

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 424 759**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

**C12M 1/36** (2006.01)

**C12M 1/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.11.2008 E 08848933 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2013 EP 2215265**

54 Título: **Procedimiento de ajuste de resultados de un instrumento de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

30 Prioridad:

**14.11.2007 US 987895 P**

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

**08.10.2013**

73 Titular/es:

**GRIFOLS THERAPEUTICS INC. (100.0%)  
4101 Research Commons, 79 TW Alexander Drive  
Research Triangle Park, NC 27709, US**

72 Inventor/es:

**PAUL, JUSTIN M. y  
BEAMES, BURTON D.**

74 Agente/Representante:

**DURÁN MOYA, Luis Alfonso**

**ES 2 424 759 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento de ajuste de resultados de un instrumento de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

### 5 SECTOR TÉCNICO

En general, la presente descripción se refiere a instrumentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Más particularmente, la invención se refiere a procedimientos para la verificación o el ajuste de los resultados del software de detección de secuencias (SDS) utilizados en los instrumentos de PCR.

10

### TÉCNICA ANTERIOR

Los sistemas de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR) se utilizan para la amplificación de una muestra, tal como una cadena de ADN, con el fin de que sea más fácil detectar o identificar la secuencia de la muestra. Los dispositivos de PCR en tiempo real utilizan programas informáticos o software de detección de secuencias (SDS) para analizar y procesar los resultados de las pruebas de PCR. Sin embargo, en algunos casos, el SDS no es capaz de detectar muestras con precisión, lo que puede dar como resultado la identificación incorrecta de la existencia de ciertas secuencias o de la concentración de las mismas. Por ejemplo, cuando una muestra de plasma sanguíneo se analiza utilizando ciertos sistemas de PCR de Applied Biosystems, o en otros sistemas que utilizan un SDS relacionado, a veces los sistemas pueden no detectar una concentración elevada de un virus, tal como, por ejemplo, el parvovirus B19. Por consiguiente, los sistemas actuales pueden malinterpretar una muestra de plasma que contiene una titulación elevada de estos virus, que contaminarían una masa de plasma, provocando una pérdida significativa de recursos de plasma.

15

20

25

Por lo tanto, existe una necesidad en el estado de la técnica actual de hacer frente a estas y otras deficiencias e insuficiencias de los sistemas y procedimientos convencionales. Las mejoras en los sistemas y procedimientos convencionales, tal como se describe en la presente memoria descriptiva, son capaces de superar estas y otras deficiencias de la técnica anterior.

30

El documento EP1518935 da a conocer una corrección de la línea de base para mejorar la cuantificación de los ácidos nucleicos en una muestra

### CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION

35

La presente invención da a conocer procedimientos para la gestión de los resultados de un instrumento de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR). Según una entre muchas realizaciones, un procedimiento dado a conocer en la presente memoria descriptiva comprende el cálculo, a partir de resultados del instrumento de PCR en tiempo real, de una señal de fluorescencia de una muestra durante el período basal del instrumento de PCR en tiempo real. El procedimiento incluye además la determinación de si la señal de fluorescencia aumenta en, como mínimo, un cierto porcentaje durante el período basal o no aumenta. Además, el procedimiento incluye el marcaje de la muestra como una muestra de titulación potencialmente elevada, cuando la señal de fluorescencia aumenta en, como mínimo, el porcentaje determinado.

40

45

Según otra forma de realización, se describe un procedimiento para analizar una muestra de sangre y comprende la cuantificación de ácido nucleico viral en la muestra de sangre utilizando un instrumento de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (rtPCR) mediante la modificación de la interpretación de los datos de modo que las muestras de alta titulación no se malinterpretan. Una señal de fluorescencia se calcula a partir de los resultados de PCR proporcionados durante un período basal. Además, se determina si la señal de fluorescencia aumenta en, como mínimo, un porcentaje predeterminado durante el período basal. El procedimiento incluye además marcar la muestra de sangre como una muestra de titulación potencialmente elevada, cuando la señal de fluorescencia aumenta en, como mínimo, el porcentaje predeterminado.

