o curada puede someterse a continuación a un proceso, tal como calentamiento o humectación, de tal manera que la superficie se modifica para aceptar más fácilmente el componente o sustancia. El componente o sustancia se puede añadir a continuación a la superficie modificada y la película se seca o se enfría para hacer una película que comprende el componente o sustancia incorporada en la misma a la superficie de la película. Alternativamente, una sustancia u otro componente, se puede aplicar simplemente a la superficie de una película completamente seca o curada. Una ventaja de la presente invención es que una cantidad de una sustancia que se ha liberado de la película y se ha introducido en un medio circundante y se controla con precisión controlando la concentración de la sustancia presente en la película, y el tamaño de la pieza de película utilizada.

Las películas utilizadas en relación con la presente invención puede incluir opcionalmente una fragancia. En ciertos procesos, tales como el análisis de muestras biológicas, la inclusión de un agente de fragancia puede enmascarar el olor con frecuencia emitida por dichas muestras, mejorando de este modo el entorno de trabajo.

A partir de la presente invención se aprecia que puede utilizarse o proporcionarse cualquier sustancia adecuada junto con la película soluble. Según una forma de realización, la película se utiliza junto con partículas sensibles al magnetismo. En esta forma de realización, las partículas sensibles al magnetismo pueden separarse de la película, o introducirse en la película de cualquier manera adecuada. Por ejemplo, como se ha descrito anteriormente, las partículas se pueden introducir en la solución o suspensión que forma la película de manera que durante la colada y el secado la película comprende partículas sensibles al magnetismo dispersas en su interior, y atrapadas por, una matriz soluble. Alternativamente, las partículas pueden incorporarse en la película mediante cualquiera de las técnicas de aplicación en superficie del tipo descrito anteriormente. Durante la disolución de la película, se liberan las partículas magnéticas, y pueden dispersarse, por ejemplo, en una sustancia o mezcla que actúa como disolvente.

Las partículas sensibles al magnetismo pueden estar revestidos o sin revestir, tratados o sin tratar, y/o carecen de cualquier tipo de modificación de la superficie. Las partículas sensibles al magnetismo de la presente invención puede estar diseñadas para unirse de forma específica o no específica a una sustancia diana. Las partículas sensibles al magnetismo se pueden unir a la sustancia diana mediante cualquier mecanismo adecuado, tal como la atracción electrostática. Dichas técnicas de unión se describen, por ejemplo, en las patentes US nº 5.973.138 y nº 6.433.160.

Las partículas sensibles al magnetismo adecuadas puede estar compuestas de óxido de hierro en formas tales como hidróxido férrico y óxido ferroso-férrico, que tienen poca solubilidad en un medio acuoso. Otras partículas de hierro tales como el sulfuro de hierro y el cloruro de hierro pueden ser también adecuadas para unirse a sustancias diana. Además, las partículas pueden estar compuestas de partículas sensibles al magnetismo recubiertas de sílice.

La sustancia puede comprender uno o más reactivos, tales como un agente de lisis o desnaturizante de proteínas, un disolvente aprótico, un agente alcalino o un tampón de neutralización. El/los reactivo(s) puede(n) utilizarse en forma líquida o seca. La sustancia también puede comprender uno o más componentes de reacción, tales como una sal, metal, enzima, oligonucleótido, cebador, ácido nucleico adicional o proteína. Los ejemplos de sales incluyen EDTA, cloruro de sodio y cloruro de potasio. Los ejemplos de metales incluyen magnesio, manganeso, calcio y otros

metales en vestigios. Además, la sustancia puede comprender un componente de estabilización o componentes de los medios.

5 La sustancia puede comprender un material (distinto de las partículas sensibles al magnetismo) que se utiliza para purificar, extraer, ampliar o detectar ácidos nucleicos u otros agentes biológicos. Dichos procedimientos y las sustancias se describen, por ejemplo, en las solicitudes de patente US nº 10/359.179 y nº 10/359.180. A este respecto, la sustancia puede comprender un material utilizado para unirse de manera reversible a un ácido nucleico tal como partículas de sílice, partículas recubiertas con sílice, membranas recubiertas de sílice, gel de sílice, superficies de sílice hidratadas e hidroxiladas, polvo de vidrio, esferas de fibra de vidrio, membranas de vidrio, zeolitas, cerámicas o partículas poliméricas revestidas con un óxido metálico o sal de hierro.

10 A partir de la presente invención se aprecia que una combinación de una o más sustancias se pueden utilizar junto con la película fácilmente soluble. Por ejemplo, puede utilizarse una combinación de una o más de las sustancias anteriormente descritas.

15 Cuando la sustancia está en forma de partículas, la forma de las partículas no es crítica para la presente invención. Las partículas pueden ser de diversas formas incluyendo, por ejemplo, esferas, cubos, oval, en forma de cápsula, en forma de comprimido, formas aleatorias no descritas, etc., y pueden ser de forma uniforme o de forma no uniforme. Las partículas también pueden tener cualquier tamaño adecuado. Por ejemplo, las partículas pueden tener un diámetro medio que oscila entre dimensiones submicrométricas y unos pocos micrómetros.

20 Una vez descritas varias formas de realización y características de la película utilizada en relación con la presente invención, varios ejemplos de procedimientos que utilizan la misma se describirán a continuación.

25 Una primera forma de realización de la presente invención se ilustra esquemáticamente en las figuras 1A-1G. Como se ilustra en las mismas, se proporciona un recipiente 10 que puede comprender una abertura adecuada 20 en el mismo. El recipiente 10 puede adoptar cualquier forma adecuada. Según la forma de realización ilustrada, el recipiente 10 puede ser generalmente en forma de un tubo. Sin embargo, se contemplan otras construcciones, tales como un micropocillo o una serie de micropocillos, una botella, o una placa de Petri. Una sustancia 30 se introduce primero en el recipiente (Fig. 1A). La sustancia 30 puede tener cualquier composición adecuada, tal como cualquiera de los materiales identificados anteriormente para su utilización junto con la película fácilmente soluble. Según una forma de realización de la presente invención, la sustancia 30 puede comprender partículas sensibles al magnetismo que tienen una composición y forma según la descripción anterior. Cualquier técnica adecuada puede utilizarse para introducir la sustancia 30. Por ejemplo, la sustancia 30 puede ser introducida a mano o con un dispositivo robótico automatizado.

30 Una película 40 fácilmente soluble se coloca a continuación sobre la abertura 20 del recipiente 10 (figura 1B). La película 40 puede presentar las composiciones y/o construcciones, descritas anteriormente en la presente memoria. La película 40 puede estar en la forma de un segmento que es lo suficientemente largo para atravesar la abertura 20, y preferentemente se extienden mucho más allá de los límites de la abertura 20. Alternativamente, la película 40 puede estar en forma de una banda "continua" o rollo de dicha película de tal manera que se alimenta a través de la abertura 20 (no se muestra). La película 40 se introduce entonces en el recipiente 10 por cualquier mecanismo adecuado (figura 1C y 1D). Según una forma de realización, la película 40 se introduce en el recipiente 10 por un dispositivo de émbolo/punzón 50.

35 La película 40 se coloca dentro del recipiente 10. La película 40 se puede colocar en cualquier posición adecuada en el recipiente 10. Según la forma de realización ilustrada, la película 40 se coloca de tal manera que está superpuesta a la sustancia 30. Cualesquier mecanismo o técnica adecuados pueden utilizarse para colocar la película 40 dentro del recipiente 10. Según la forma de realización ilustrada, la película 40 es impulsada hacia abajo en el recipiente 10 por el movimiento del dispositivo émbolo/punzón 50 en la dirección longitudinal indicada como D_1 (Figs. 1C y 1D). Una vez la película 40 se ha colocado adecuadamente, el dispositivo émbolo/punzón 50 se retira del recipiente 10 retirando del émbolo/dispositivo de punzón 50 en la dirección longitudinal D_2 opuesta (Figura 1E). Se contemplan otras técnicas o mecanismos para la colocación de la película 40. Por ejemplo, la película 40 puede cortarse en una pieza que tiene una dimensión adecuada y se alimenta por gravedad en el tubo, opcionalmente a través de una tolva o embudo. La película también puede doblarse antes de ser alimentada por gravedad en el tubo. Según otra alternativa, la película se corta en una dimensión específica, a continuación se introduce en el tubo mediante la utilización de una presión de vacío o con aire positiva. Por ejemplo, la película se corta por encima del tubo y se utiliza la presión positiva de aire para forzar que la película se corte hacia abajo en el tubo. Alternativamente, la película se corta en una posición alejada del tubo, un dispositivo de succión que emplea un vacío se utiliza para unir a la película y cambiar su posición próxima a la abertura del tubo. El vacío puede invertirse a continuación y forzar la película hacia abajo en el tubo con presión de aire positiva.

40 Como se muestra en la forma de realización ilustrada, la película 40 se superpone a la sustancia 30 de tal manera que la sustancia 30 resulta sustancialmente atrapada en el fondo del recipiente 10, con lo que se evita sustancialmente la mala colocación de la sustancia 30 impidiendo de este modo una dispersión no deseada de la sustancia 30 a lo largo de las paredes laterales del recipiente 10 (Figura 1E).

Se pueden realizar etapas posteriores opcionales en el contexto de la forma de realización anteriormente descrita. Por ejemplo, un material o mezcla 60 también se puede introducir en el recipiente 10 (Fig. 1F). El material o la mezcla 60 puede incluir opcionalmente una segunda sustancia 70. Se contempla que el material o la mezcla 60 puede incluir otras sustancias, además de la segunda sustancia 70. El material o mezcla 60 así como la segunda sustancia 70 puede tener cualquier forma o composición adecuada. Según una forma de realización, el material o mezcla 60 comprende una muestra biológica, y la segunda sustancia 70 comprende un componente constituyente de la misma, por ejemplo, células, microorganismos, ácidos nucleicos, proteínas, lípidos o hidratos de carbono. El material o mezcla 60 actúa como un disolvente disolviendo de este modo la película 40. El material o la mezcla 60 puede incluir opcionalmente uno o más reactivos añadidos combinados con los mismos. Tras la disolución de la película 40, la sustancia 30, que estaba atrapada previamente contra el fondo del recipiente 10 se libera y puede desembolsarse dentro del material o la mezcla 60 (figura 1G).

La descripción del procedimiento anterior, así como la siguiente descripción de procedimientos adicionales, se proporciona para comprensión. El alcance de la invención está limitado solamente por las reivindicaciones adjuntas.

Otro procedimiento se ilustra esquemáticamente en las figuras. 2A-2G. En general, este procedimiento ilustrado es sustancialmente similar a la forma de realización descrita anteriormente. Por lo tanto, los componentes constituyentes y las etapas descritas anteriormente en relación con la primera forma de realización expuesta anteriormente se debe atribuir a este procedimiento, también, a menos que explícitamente se indique lo contrario en la descripción siguiente. Como se ilustra, se proporciona un recipiente 10 adecuado, preferentemente con una abertura 20. Una película soluble 40' se coloca de tal manera que se superpone a la abertura 20 del recipiente 10 (Fig. 2B). La película soluble 40' es sustancialmente similar a la película soluble descrita anteriormente, con la siguiente distinción primaria. A saber, la película soluble 40' está formada de tal manera que una sustancia 30' se incorpora a la misma. La sustancia 30' puede ser la misma que la sustancia 30. Como se señaló anteriormente, una película que tiene esta construcción se puede formar por cualquier técnica adecuada. Por ejemplo, puede formarse una solución en suspensión que comprende un componente constituyente de la película soluble 40' incluyendo la sustancia 30'. Tras la colada y secado de la suspensión o solución, se proporciona una película soluble 40' que se compone de una matriz soluble que tiene sustancia 30' atrapada en su interior, y contenida en la matriz soluble. Alternativamente, la sustancia 30 puede incorporarse en una película por cualquiera de las técnicas de aplicación en superficie descritas anteriormente.

La película soluble 40' se introduce a continuación y se coloca en cualquier lugar adecuado dentro del recipiente 10 por cualquier mecanismo o técnica apropiado. Como se ilustra, la película soluble 40' puede introducirse y colocarse mediante un dispositivo de émbolo/punzón 50 desplazable longitudinalmente. El dispositivo de émbolo/punzón 50 está concebido para desplazarse en una primera dirección D_1 longitudinal (figura 2C y 2D). Una vez que la película soluble 40' se ha colocado adecuadamente dentro del recipiente 10, el dispositivo de émbolo/punzón 50 se retira mediante el movimiento en la dirección D_2 longitudinal opuesta (figura 2E). La película 40' también puede colocarse dentro del recipiente por alguna de las técnicas alternativas descritas anteriormente en relación con la primera realización. Como se ilustra en la figura 2E, la película soluble 40' se coloca en el fondo del recipiente 10, asegurando de este modo que la totalidad de la película 40' está en contacto con sustancias adicionales que pueden introducirse en el recipiente 10.

También se pueden realizar etapas adicionales opcionales junto con el procedimiento descrito anteriormente. A saber, tal como se describe en relación con la primera forma de realización ilustrada, el material o la mezcla 60 puede introducirse en el recipiente 10 (figura 2F). El material o la mezcla 60 puede incluir opcionalmente una segunda sustancia 70 contenida en el mismo. El material o de la mezcla 60 también puede incluir opcionalmente uno o más reactivos. El material o mezcla 60, así como la segunda sustancia 70, puede tener cualquier composición o forma adecuada. Según una forma de realización opcional, el material o la mezcla 60 comprende la muestra biológica, y la segunda sustancia 70 comprende un componente constante de la misma, por ejemplo, células, microorganismos, ácidos nucleicos, proteínas, lípidos, o carbohidratos. El material o mezcla 60 actúa como un disolvente, con lo que se rompe aparte la matriz soluble de la película 40', y la liberación de la sustancia 30'. Una vez liberada, la sustancia 30' puede desembolsarse dentro del material o de la mezcla 60.

Los principios anteriormente descritos de la presente invención pueden emplearse en numerosos contextos científicos e industriales diferentes. Hablando en general, los principios de la presente invención son útiles en cualquier disposición y/o procedimiento en el que se necesitan o se desean combinaciones de cantidades exactas de componentes constituyentes distintos.

Una posible aplicación de los principios de la presente invención es el aislamiento y/o la separación de componentes constituyentes contenidos en muestras biológicas. En este contexto, el recipiente 10 comprende un tubo de extracción, la sustancia 30 (o 30') comprende partículas sensibles al magnetismo, el material o la mezcla 60 comprende una muestra biológica, posiblemente en combinación con agentes o componentes adicionales, formando de este modo una mezcla, y la segunda sustancia 70 comprende un componente constituyente presente en la mezcla 60, por ejemplo, células, microorganismos o los ácidos nucleicos.

Los procedimientos descritos anteriormente en relación con la descripción de la forma de realización ilustrada en las figura 1A a 1G y del procedimiento ilustrado en las figura 2A-2G puede utilizarse como las etapas iniciales de dicha técnica de aislamiento o separación. Las figura 3A-3F ilustran de forma esquemática etapas adicionales que pueden realizarse junto con las etapas descritas anteriormente para llevar a cabo una técnica ilustrativa de aislamiento y/o de separación. Debe apreciarse que los principios de la presente invención pueden utilizarse con numerosos tipos de técnicas de extracción y/o aislamiento, y no debe considerarse que están restringidos por la descripción siguiente de la forma de realización ilustrada.

La mezcla 60, que comprende la sustancia 30 (o 30') y un componente de destino constituyente de la muestra biológica 70, formada como se ha descrito anteriormente, e ilustrada, por ejemplo, en la figura 1G y en la figura 2G, se manipula de tal manera que las partículas 30 sensibles al magnetismo y el componente 70 constituyente están unidos entre sí, formando de ese modo un complejo (figura 3A). Cualquier técnica adecuada puede ser utilizada para unir las partículas magnéticas 30 con el componente constituyente. Una de dichas técnicas implica la modificación del pH de la mezcla 60, alterando así las propiedades de atracción a la superficie de las partículas magnéticas 30 y/o del componente constituyente 70 de tal manera que la atracción mutua entre los mismos es suficiente para unir los dos. Uno o más imanes 80 se se aproximan a una o más paredes del recipiente, atrayendo de este modo el complejo descrito anteriormente a la(s) pared(es) del recipiente 10 que está sometido al campo magnético de los imanes 80 (figura 3B). El resto de la mezcla 60 puede entonces retirarse del recipiente, como se ilustra en la figura 3B. El complejo puede someterse a continuación a una o más etapas de lavado. Una vez que el resto se ha eliminado (figura 3C) un segundo material o mezcla 90 puede introducirse entonces en el recipiente 10. El segundo material o mezcla 90 puede comprender una solución de elución o mezcla que hace que las partículas magnéticas 30 y el componente 70 constituyente se disocien (Figura 3D). Los imanes 80, se puede aproximar mucho a una o más paredes del recipiente 10, como se ilustra en la figura 3E. El componente 70 constituyente puede entonces retirarse del recipiente y someterse a más etapas de tratamiento opcionales (figura 3E-3F).

Después de la etapa ilustrada en la figura 3F, el componente 70 constituyente puede someterse a procesos adicionales, tales como las técnicas para detectar y/o cuantificar analitos objetivo. Por ejemplo, cualquier procedimiento adecuado de amplificación puede utilizarse en los procedimientos de la invención. Dichos procedimientos incluyen, por ejemplo, la reacción en cadena de polimerasa ("RCP"), la amplificación por desplazamiento de cadena ("SDA"), la amplificación termofílica por desplazamiento de cadena ("tSDA"), replicación de secuencia autosostenida ("3SR"), amplificación basada en secuencia de ácido nucleico ("NASBA"), sistemas de Q β replicasa, reacción en cadena de la ligasa ("RCL") y amplificación mediada por transcripción ("AMT").

Después del cultivo o de la amplificación, puede realizarse un ensayo. Por ejemplo, se puede realizar un análisis para determinar la presencia de patógenos, tales como *Chlamydia trachomatis* (CT), *Neisseria gonorrhoeae* (GC), *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae*, familia *Chlamydiaceae*, virus del herpes simple 1, virus del herpes simple 2, Enterovirus, VIH, VHC, VHB, VHP, Virus del Nilo occidental, virus de la gripe A, de la gripe B, Virus del sincitio respiratorio, *Metapneumovirus*, Complejo directo de *Mycobacterium avium*, *Streptococcus* del grupo B, CMV cualitativo CMV cuantitativo, Paragripe 1/2/3, Adenovirus, *Legionella genus*, *Legionella micdadei*, *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, de la tuberculosis, de la confirmación del cultivo de la tuberculosis, de la confirmación del cultivo del complejo de *Mycobacterium avium* y de la confirmación del cultivo de *M. kansasii*. Las técnicas adecuadas para llevar a cabo este análisis incluyen la técnica incorporada en el producto BDProbeTec™ fabricado por Becton, Dickinson and Company. Además, se pueden realizar pruebas genéticas de los ácidos nucleicos presentes en una muestra.

Las etapas descritas anteriormente de las figura 1A-1G, 2A-2G y 3A-3F así como las técnicas de amplificación de mencionadas anteriormente puede llevarse a cabo manualmente, en automático o mediante una combinación de etapas manuales y automatizadas. Las etapas automatizadas se pueden realizar con un dispositivo robótico automatizado, que incluye opcionalmente la funcionalidad automatizada de pipeteado, mezclado y de colocación del imán. El dispositivo robótico automatizado puede estar controlado por ordenador. Por ejemplo, la presente invención puede utilizarse en relación con los sistemas y procedimientos del tipo descrito en la patente US nº 6.672.458.

Un kit útil en los procedimientos de la presente invención está definido por la reivindicación 23. La primera sustancia y la película fácilmente soluble están separadas. Un kit puede contener opcionalmente uno o más de los siguientes componentes descritos anteriormente en la presente memoria: reactivos; componentes de la reacción; componentes de estabilización; componentes de los medios; partículas sensibles al magnetismo y materiales que se unen reversiblemente al ácido nucleico. Opcionalmente asociadas a dichos kits pueden existir unas instrucciones en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de los productos, instrucciones que reflejan la aprobación por la agencia para la fabricación, el uso o la venta para la administración. El envase o kit puede ser una sola unidad de uso de los componentes o puede ser de varios usos.

Los principios de la presente invención se describirán a continuación haciendo referencia a los siguientes ejemplos ilustrativos, no limitativos.

Ejemplo 1

Se realizó un experimento para determinar la viabilidad de la incorporación de una película soluble en un proceso de detección de un analito objetivo. En particular, un ensayo de *Chlamydia trachomatis* (CT) o *Neisseria gonorrhoeae* (GC) se realizó como se describe a continuación y se hizo un análisis de los efectos de la inclusión de películas solubles en el proceso.

Se proporcionaron recipientes en forma de tubos de extracción con partículas sensibles al magnetismo en forma de partículas de hierro según las siguientes técnicas: (1) Aproximadamente 8 mg de partículas sensibles al magnetismo se distribuyeron en tubos múltiples de extracción a mano (como referencia), (2) Aproximadamente 8 mg de partículas sensibles al magnetismo se pipetearon en un tubo de extracción múltiple a mano, a continuación se cubrieron con una película soluble en la forma de las siguientes películas solubles adquiridas en el comercio: (a) tiras de Listerine Cool Mint®; (b) tiras de Listerine Fresh Burst® y (c) tiras de Listerine Cinnamon®; (3) una película soluble formada a partir de un material soluble de carboximetilcelulosa cargada con partículas de óxido de hierro. La densidad de las partículas de óxido de hierro presentes en la película es del orden de 8,89 mg/1,5 cm². Esta película cargada se introdujo a continuación en un tubo de extracción con un dispositivo de tipo de punzón/émbolo.