50

55

La presente invención da a conocer además software o firmware informático, programas informáticos, secuencias de código de software, y similares, instalados en un medio legible por ordenador y ejecutables mediante un dispositivo de procesamiento. Según una forma de realización, una secuencia de código de software comprende lógica configurada para calcular una señal de fluorescencia de una muestra durante un período basal de ciclos de ensayo de un instrumento de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La secuencia de código de software incluye además lógica configurada para determinar si la señal de fluorescencia durante el período de referencia aumenta en, como mínimo, un cierto porcentaje o no aumenta. Además, la secuencia de código de software incluye una lógica configurada para marcar la muestra como una muestra de titulación potencialmente elevada, cuando la señal de fluorescencia aumenta en, como mínimo, el porcentaje determinado.

60

65

Otras características, ventajas y realizaciones de la presente descripción, que no se describen expresamente en la presente memoria descriptiva, se harán evidentes para un técnico en la materia tras el examen de la siguiente descripción detallada y los dibujos adjuntos. Se pretende que tales realizaciones implícitas de la presente descripción queden incluidas en la presente memoria descriptiva.

**BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

5 La figura 1 es un diagrama de flujo que describe un proceso para el ajuste de los resultados de los datos a partir de un dispositivo de PCR según una realización.

La figura 2 es un diagrama de flujo que describe un proceso para el cálculo del ciclo de umbral según una realización.

**DESCRIPCIÓN DETALLADA**

15 Los dispositivos/sistemas utilizados actualmente para procesar e interpretar los datos de la reacción en cadena de polimerasa (PCR), pueden identificar incorrectamente la concentración de algunos ácidos nucleicos en las muestras. Este problema puede ser provocado por cómo se procesan los resultados de las pruebas de PCR en el software de detección de secuencias (SDS) asociado con el análisis de PCR. Por ejemplo, varios sistemas de PCR, tales como muchos de los sistemas de PCR en tiempo real de Applied Biosystems, utilizan SDS que puede fallar para detectar con precisión muestras de plasma sanguíneo que contienen altas concentraciones de virus, por ejemplo, el parvovirus B19. Debido a la manera en la que se detecta la fluorescencia, es posible que una muestra de plasma sanguíneo que contiene una titulación elevada de virus pudiera ser pasada por alto como limpia. En particular, se ha observado que los niveles de fluorescencia durante un período basal son elevados, de modo que cuando se comparan los niveles de fluorescencia de la muestra con los niveles basales, no parece haber ningún aumento significativo por encima de un nivel de umbral que indique una concentración de un virus. Por lo tanto, es necesaria una modificación para superar las deficiencias del software y anular los resultados erróneos, para identificar correctamente la concentración de un virus, si lo hubiera, en una muestra de plasma.

25 La presente invención describe procedimientos de detección de altas concentraciones de ácido nucleico que se amplifican utilizando instrumentos convencionales de PCR. Los ácidos nucleicos pueden ser detectados, por ejemplo, utilizando una sonda fluorogénica, tal como una sonda TaqMan<sup>®</sup>. En la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana, la sonda se hidroliza durante cada ciclo de PCR y se mide un aumento en la fluorescencia. El SDS puede utilizar un algoritmo para separar la fluorescencia en las componentes de longitudes de onda específicas para los colorantes fluorescentes. Los primeros ciclos de PCR, por ejemplo, los ciclos 3<sup>o</sup> a 15<sup>o</sup>, se pueden configurar específicamente por un usuario para establecer los valores a partir de los cuales se determina un nivel de fluorescencia basal. El usuario define además un valor de umbral asignado para cada ciclo que refleja un cierto nivel de fluorescencia mayor que el nivel basal calculado. El ciclo umbral ( $C_T$ ) indica el número del ciclo de PCR durante el cual la fluorescencia generada dentro de una reacción supera el umbral e indica además la detección del ácido nucleico. Sin embargo, debe señalarse que las muestras con alta concentración de ácidos nucleicos tienden a amplificarse durante el período basal. De este modo, el SDS de algunos sistemas de PCR convencionales lee esta fluorescencia como fondo e interpreta incorrectamente estas muestras de alta concentración como negativas para el ácido nucleico diana, cuando en realidad puede haber una concentración elevada de la secuencia diana. Los procedimientos de la presente descripción compensan estos resultados inexactos proporcionando una lectura más precisa, si es necesario, o verificando la exactitud de los resultados anteriores.