Una solución de hidróxido de potasio (KOH) se distribuyó en cada tubo de extracción que contiene las partículas sensibles al magnetismo. La solución de KOH de pH elevado se distribuyó mediante un dispositivo robótico automatizado, es decir, el extractor automatizado BD Viper™.

Las muestras de orina se distribuyeron a continuación en los tubos de extracción, también mediante el dispositivo robótico automatizado. Las muestras de orina se inyectaron hasta una concentración de 250 CT Ebs-250 GC partes/ml, y se mezclaron con una solución de pH elevado para lisar el/los organismo(s) de interés contenido(s) en la muestra, liberando de este modo el ácido nucleico. Una segunda solución con un pH bajo se añadió a la muestra que une el ácido nucleico liberado a las partículas sensibles al magnetismo. Esta solución contenía ácido sulfúrico.

Se aplicó un campo magnético a los contenidos del tubo de extracción. El dispositivo robótico automatizado llevaba un par de imanes opuestos muy cerca del exterior del tubo, extrayendo de este modo el complejo de la periferia interna del tubo. El dispositivo robótico automatizado a continuación, aspiró el contenido del tubo, dejando el complejo en el mismo, y el campo magnético se retiró del recipiente.

El complejo se lavó a continuación con una solución de concentración 1 mM que contenía 0,01% de Tween® 20. Después del lavado, se volvió a aplicar el campo magnético para extraer el complejo de la periferia interna del tubo, y el lavado se aspiró fuera del tubo.

Una solución tampón de elución se añadió a continuación al tubo de extracción, y se mezcló, para eluir el ácido nucleico del complejo. La solución tampón de elución estaba compuesta por una mezcla a base de una combinación de KOH y Bicina. El tampón de elución se añadió y se mezcló por el dispositivo robótico automatizado. El ácido nucleico de la muestra eluida se separó a continuación y se sometió al proceso de amplificación por desplazamiento de cadena (SDA) siguiente.

Un resto de unión específico al analito se unió al resto de oligonucleótido y se mezcló con el tampón de elución mencionado anteriormente. El tampón de elución que contiene la diana se añadió a los micropocillos de cebado que contenían cebadores de SDA CTpB4.S2.3, CTpB4.S1.3, o GCINT3.APR1, GCINT3.APL2, adaptadores ICAdpt.10, GCINT3.R2, o CTAdpt-F5, externos GCINT3.BR3, GCINT3.BL2 o CTpB4.B6, CTpB4.B7 y sondas indicadoras MPC-DR, MPC3.FD o MPC-DF. Después de 20 minutos a temperatura ambiente, la mezcla se calentó entre 72 y 73°C durante 10 minutos. Se añadieron a continuación 100 µl de la mezcla a 53,5-54,5°C a pocillos de amplificación. La amplificación. Específicamente, se utilizaron pocillos de amplificación BDProbeTec™ comercializados.

Se añadieron BsoB1 endonucleasa de restricción y Bst ADN polimerasa a los pocillos de amplificación y la amplificación isotérmica durante 60 minutos entre 51,2 y 52,80°C. El proceso de amplificación se controló con un lector BDProbeTec™, que detectaba el aumento fluorescente asociado a la conversión de la sonda indicadora. El lector produce valores MOTA (medida distinta de la aceleración) basados en la detección de la fluorescencia anteriormente descrita durante el proceso de amplificación. Los valores MOTA generados por las muestras descritas anteriormente se presentan a continuación en la Tabla I y la Tabla II.

Tabla I. Ensayo de CT con película soluble

Tubo	Valor MOTA medio
Referencia	41.643
Listerine Cool Mint®	30.740
Listerine Fresh Burst®	27.190
Listerine Cinnamon®	26.020
Película soluble cargada con óxido de hierro	28.605

Tabla II. Ensayo GC con película soluble

Tubo	Valor MOTA medio
Referencia	21.442
Listerine Cool Mint®	22.242
Listerine Fresh Burst®	32.318
Listerine Cinnamon®	24.199
Película soluble cargada con óxido de hierro	28.818

En el ensayo anteriormente descrito, MOTA los valores MOTA superiores a 2.000 se consideran indicadores de un resultado positivo para la CT o GC objetivo. Con estos criterios en mente, los datos publicados anteriormente indican que la inclusión de la película soluble en el proceso no inhibieron de manera significativa la extracción o la amplificación de la secuencia diana en la obtención de una indicación positiva de la presencia de la diana durante el ensayo.

Ejemplo 2

Se realizó un experimento para determinar la viabilidad de la incorporación de una película soluble en un proceso de amplificación y detección de una diana de ARN, a saber, una secuencia diana SARS Co-V, como se describe a continuación.

Se utilizó un tubo de referencia positiva SARS Co-V como objetivo para el ensayo de RT-SDA. El tubo de referencia positiva SARS Co-V contenía transcrito de ARN de referencia positiva SARS Co-V, ARN de levadura e inhibidor de RNasa. Se utilizó también referencia negativa SARS Co-V que contenía ARN de levadura e inhibidor de RNasa. Cada tubo con referencia SARS Co-V se volvió a hidratar con 950 µl de agua exenta de nucleasa y se agitó con remolinos.

Se preparó un tampón RT madre de trabajo mezclando los constituyentes principales agua exenta de nucleasa, inhibidor de RNasa, referencia interna de amplificación SARS Co-V, transcriptasa inversa, KOH y Bicina.

La película soluble utilizada en este experimento era carboximetilcelulosa transparente (sin óxido de hierro). La película se cortó en segmentos de distintos tamaños y se colocó en los micropocillos de cebado RT SARS Co-V que contienen nucleótidos dCsTP, dATP, dGTP, dTTP, cebadores SDA SARSrpC, SARfpC, adaptadores SARSiacadC SARSmpcadC, extremos SARScrtB24 y sondas indicadoras MPC-DR y MPC2.FD.

La referencia positiva o negativa y el tampón RT madre de trabajo RT se añadieron a cada uno de los respectivos micropocillos de cebado SARS Co-V RT. Una vez los micropocillos de cebado SARS Co-V RT se calentaron a 48°C durante 20 minutos un segundo tampón compuesto principalmente de Bicina y KOH se añadió a cada reacción. Los micropocillos de cebado SARS Co-V RT se calentaron a 72-73°C durante 10 minutos. Se añadieron a continuación 100 µl de la mezcla a pocillos de amplificación a 53,5-54,5°C.

Se añadieron BsoB1 endonucleasa de restricción y Bst ADN polimerasa a los pocillos de amplificación y la amplificación isotérmica durante 60 minutos entre 51,2 y 52,8°C. El proceso de amplificación se siguió con un lector BDProbeTec™, que detectaba el incremento fluorescente asociado a la conversión de la sonda indicadora. El lector produce valores MOTA basados en la detección de los valores de referencia descritos anteriormente durante el proceso de amplificación. Estos valores se miden a partir de 3 a 7 minutos después del inicio de la amplificación. Los valores MOTA generados para las muestras descritas anteriormente se presentan a continuación en la Tabla III.

Tabla III. Reacción RT-SDA con película soluble

Tamaño de película soluble	Valor MOTA medio
Ninguno (Referencia)	64.447
3X3 mm	77.269
4X4 mm	63.519
5X5 mm	68.779

5 Los datos publicados anteriormente indican que la inclusión de la película soluble en la reacción de RT-SDA no inhibió la transcripción inversa de ARN a ADN o la amplificación de la secuencia diana en la obtención de una indicación positiva de la presencia de la objetivo durante el ensayo.

Ejemplo 3

10 Se realizó un experimento para determinar la viabilidad de la inclusión de una película soluble en un procedimiento de amplificación por RCP, realizado como se describe a continuación. Un montaje del plásmido pUC19-*T. vaginalis* se utilizó como plantilla para el proceso de RCP.

15 La película utilizada en los experimentos fue de carboximetilcelulosa. La película se cortó en segmentos de diferentes tamaños y después se colocó en tubos de RCP con termopocillos, y se marcó como se expone a continuación.

Una matriz de tubos de RCP se crearon para llevar a cabo las siguientes reacciones expuestas en la Tabla IV.

20

Tabla IV. Preparación de la reacción de RCP

Tubo de reacción	Muestra
1	Referencia positiva de RCP (TV1) (sin película)
2	Referencia negativa de RCP (sin TV1) (sin película)
3	Referencia negativa de película (sin TV1) (2x4 mm)
4	RCP 1 de la prueba de la película (2x3 mm) (TV1)
5	RCP 2 de la prueba de la película (2x4 mm) (TV1)
6	RCP 3 de la prueba de la película (2x6 mm) (TV1)
7	RCP 4 de la prueba de la película (2x10 mm) (TV1)
8	RCP 5 de la prueba de la película (3x10 mm) (TV1)

Se preparó una solución de reacción 1 x RCP por adición a cada uno de los tubos. La solución se preparó según la composición de la Tabla V.

25

Tabla V. Composición de la solución de reacción RCP

Constituyente	Cantidad	Concentración	Fuente
<i>T. vaginalis</i> (TV1)	11,2 µl	89 ng/µl	Becton Dickinson
Tampón Pfu	100 µl	10x	Stratagene
DNTP	20 µl	10 mM	Stratagene
TV1 (cebador – 1)	10 µl	10 µM	IDT
TV2 (cebador – 2)	10 µl	10 µM	IDT
Enzima Pfu (clonada)	10 µl	2,5 U/µl	Stratagene
Agua	838,8 µl	n/a	Becton Dickinson
	TOTAL = 1000 µl		

Una alícuota de 98,88 µl de la 1x solución se introdujo en cada uno de los 8 tubos de reacción. Una carga de 1,12 µl de TV1 se añadió a los tubos 1, 4, 5, 6, 7 y 8, y 1,12 µl de agua se añadió a cada uno de los tubos 2 y 3. Los tubos se colocaron a continuación en un MJ Research Peltier Thermal Cycler (modelo PTC-200) y se incubaron en las condiciones detalladas en la Tabla VI:

5

Tabla VI. Condiciones de incubación

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
1	95°C	5 min	1
2	95°C	45 s	35
3	52°C	45 s	35
4	72°C	90 s	35
5	72°C	10 min	35
6	4°C	indefinido	n/a

10 Se realizó a continuación un análisis en gel del producto de reacción RCP para evaluar los resultados del proceso de amplificación por RCP. En este sentido, se preparó gel de agarosa al 1%. Se añadió bromuro de etidio hasta una concentración final de 0,5 µg/ml (10 µg si la solución madre es de 5 mg/ml en 100 ml de mezcla de agarosa). Se vertió una cantidad de 40 ml de gel y realizó a 90 V durante 1 hora en 1 x TBE según el programa establecido en la Tabla VII.

15

Tabla VII. Preparación de gel para RCP

Vía	Muestra	Comentarios
1	Hyperladder	5 µl de hyperladder
2	Referencia positiva de RCP (TV1)	10 µl de RCP + 1 µl 10x colorante de carga
3	Referencia negativa de RCP (sin TV1)	10 µl de RCP + 1 µl 10x colorante de carga
4	Referencia negativa de película (sin TV1) (2x4 mm)	10 µl de RCP + 1 µl 10x colorante de carga
5	RCP 1 de la prueba de la película (TV1) (2x3 mm)	10 µl de RCP + 1 µl 10x colorante de carga
6	RCP 2 de la prueba de la película (TV1) (2x4 mm)	10 µl de RCP + 1 µl 10x colorante de carga
7	RCP 3 de la prueba de la película (TV1) (2x6 mm)	10 µl de RCP + 1 µl 10x colorante de carga
8	RCP 4 de la prueba de la película (TV1) (2x10 mm)	10 µl de RCP + 1 µl 10x colorante de carga
9	RCP 5 de la prueba de la película (TV1) (3x10 mm)	10 µl de RCP + 1 µl 10x colorante de carga
10	RCP 6 de la prueba de la película (TV1) (2x6 mm)	10 µl de RCP + 1 µl 10x colorante de carga
11	Vacío	
12	Hyperladder	5 µl de hyperladder

20 Los resultados de la ejecución gel se ilustran en la figura 4, e indican un procedimiento logrado de RCP, lo que indica que la presencia de la película soluble no actuó como inhibidor o de otra manera interrumpir el procedimiento de RCP. Como se indica en la figura 4, la presencia de película soluble de un tamaño de hasta 30 mm² no inhibe el proceso de RCP.

Experimento para determinar la viabilidad de incorporación de una película soluble en un proceso de amplificación

25 Se realizó un experimento para determinar la viabilidad de la incorporación de una película soluble en un proceso de amplificación y la detección de una diana de ADN, a saber, secuencias diana de *Chlamydia trachomatis* (CT) o *Neisseria gonorrhoeae* (GC), como se describe a continuación.

30 Un tubo con referencia positiva CT/GC se utilizó como diana para los ensayos de CT/GC Diplex SDA. El tubo con referencia positiva CT/GC contenía plásmido de referencia positiva CT/GC, ADN de esperma de salmón y el control seco hacia abajo diluyente. Un negativo CT/GC control se utilizó también contiene ADN de esperma de salmón y diluyente de secado de referencia. Cada tubo de referencia CT/GC se rehidrató con 2 ml de diluyente de muestra y se agitó.

Todos los tubos de referencia se lisaron con calor a 114°C durante 30 minutos. Cada tubo de referencia a continuación se dejó enfriar durante por lo menos 15 minutos antes de la prueba.

5 La película soluble utilizada en este experimento era carboximetilcelulosa transparente (sin óxido de hierro). La película se cortó en segmentos de distintos tamaños y se colocó en los micropocillos de cebado de CT/GC que contenían cebadores de SDA CTpB4.S2.3, CTpB4.S1.3 o GCINT3.APR1, GCINT3.APL2, adaptadores ICAdpt. 10, GCINT3.R2 o CTAdpt-F5, externos GCINT3.BR3, GCINT3.BL2, CTpB4.B o CTpB4.B7 y sondas indicadoras MPC-DR, MPC3.FD o MPC-DF.

10 Se añadieron referencias positivas o negativas a cada uno de los micropocillos de cebado de CT/GC respectivos. Los micropocillos de cebado de CT/GC se calentaron a 72-73°C durante 10 minutos. 100 µl de la mezcla se añadió a continuación micropocillos de amplificación de CT/GC a 53,5-54,5°C.

15 Los micropocillos de amplificación se añadieron a continuación al lector BD ProbeTec™ modelo 1334 donde se llevó a cabo una amplificación isotérmica durante 60 minutos entre 51,2 y 52,8°C. El proceso de amplificación se siguió observando el aumento de fluorescencia asociado a la conversión del indicador probado. El lector produce valores MOTA basados en la detección de los valores de referencia descritos anteriormente durante el proceso de amplificación. Estos valores se miden a partir de 3 a 7 minutos después del comienzo de la amplificación. Los valores MOTA generados para las muestras descritas anteriormente se presentan a continuación en la Tabla VIII (CT) y en la Tabla IX (GC).

Tabla VIII. Valores MOTA para muestras de CT

CT								
<u>Referencia negativa</u>				<u>Referencia positiva</u>				
Sin película (referencia)	3x3 mm	4x4 mm	5x5 mm	Sin película (referencia)	3x3 mm	4x4 mm	5x5 mm	
500	830	0	500	54860	70590	62530	48860	
950	370	0	0	58520	68010	69850	59460	
300	440	0	0	55840	63250	76160	78750	
Media:	583	547	0	167	56407	67283	69513	62357
STDEV:	333	248	0	289	1895	3724	6821	15154

25 Tabla IX. Valores MOTA para muestras de GC

GC								
<u>Referencia negativa</u>				<u>Referencia positiva</u>				
Sin película (referencia)	3x3 mm	4x4 mm	5x5 mm	Sin película (referencia)	3x3 mm	4x4 mm	5x5 mm	
160	0	0	0	17680	23230	18210	40750	
370	0	0	0	26360	30270	22130	59710	
70	0	0	0	20090	30810	30470	43560	
Media:	200	0	0	0	21377	28103	23603	48007
STDEV:	154	0	0	0	4481	4229	6261	10232

30 Los datos mostrados anteriormente ilustran la viabilidad de la utilización de película soluble directamente en una reacción Diplex SDA. La inserción de la película directamente a los micropocillos de amplificación de SDA no inhibe la reacción.

Ejemplo 4

35 Se realizó un experimento para determinar si la película soluble podría interferir con el procedimiento de extracción. Un control de extracción (CE) es un oligonucleótido marcado incluido con la mezcla de extracción. La fluorescencia del marcador se controla para determinar si el proceso de extracción se realiza correctamente. Dos películas solubles (que contienen óxido de hierro) y dos tipos de partículas de óxido de hierro se ensayaron para determinar su efecto, si existe, en el proceso de extracción.

40 Los recipientes en forma de tubos de extracción se proporcionan con partículas sensibles al magnetismo según las siguientes técnicas: (1) Aproximadamente 9 mg de partículas de hierro (muestra de partículas A o muestra de

partículas B) distribuidas en el tubo de extracción, o (2) una película soluble (muestra de película A o muestra de película B) cargada con partículas de hierro a una concentración de 9,9 mg/1,77 cm². Los tubos de referencia positiva incluían el oligonucleótido de control de extracción marcado con fluorescencia, mientras que las referencias negativas no contenían control de extracción. El resto del proceso de extracción se completó como se describe en el Ejemplo 1. La fluorescencia del oligonucleótido CE marcado se midió entonces para determinar si la extracción se ha realizado correctamente. No se realizaron etapas de amplificación en las muestras.

Los resultados de la extracción se muestran en las Tablas X (CT) y XI (GC). Estas tablas ilustran una métrica CE que utiliza un valor de 0,5 para resultados positivos. Los valores inferiores a 0,5 se considera un resultado negativo.

Tabla X. Efecto de partículas de hierro en el proceso de extracción de CT

ENSAYO CON CT								
Muestra de película A		Muestra de polvo A		Muestra de película B		Muestra de polvo B		
con/EC	con/sin EC	con/EC	con/sin EC	con/ EC	con/sin EC	con/EC	con/sin EC	
0,7	0,2	0,7	0,2	0,7	0,3	0,7	0,2	
0,6	0,2	0,8	0,2	0,8	0,2	0,8	0,2	
0,7	0,3	0,7	0,2	0,7	0,2	0,7	0,2	
0,8	0,3	0,7	0,2	0,7	0,3	0,7	0,2	
0,8	0,2	0,8	0,2	0,8	0,2	0,7	0,2	
0,8	0,2	0,7	0,2	0,6	0,2	0,8	0,2	
0,9	0,2	0,8	0,2	0,7	0,3	0,7	0,2	
0,9	0,2	0,7	0,2	0,6	0,3	0,7	0,2	
0,6	0,2	0,7	0,2	0,8	0,2	0,7	0,2	
0,8	0,2	0,7	0,2	0,8	0,3	0,9	0,2	
0,7	0,2	0,7	0,2	0,8	0,2	0,7	0,2	
0,7	0,2	0,7	0,2	0,9	0,2	0,7	0,2	
Promedio:	0,8	0,2	0,7	0,2	0,7	0,2	0,7	0,2

Tabla XI. Efecto de partículas de hierro en el proceso de extracción de GC

ENSAYO CON GC								
Muestra de película A		Muestra de polvo A		Muestra de película B		Muestra de polvo B		
con/EC	con/sin EC	con/EC	con/sin EC	con/ EC	con/sin EC	con/EC	con/sin EC	
0,6	0,2	0,7	0,2	0,9	0,3	0,7	0,2	
0,7	0,2	0,6	0,2	0,8	0,2	0,8	0,2	
0,7	0,3	0,7	0,2	0,7	0,3	0,7	0,2	
0,8	0,3	0,7	0,2	0,7	0,3	0,7	0,2	
0,8	0,3	0,9	0,2	0,8	0,3	0,8	0,2	
0,9	0,2	0,8	0,2	0,6	0,2	1,0	0,3	
0,8	0,3	0,9	0,2	0,7	0,3	0,7	0,3	
0,9	0,3	0,9	0,2	0,6	0,3	0,9	0,2	
0,7	0,3	0,8	0,2	0,8	0,3	0,8	0,2	
0,8	0,3	0,9	0,2	0,9	0,2	0,9	0,2	
0,8	0,3	0,7	0,2	0,8	0,3	0,8	0,2	
0,8	0,2	0,9	0,2	1,0	0,2	0,7	0,2	
Promedio:	0,8	0,3	0,8	0,2	0,8	0,3	0,8	0,2

Los datos ilustran la falta de efectos adversos sobre la capacidad de extraer el control de extracción con la incorporación de partículas de hierro, ya sea incrustado en película soluble o como partículas exentas de hierro. Los valores positivos promedio registrados para todas las muestras de película soluble (0,7 y 0,8) indican un proceso de extracción con éxito.

Ejemplo 5

5 Se realizó un experimento para determinar la viabilidad de incorporar la película soluble en un procedimiento de detección de un analito diana en diferentes tipos de muestras. En particular, un ensayo para CT o CG se realizó como se describe a continuación. Se realizó un análisis de los efectos de la película soluble.

10 Se utilizaron cuatro tipos de muestras en el presente ensayo: orina, diluyente de muestra, orina clínica y exudados vaginales. Una muestra de "orina" es un conjunto de muestras internas obtenidas de donantes sanos. "Diluyente de muestra" se refiere a un tampón de muestra BD ProbeTec™ actual que se utiliza para rehidratar los tubos de referencia, así como la matriz en la que se expresan los exudados. "La orina clínica" se refiere a las muestras de orina obtenidas de personas que han sido diagnosticadas de una afección o enfermedad. Los tubos de extracción se proporcionaron con partículas sensibles al magnetismo en forma de uno de dos tipos de películas solubles (Película A de muestra y película B de muestra) cargadas con partículas de óxido de hierro a las concentraciones de 9,7 mg/1,77 cm² y 10,6 mg/cm², respectivamente. Las muestras se extrajeron y se amplificó tal como se describe en el Ejemplo 1. Los valores MOTA generados para las muestras descritas anteriormente se presentan a continuación en las Tablas XII y XIII.

20 Tabla XII. Evaluación de Ensayo de CT en diferentes tipos de muestra

		ENSAYO DE CT							
Muestra matriz:	Diluyente de muestra	Orina clínica		Orina		Exudados vaginales			
Muestra Película Tipo:	A	B	A	B	A	B	A	B	
	37040	20060	16410	23450	20240	41760	41110	25800	
	9010	17170	31540	9350	15020	21860	50930	29370	
	25110	25180	13760	24860	34290	19750	41340	68720	
	11570	29080	41780	16900	18920	21380	46100	28210	
	18860	10380	43450	26910	13680	28000	47110	23030	
	27610	22440	15500	33470	11930	9320	64920	25010	
	15040	21410	15660	11530	14780	36460	17160	18500	
	28580	18650	20940	31230	17920	20200	23730	37400	
	19590	35620	61010	61900	39110	21010	29230	50110	
	9890	15320	10770	13450	11030	18690	32130	29460	
	23970	10210	16710	14460	32700	29110	22800	16320	
	11990	12890	31600	32300	16800	9940	51360	30030	
Promedio:	19855	19868	26594	24984	20535	23123	38993	31830	

Tabla XIII. Evaluación de Ensayo de GC en diferentes tipos de muestra

		ENSAYO DE GC							
Muestra matriz:	Diluyente de muestra		Orina clínica		Orina		Exudados vaginales		
Muestra Película Tipo:	A	B	A	B	A	B	A	B	
	15020	28380	18860	14510	24650	15710	14610	11420	
	12130	13440	16240	9720	17760	37330	29670	14460	
	15650	11260	9600	15460	22280	30170	13870	21400	
	19440	16920	24540	15540	19640	47410	9020	15600	
	22420	15470	35040	25600	27810	28570	7820	10040	
	12540	18220	40590	24420	22540	34940	14170	13310	

		ENSAYO DE GC							
Muestra Diluyente de muestra matriz:		Orina clínica		Orina		Exudados vaginales			
Muestra Película Tipo:	A	B	A	B	A	B	A	B	
	28360	30320	17860	23140	58940	20230	13670	20250	
	17260	12160	20960	15690	32060	16390	18480	24100	
	22000	15580	13750	9170	17060	20170	10620	18990	
	17380	10640	29850	9780	10480	13230	9720	16590	
	15220	15920	17190	13580	11090	26180	12850	16210	
	17570	12450	15140	36990	11040	16110	11600	27910	
Promedio:	17916	16730	21635	17800	22946	25537	13842	17523	

Los datos anteriores muestran que la inclusión de cualquier tipo de película soluble no inhibe significativamente la extracción o la amplificación de la secuencia diana en cualquiera de los cuatro tipos de muestras.

5 Ejemplo 6

Se realizó un experimento para determinar si las partículas sensibles al magnetismo, en forma de hierro en polvo o película soluble, interferirían en el proceso de detección de un analito diana. El experimento evaluó el efecto de la película soluble tanto en un sistema monoplex y diplex SDA. En particular, se realizó un ensayo para CT que utiliza diluyente de muestra y muestras de mezcla de orina como se describe a continuación.

En un ensayo de monoplex, una sonda de detector universal se utiliza para la detección en tiempo real de transferencia de energía de fluorescencia de una diana. Un ensayo diplex utiliza un control de amplificación interno (CAI) además de la sonda detectora. El CAI se amplía junto con el ADN diana para identificar las muestras que pueden contener inhibidores de la reacción de SDA.

En el presente ejemplo, se proporcionaron los tubos de extracción con partículas de hierro en forma de hierro en polvo libre o una película soluble cargado con partículas de hierro a una concentración de aproximadamente 9,0 mg/1,77 cm². Las muestras se extrajeron y se ampliaron tal como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 1. Los resultados se muestran en las Tablas XIV y XV. Las tablas muestran los valores "PAT". "PAT" se refiere a Passes After Threshold, algoritmo utilizado en la determinación de muestras positivas. Una señal se programa a un valor umbral predeterminado, que se resta entonces por el número de pasadas que realiza el BD ProbeTec™. Un valor final de PAT más alto indica de la muestra alcanzó el umbral resultante en un resultado positivo a un ritmo más rápido que una muestra con un valor inferior. Un PAT igual a cero se considera negativo. Por lo tanto, los valores superiores a cero indican resultados positivos.

Tabla XIV. Ensayo monoplex y diplex de CT con diluyente de muestra

Diluyente de la muestra			
Ensayo diplex		Ensayo monoplex	
Película	Polvo	Película	Polvo
43,91	43,41	50,84	52,58
47,35	43,41	51,95	52,35
44,76	43,91	51,65	52,43
48,22	45	52,46	52,49
46,18	43,48	52,28	52,5
47,59	44,03	52,34	52,12
45,08	45,63	52,49	52,5
45,89	44,52	52,29	51,41
44,36	48,2	52,24	52,11
46,67	47,76	52,35	52,22
46,22	47,7	52,2	52,33
44,7	47,27	52,22	52,15

	Diluyente de la muestra			
	Ensayo diplex		Ensayo monoplex	
	<u>Película</u>	<u>Polvo</u>	<u>Película</u>	<u>Polvo</u>
Promedio:	46	45	52	52

Tabla XV. Ensayo monoplex y diplex de CT

	Mezcla de orina			
	Ensayo diplex		Ensayo monoplex	
	<u>Película</u>	<u>Polvo</u>	<u>Película</u>	<u>Polvo</u>
	43,32	45,47	52,37	52,1
	42,55	45,9	52,07	52,26
	45,83	45,63	52,09	52,31
	45,6	46,55	52,4	52,44
	46,97	46,23	52,55	52,29
	44,09	45,97	52,36	52,36
	46,34	46,29	52,37	52,39
	46,03	44,95	52,35	52,32
	46,3	47,72	52,51	52,21
	45,38	44,1	52,44	51,97
	46,41	48,01	52,02	51,97
	44,88	43,64	51,38	52,18
Promedio	45	46	52	52

5 Los datos mostrados en las Tablas XIV y XV ilustran que la película soluble se ha realizado, así como el hierro en polvo libre tanto en los ensayos monoplex y diplex. Los valores PAT positivos indican amplificación lograda de la diana en ambos ensayos.

10 **Ejemplo 7**

Se realizó un experimento para determinar los parámetros óptimos de mezclado del extractor automatizado BD Viper™ para asegurar la disolución de la película soluble con el óxido de hierro incorporado. Esto permite al ADN diana el tiempo suficiente para unirse y ser capturado por las partículas de hierro. Este experimento evaluó múltiples parámetros de mezcla en el instrumento BD Viper™.

15 Los procedimientos de extracción para el presente experimento son los mismos que los descritos en el Ejemplo 1 con las modificaciones descritas a continuación. Se probaron ocho condiciones diferentes de la muestra, como se describe en la Tabla XVI. Se prepararon seis tubos duplicados para cada condición. Se suministraron tubos de extracción con película soluble que contiene partículas de hierro a una concentración de 9,8 mg/1,77 cm². El diluyente de la muestra se añadió entonces a los tubos de extracción y se mezcló a unos volúmenes y velocidades especificados. Este experimento se llevó a cabo para eliminar una vigésimo segunda pausa en el actual programa BD Viper™. Los tubos de extracción de referencia se expusieron a KOH y se mezclaron 5 veces. Los tubos se incubaron a continuación durante 20 segundos para permitir la disolución. Esta incubación fue seguida por una etapa de mezclado con una mezcla ácida aglutinante que contiene ácido sulfúrico 3,75 M y un control de extracción. En las condiciones de ensayo posteriores se eliminaron la mezcla de KOH y la pausa para disolución. 20 25 30 Se observó visualmente el color del fluido dentro de las puntas de muestra del instrumento BD Viper™. El polvo de óxido de hierro es negro y el diluyente de la muestra es claro. Por lo tanto, se consiguió un resultado de mezclado aceptable cuando el líquido en la punta de la muestra era completamente negro, lo que indica un mezclado completo. El color resultante en las puntas se calificó de la siguiente manera: (0) = Pobre; (1) = Regular; (2) = Bueno; (3) = Muy bueno.

Tabla XVI. Optimización de los parámetros de mezclado

35

Muestra nº	Condiciones del ensayo	Velocidad de mezclado	Volumen de mezclado	nº de mezclas	Duración de la etapa	Resultados
1	1er ácido + mezcla EC	50%	438 µl (50%)	10	27 s.	0
	2º ácido + mezcla EC	80%	700 µl	5	17 s.	
2	1er ácido + mezcla EC	80%	612 µl (70%)	10	27 s.	0
	2º ácido + mezcla EC	50%	700 µl	5	17 s.	
3	1er ácido + mezcla EC	80%	612 µl (70%)	10	27 s.	2
	2º ácido + mezcla EC	80%	700 µl	10	30 s.	
4	1er ácido + mezcla EC	80%	612 µl (70%)	5	14 s.	0
	2º ácido + mezcla EC	50%	700 µl	10	34 s.	
5	1er ácido + mezcla EC	50%	612 µl (70%)	5	14 s.	1
	2º ácido + mezcla EC	80%	700 µl	10	30 s.	
6		50%	612 µl (70%)	10	27 s.	2
		80%	700 µl	10	30 s.	
7		80%	438 µl (50%)	10	27 s.	2
		80%	700 µl	10	30 s.	
8		80%	438 µl (50%)	15	33 s.	3
		80%	700 µl	10	30 s.	

5 El experimento anterior determinó que la condición nº 8 (volumen de mezclado de 438 µl para 15 mezclas seguido de volumen de mezcla de de 700 µl para 10 mezclas) era ideal para la disolución completa de la película soluble. Esta condición proporcionó un resultado de "Muy bueno" en la inspección visual.

Ejemplo 8

10 Se realizó un experimento para probar los parámetros optimizados descritos en el experimento 7. Específicamente, se realizó un ensayo de CT como se describe a continuación.

15 Se proporcionaron tubos de extracción con partículas sensibles al magnetismo en la forma de hierro en polvo (polvo A de la muestra o polvo B de la muestra) o una película soluble cargada con partículas de hierro. Se añadieron muestras de exudados vaginales a los tubos de extracción. Las muestras se mezclaron como se resume en el Experimento 8 (438 µl de volumen de mezclado para 15 mezclas seguido de 700 µl de volumen de mezclado para 10 mezclas) y se amplió tal como se describe en el Experimento 1. Los resultados se ilustran en la Tabla XVII y se expresan en puntuaciones PAT.

20 Tabla XVII. Ensayo de CT que utiliza parámetros de mezclado optimizados

ENSAYO CT					
Película soluble		Muestra en polvo A		Muestra de polvo	
<u>Objetivo</u>	<u>CAI</u>	<u>Objetivo</u>	<u>CAI</u>	<u>Objetivo</u>	<u>CAI</u>
43,40	51,50	38,30	50,40	42,50	52,30
49,60	42,20	45,90	44,50	49,60	44,00
43,60	50,70	45,20	46,50	48,30	45,30
45,30	48,80	47,30	41,60	42,90	50,80
48,70	39,90	44,70	27,90	46,30	45,30
45,50	49,20	45,70	45,90	45,60	48,20
43,50	47,20	43,30	42,20	40,80	48,90
45,10	46,10	44,10	45,40	44,50	50,30
43,20	49,70	39,80	48,90	46,40	46,80
46,10	46,90	44,30	46,10	47,80	31,60
37,40	49,90	32,70	48,90	44,80	44,60

ENSAYO CT					
Película soluble		Muestra en polvo A		Muestra de polvo	
Objetivo	CAI	Objetivo	CAI	Objetivo	CAI
39,70	46,40	46,60	49,00	44,40	48,10
45,00	40,40	44,60	12,80	46,20	35,90
42,30	45,50	44,00	46,70	43,20	36,50
43,60	45,20	42,90	25,70	37,00	44,70
41,70	41,10	42,90	42,00	42,80	45,10
Promedio:	44,0	46,3	43,3	41,5	44,9

Los datos anteriores ilustran que los parámetros de mezclado optimizados determinados en el Experimento 8 dan como resultado la consecución de reacciones de extracción y amplificación según se indica por las puntuaciones PAT positivas (> 0) tanto para el objetivo como para CAI.

5

Ejemplo 9

Se realizó un experimento para probar la estabilidad de la película soluble durante un mes a temperaturas variables. La película se almacenó a uno de los tres intervalos de temperatura constante (2-8°C., 15°C y 33°C) durante un mes. Los reactivos se sacaron del almacenamiento y se probaron en las reacciones de extracción/amplificación a temperaturas ambiente. Las tablas XVIII a la XXIII muestran los resultados de los ensayos de CT y GC realizados en los reactivos almacenados en cada intervalo de temperatura. Los experimentos se realizaron como se ha descrito anteriormente en el ejemplo 1. Los valores positivos (objetivo) miden el objetivo CT ampliado. Los valores negativos (CAI) miden la fluorescencia de control interno de amplificación. Los datos se registran en puntuaciones PAT.

10

15

Tabla XVIII. Prueba de ensayo de CT en película almacenada entre 2 a 8°C.

Condiciones de almacenamiento del reactivo entre 2 y 8°C							
ENSAYO DE CT							
Valores positivos (objetivo)				Valores negativos (CAI)			
48,90	50,30	49,80	47,50	44,60	48,20	48,80	49,60
49,20	50,30	48,90	49,40	46,20	48,30	49,00	49,70
49,20	50,50	46,00	47,40	46,30	48,30	49,00	49,80
50,20	48,40	48,30	49,00	46,30	48,40	49,10	49,80
49,40	47,30	49,40	49,10	46,50	48,50	49,10	49,90
50,30	49,50	48,90	48,40	46,50	48,60	49,30	50,00
49,80	48,70	48,70	49,00	46,90	48,70	49,30	50,10
49,10	49,00	44,90	49,20	47,00	48,70	49,30	50,20
48,20	48,40	48,30	49,40	47,40	48,70	49,30	50,60
49,70	48,50	48,30	48,00	47,70	48,80	49,50	50,80
48,40	46,80	47,50	46,20	47,70	48,80	49,50	50,80
49,60	49,20	49,90	46,40	48,10	48,80	49,60	*Vacío
Promedio:	48,68			48,64			

No se observan falsos positivos
 *La pérdida de información de CAI fue resultado de un error en el nivel de líquido en el BD Viper™.

20

Tabla XIX. Pruebas de ensayo de GC en película almacenada a 2-8°C

Condiciones de almacenamiento del reactivo entre 2 y 8°C							
ENSAYO DE GC							
Valores positivos (objetivo)				Valores negativos (CAI)			
40,20	42,30	42,10	41,00	12,80	42,70	43,90	45,10
41,80	44,70	44,20	27,80	36,20	42,70	43,90	45,20
33,50	43,90	43,90	42,00	40,20	43,00	44,20	45,20
43,00	42,90	44,90	41,40	40,20	43,20	44,40	45,50
40,90	42,30	44,70	44,40	40,20	43,30	44,50	45,80
37,70	44,20	39,70	40,30	40,30	43,30	44,50	45,80
43,70	37,80	42,30	42,30	40,70	43,40	44,50	45,90
42,90	37,80	41,60	32,50	41,50	43,40	44,80	46,00
41,20	40,10	42,30	42,50	41,50	43,60	45,00	46,50
42,20	43,70	45,60	28,70	42,10	43,60	45,00	46,70
43,50	44,70	43,30	43,80	42,30	43,70	45,00	47,50
43,70	41,90	41,60	51,00	42,50	43,70	45,00	*Vacío
Promedio:	41,55			42,98			

No se observan falsos positivos
 * La pérdida de información de CAI fue resultado de un error en el nivel de líquido en el BD Viper™

Tabla XX. Pruebas de ensayo de CT en película almacenada a 15°C

5

Condiciones de almacenamiento del reactivo a 15°C							
ENSAYO DE CT							
Valores positivos (objetivo)				Valores negativos (CAI)			
50,00	50,80	50,50	48,20	43,60	47,50	48,50	49,70
50,50	50,20	49,30	49,80	44,10	47,80	48,50	49,70
49,00	50,40	47,60	48,90	45,90	47,90	48,60	49,70
50,50	50,20	48,20	48,30	45,90	48,10	48,60	49,90
49,30	50,80	48,00	45,60	45,90	48,10	48,80	50,00
50,30	48,60	47,40	45,10	46,30	48,10	48,90	50,10
48,50	49,10	48,00	47,50	46,50	48,20	49,00	50,20
49,70	46,20	48,70	49,60	46,70	48,30	49,10	50,20
49,40	50,30	49,50	47,50	46,80	48,30	49,10	50,40
48,60	50,20	49,00	47,30	46,90	48,40	49,30	50,50
49,90	49,40	49,00	46,80	47,10	48,40	49,30	51,10
49,70	50,40	45,90	*Vacío	47,40	48,40	49,60	52,00
Promedio:	47,87			48,36			

* Las pérdidas de información positivas son resultado de un error en nivel de líquido en el BD Viper™.

No se apreciaron falsos positivos

Tabla XXI. Pruebas de ensayo de GC en película almacenada a 15°C

		Condiciones de almacenamiento del reactivo a 15°C							
		ENSAYO DE GC							
		Valores positivos (objetivo)				Valores negativos (CAI)			
		44,70	42,70	44,40	40,10	37,50	43,90	45,20	45,70
		45,70	44,90	40,10	42,70	38,00	43,90	45,30	45,70
		42,00	41,60	42,60	43,20	39,80	43,90	45,30	46,00
		44,00	46,00	40,60	39,30	41,50	44,40	45,30	46,00
		37,20	44,50	43,20	38,80	41,50	44,40	45,40	46,00
		22,90	32,00	41,50	35,00	41,60	44,50	45,40	46,40
		40,70	43,10	45,30	39,80	42,80	44,80	45,50	46,50
		43,80	43,30	38,40	41,80	43,10	44,90	45,60	46,50
		39,80	43,50	41,20	7,30	43,30	45,00	45,60	46,60
		44,40	32,30	44,10	44,90	43,50	45,00	45,70	47,50
		42,30	43,50	43,40	42,40	43,70	45,00	45,70	47,60
		39,50	45,90	46,00	*Vacío	43,90	45,10	45,70	49,10
Promedio:		39,93				44,59			
		* Las pérdidas de información positivas son resultado de un error en nivel de líquido en el BD Viper™.				No se observan falsos positivos			

Tabla XXII. Pruebas de ensayo de CT en película almacenada a 33°C

5

		Condiciones de almacenamiento del reactivo a 33°C							
		ENSAYO DE CT							
		Valores positivos (objetivo)				Valores negativos (CAI)			
		50,40	46,50	42,60	48,90	44,70	47,70	48,70	49,40
		49,50	48,30	50,40	48,90	45,20	47,70	48,70	49,50
		49,90	50,10	49,60	50,20	45,20	47,80	48,80	49,60
		50,80	51,50	48,70	49,70	45,50	48,10	48,80	49,80
		49,90	47,30	47,60	47,50	46,20	48,10	48,80	49,90
		51,60	49,50	50,10	48,20	46,30	48,20	48,90	49,90
		50,50	50,90	51,20	48,40	46,50	48,20	48,90	50,10
		50,00	50,70	48,90	49,30	47,00	48,60	48,90	50,30
		50,10	50,90	49,80	49,30	47,00	48,60	49,00	50,40
		50,60	50,00	49,20	49,30	47,10	48,60	49,10	50,60
		51,40	48,70	50,50	48,90	47,30	48,60	49,10	50,60
		50,90	49,70	49,40	*Vacío	47,40	48,60	49,20	50,90
Promedio:		48,46				48,38			
		* Las pérdidas de información positivas son resultado de un error en nivel de líquido en el BD Viper™.				No se observan falsos positivos			

Tabla XXIII. Pruebas de ensayo de GC en película almacenada a 33°C

Condiciones de almacenamiento del reactivo a 33°C							
ENSAYO DE GC							
Valores positivos (objetivo)				Valores negativos (CAI)			
*Vacío	44,70	40,90	40,60	22,50	43,60	45,00	46,50
46,40	37,30	43,80	43,10	34,70	43,70	45,10	46,60
12,90	43,60	45,30	43,80	41,00	43,80	45,30	46,60
43,70	44,30	44,10	42,90	41,20	44,00	45,40	46,60
45,20	41,70	44,80	37,40	41,70	44,20	45,40	46,70
40,80	45,80	46,20	43,20	42,00	44,20	45,60	46,70
40,60	45,40	43,10	34,60	42,20	44,50	45,70	46,80
43,40	43,20	39,40	44,80	42,70	44,60	45,70	47,00
45,80	45,30	35,60	28,10	42,70	44,60	45,90	47,30
45,20	38,90	35,60	30,60	43,20	44,80	46,00	48,10
43,60	46,80	43,40	42,70	43,30	45,00	46,20	48,20
43,50	17,10	43,50	*Vacío	43,40	45,00	46,40	49,70
Promedio:	39,22			44,31			
* Las pérdidas de información positivas son resultado de un error en nivel de líquido en el BD Viper™.				No se observan falsos positivos			

5 Los datos incluidos en las Tablas XVIII a XXIII indican que las reacciones de amplificación se lograron después del almacenamiento de la película soluble durante un mes entre 2 y 8°C, 15°C y 33°C.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de introducción de una primera sustancia en un recipiente, comprendiendo el procedimiento:
- 5 (i) proporcionar un recipiente;
- (ii) introducir la primera sustancia (30) en el recipiente;
- 10 (iii) proporcionar una película fácilmente soluble;
- (iv) introducir la película fácilmente soluble en el recipiente de tal manera que la película soluble recubra la primera sustancia dentro del recipiente, en el que la película fácilmente soluble está formada a partir de un material polimérico orgánico o inorgánico, o de un material procedente de uno o más de dichos materiales y puede caracterizarse como fácilmente soluble,
- 15 caracterizado porque dicha película (40) fácilmente soluble presenta una sustancia implicada en el aislamiento y/o la separación de los componentes biológicos de una muestra incorporada sobre su superficie mediante una técnica de aplicación en superficie.
- 20 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la película (40) presenta una forma que comprende por lo menos una de las siguientes: plana; polígono macizo; polígono hueco; esférica; cúbica; oval; y un cuerpo oblongo.
3. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la película (40) está formada a partir de un material que comprende por lo menos uno de los siguientes: hidroxialquilmetilcelulosa; carboximetilcelulosa; monómero éster hidroxialquil-carboxílico; hidroxialquil (met)acrilato etoxilado; hidroxialquil (met)acrilato propoxilado; polietilenglicol (PEG); alcohol polivinílico (APV); y combinaciones de los mismos.
- 25 4. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la película comprende una fragancia.
- 30 5. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que por lo menos una de entre la primera sustancia (30) y la sustancia implicada en el aislamiento y/o la separación de los componentes biológicos comprende una partícula magnéticamente sensible y, opcionalmente, por lo menos un de los siguientes: un agente de lisis; un desnaturante de proteínas; un disolvente aprótico; un agente alcalino, un tampón de neutralización; una sal; un metal; una enzima; un oligonucleótido, un cebador, un ácido nucleico, una proteína y combinaciones de los mismos.
- 35 6. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que por lo menos una de entre la primera sustancia (30) y la sustancia implicada en el aislamiento y/o la separación de los componentes biológicos comprende por lo menos uno de los siguientes: sílice; partículas revestidas con sílice; membranas revestidas con sílice, gel de sílice; superficies de sílice hidratada e hidroxilada; polvo de vidrio; esteras de fibra de vidrio, membranas de vidrio; zeolitas; cerámica; partículas poliméricas revestidas con un óxido metálico o sal metálica y las combinaciones de los mismos.
- 40 7. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el recipiente (10) comprende por lo menos uno de los siguientes: un tubo abierto; un tubo cerrado que presenta un fondo; un micropocillo; una matriz de micropocillos; una botella; y una placa de Petri.
- 45 8. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el recipiente (10) comprende un fondo, y la etapa (ii) comprende además colocar la primera sustancia (30) en el fondo del recipiente (10).
- 50 9. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que la etapa (iii) comprende además colocar la película (40) sobre una abertura en el recipiente (10), unir la película (40) con un émbolo móvil (50), y forzar la película (40) a través de la abertura y dentro del recipiente (10) desplazando el émbolo (50) en una primera dirección longitudinal con respecto al recipiente (10).
- 55 10. Procedimiento según la reivindicación 9, en el que la película se encuentra en forma de un segmento dimensionado para cruzar la abertura en el recipiente (10).
11. Procedimiento según la reivindicación 9, en el que la película (40) se encuentra en forma de una banda continua o rodillo, y la etapa (iii) comprende además alimentar la película (40) por encima de la abertura en el recipiente (10), y separar una parte de la película (40) del rodillo durante la introducción en el recipiente (10).
- 60 12. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que la etapa (iii) comprende además colocar la película (40) sobre una abertura en el recipiente (10), e introducir la película (40) en el recipiente (10) mediante gravedad.
- 65 13. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que la etapa (iii) comprende además ubicar la película (40) sobre una abertura en el recipiente (10), e introducir la película (40) en el recipiente (10) mediante por lo menos una de entre presión positiva o al vacío.

14. Procedimiento según la reivindicación 1, que comprende además: (iv) añadir una sustancia adicional (60) al recipiente.
- 5 15. Procedimiento según la reivindicación 14, en el que la sustancia adicional (60) comprende por lo menos una de las siguientes: células; microorganismos; ácidos nucleicos; proteínas; lípidos; carbohidratos; y combinaciones de los mismos.
- 10 16. Procedimiento según la reivindicación 15, en el que la etapa (iv) comprende introducir un material o una mezcla en el recipiente (10), comprendiendo el material o la mezcla otra sustancia (60).
17. Procedimiento según la reivindicación 16, en el que el material o la mezcla comprende una muestra biológica.
- 15 18. Procedimiento según la reivindicación 17, en el que la muestra biológica comprende por lo menos una de los siguientes: orina, orina clínica; extensiones vaginales; y combinaciones de las mismas.
19. Procedimiento según la reivindicación 17, que comprende además:
- 20 (v) disolver la película (40); y
- (vi) crear una mezcla que comprende la primera sustancia (30) y la sustancia implicada en el aislamiento y/o la separación de los componentes biológicos.
- 25 20. Procedimiento según la reivindicación 19, que comprende además:
- (vii) unir la sustancia implicada en el aislamiento y/o la separación de los componentes biológicos y un constituyente (70) de la sustancia adicional (60) formando así un complejo;
- 30 (viii) aplicar un campo magnético al recipiente (10), atrayendo así el complejo a una zona designada del recipiente (10);
- (ix) retirar por lo menos una parte de la muestra biológica del recipiente (10);
- 35 (x) eliminar el campo magnético del recipiente (10);
- (xi) disociar la sustancia implicada en el aislamiento y/o la separación de los componentes biológicos y el constituyente (70) de la sustancia adicional (60) una de otra;
- 40 (xii) aplicar de nuevo el campo magnético al recipiente atrayendo así el constituyente (70) de sustancia adicional (60) a una zona designada del recipiente (10); y
- (xiii) retirar el constituyente (70) de otra sustancia adicional (60) del recipiente (10).
- 45 21. Procedimiento según la reivindicación 20, que comprende además por lo menos uno de los siguientes:
- (ix) realizar un procedimiento de amplificación en el constituyente (70) de la sustancia adicional (60), y
- 50 (x) realizar un ensayo para detectar la presencia y/o la concentración de un analito objetivo en la sustancia adicional (60).
22. Procedimiento según la reivindicación 21, en el que por lo menos una de las etapas (i) a (x) se realizan mediante un dispositivo robótico automático.
- 55 23. Kit para su utilización en cualquiera de los procedimientos según las reivindicaciones 1 a 22, comprendiendo dicho kit:
- 60 i) un recipiente;
- ii) una primera sustancia dentro del recipiente; y
- 65 iii) una película fácilmente soluble dentro del recipiente y que recubre la primera sustancia, en el que la película fácilmente soluble se forma a partir de un material polimérico orgánico o inorgánico, o de un material procedente de uno o más de dichos materiales y puede caracterizarse como fácilmente soluble, caracterizado porque una sustancia implicada en el aislamiento y/o la separación de los componentes biológicos de una muestra se

incorpora sobre la superficie de dicha película fácilmente soluble mediante una técnica de aplicación en superficie.

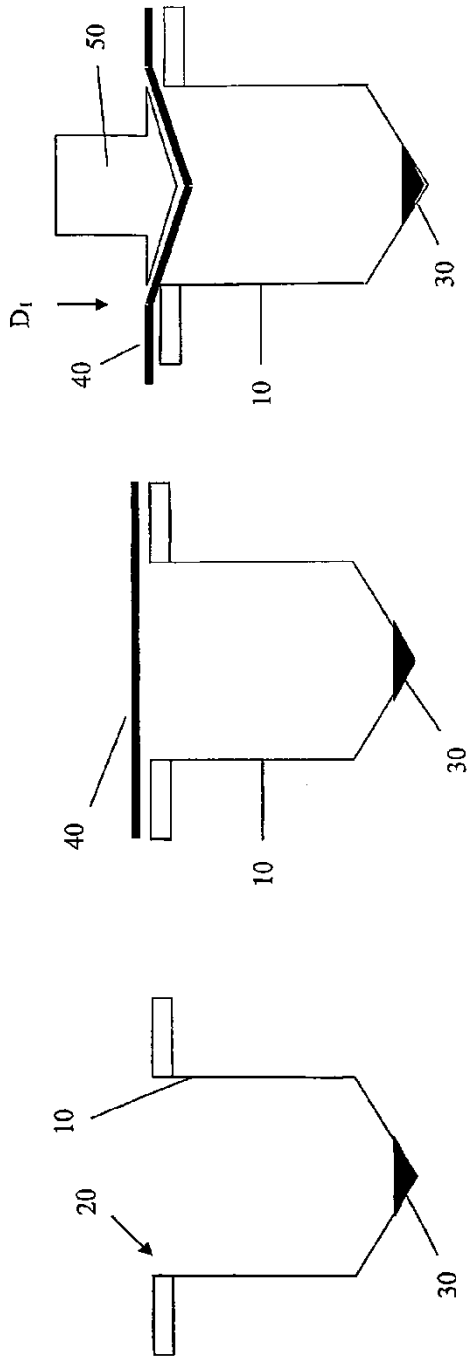


FIG. 1C

FIG. 1B

FIG. 1A

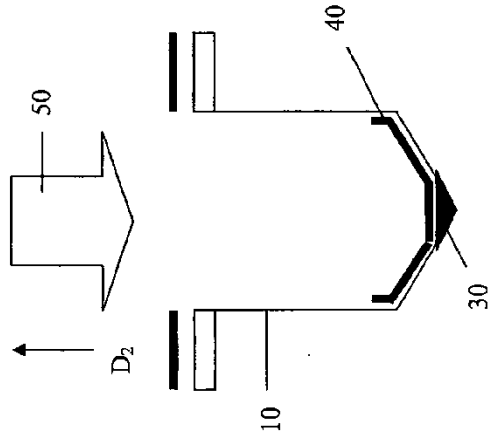


FIG. 1E

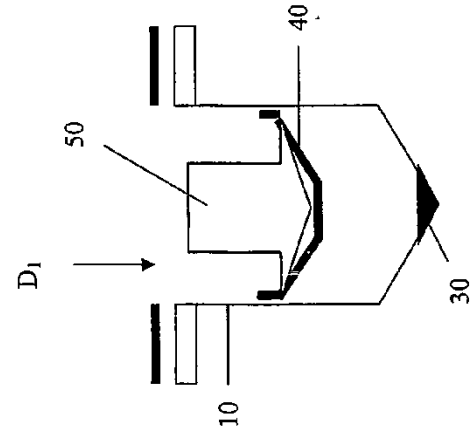


FIG. 1D

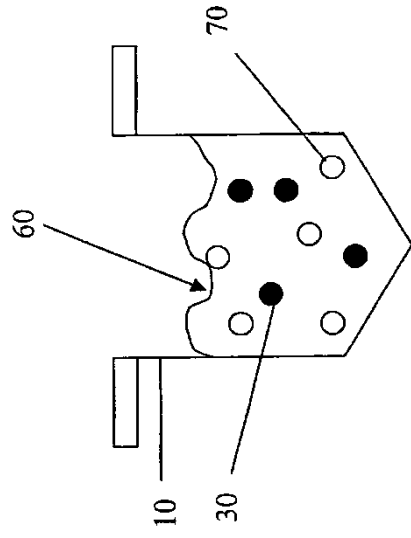


FIG. 1G

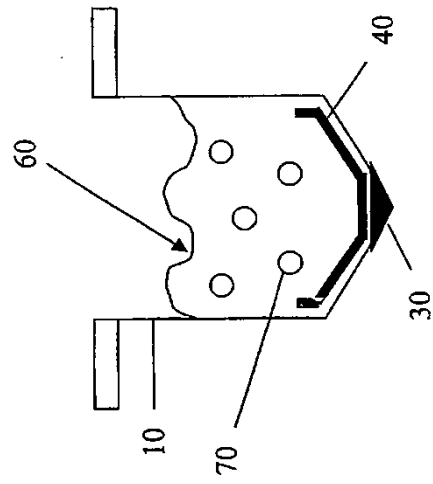


FIG. 1F

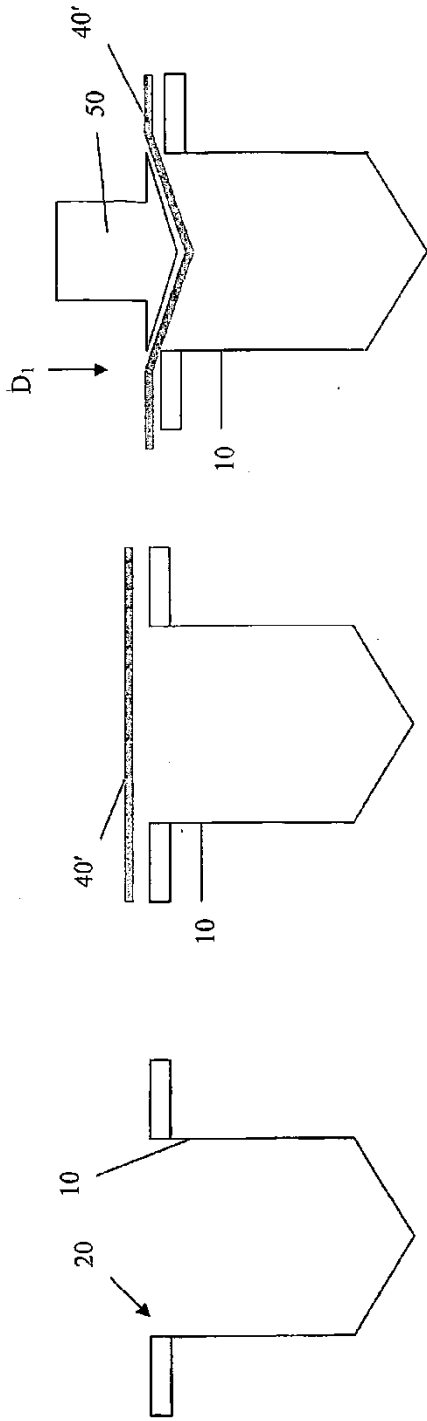


FIG. 2A

FIG. 2B

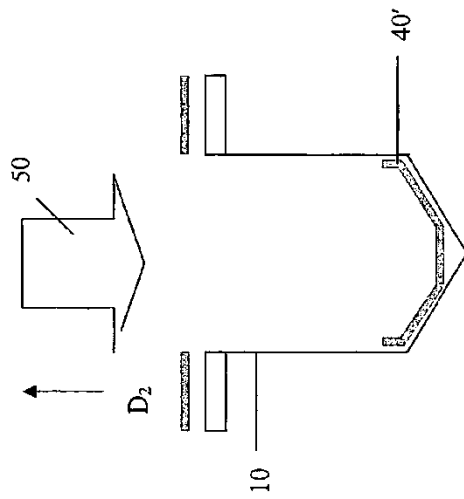


FIG. 2C

FIG. 2E

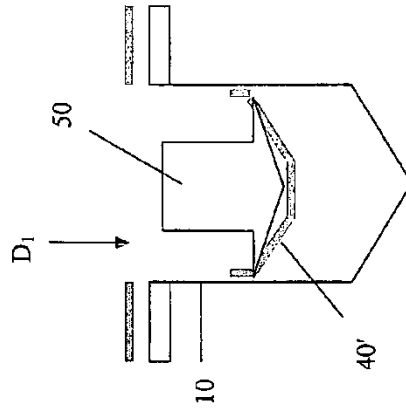


FIG. 2D

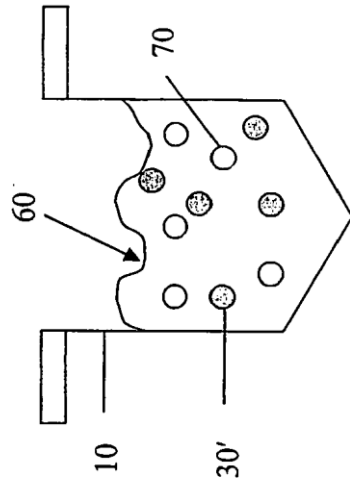


FIG. 2G

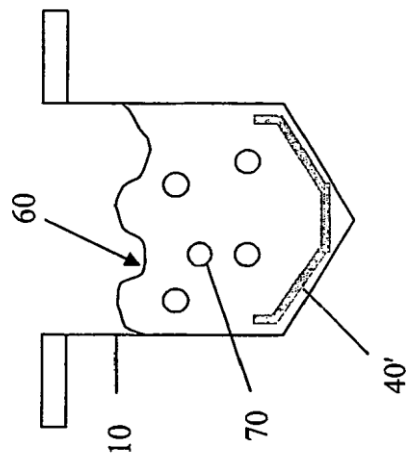


FIG. 2F

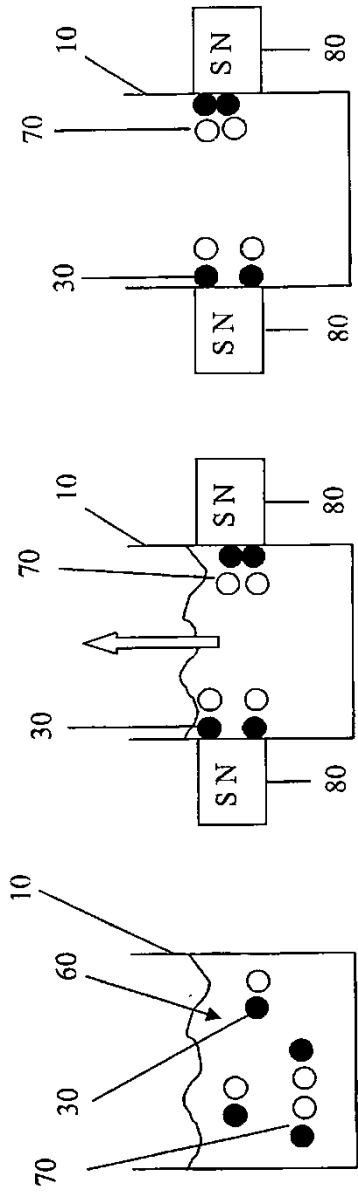


FIG. 3A

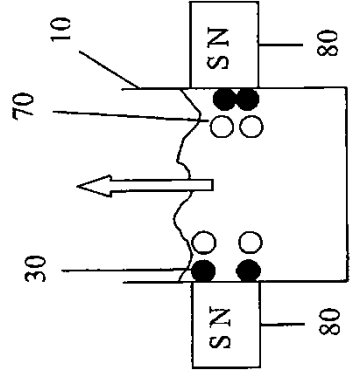


FIG. 3B

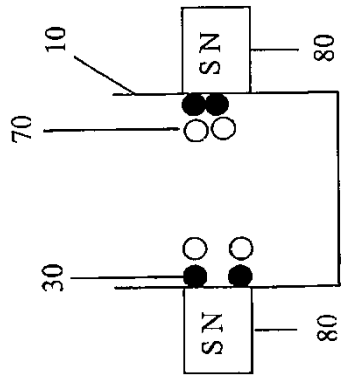


FIG. 3C

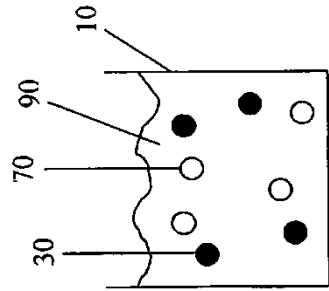


FIG. 3D

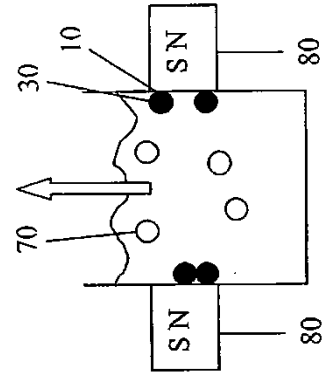


FIG. 3E

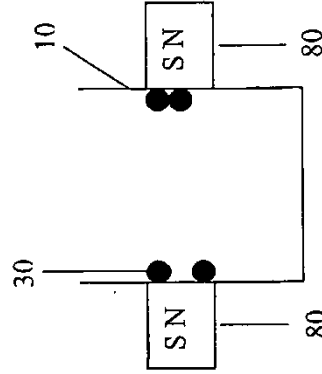


FIG. 3F