45 La lógica descrita en la presente memoria descriptiva supera, como mínimo, dos de los defectos en el SDS de los sistemas convencionales. En primer lugar, el SDS defectuoso no es capaz de detectar adecuadamente muestras que contienen muestras de titulaciones elevadas de ácidos nucleicos, que por lo general se amplifican durante el período basal. Dado que un gran porcentaje de amplificación se produce durante el período basal, un aumento en la fluorescencia de una muestra se compara con un nivel de umbral que se ha elevado incorrectamente por encima del nivel basal elevado. Como resultado, el SDS defectuoso identifica incorrectamente la muestra como negativa. El segundo defecto en los sistemas de SDS convencionales es que el archivo de datos, que contiene los datos de fluorescencia para la detección de un aumento, no contiene información de identificación integrada. Como resultado de esto, un archivo de datos podría ser emparejado incorrectamente con una muestra diferente. De este modo, alguna de las comparaciones que utiliza el archivo de datos no se correspondería con el conjunto correcto de los resultados.

55 En un aspecto de la presente invención, los datos de fluorescencia se analizan para ver si se ha producido, como mínimo, un cierto porcentaje de aumento en la fluorescencia normalizada sobre la línea de base. Los resultados que tienen un aumento que no excede de este determinado porcentaje pueden ser considerados como aceptables. Por ejemplo, el porcentaje se puede establecer en, aproximadamente, el 20%, de tal manera que cualquier muestra que exhiba un incremento del 20% o mayor se marca como una muestra de titulación potencialmente elevada. Además, los valores de  $C_T$  se calculan a partir de los resultados y se comparan con los valores calculados originalmente por el SDS. Una discrepancia entre los cálculos indica un error potencial en el emparejamiento del archivo de datos con sus resultados o podría indicar un error de instrumentación.

65 Típicamente, el sistema de PCR toma lecturas de fluorescencia en cada ciclo de PCR para cada muestra de ensayo. Un archivo de componentes almacena las lecturas de fluorescencia separadas en los componentes de los colorantes fluorescentes -- FAM, JOE, y ROX - en cada ciclo de PCR, en el que FAM y JOE son colorantes

informadores y ROX es un colorante de referencia pasivo. En este ejemplo, la diana viral es el parvovirus B19. FAM representaría la diana viral y JOE representaría la diana de control interno (IC).

5 Un algoritmo, según una realización, implica calcular una señal de informador normalizada (Rn). El Rn en cada ciclo de c se calcula como la fluorescencia de colorante informador dividida por la fluorescencia de referencia del colorante pasivo. Para la diana viral:

$$R_n(V)_c = \frac{FAM_c}{ROX_c}$$

ecuación 1

10 y para la diana de control interno (IC):

$$R_n(IC)_c = \frac{JOE_c}{ROX_c}$$

ecuación 2

15 Cualquier muestra que genera un aumento de, como mínimo, el 20% en Rn(V) de la diana viral desde el 3<sup>er</sup> ciclo de PCR hasta el 15<sup>o</sup> ciclo se marca como una muestra de titulación potencialmente elevada. Si este es el caso, entonces el algoritmo utiliza las siguientes ecuaciones para calcular los valores de C<sub>T</sub>. Sin embargo, en primer lugar, la fluorescencia basal se calcula utilizando la regresión lineal de Rn sobre la línea de base, que se define como de 3 a 15 para la diana viral, y de 3 a 27 para la diana IC. Para el objetivo viral:

20 la pendiente 
$$m_{FAM} = \frac{\sum_{c=3}^{c=15} (c - \bar{c})(R_n(V)_c - \overline{R_n(V)_c})}{\sum_{c=3}^{c=15} (c - \bar{c})^2}$$

ecuación 3

25 y la intersección 
$$b_{FAM} = R_n(V)_c - (m_{FAM} \times \bar{c})$$

ecuación 4

Para la diana IC:

30 la pendiente 
$$m_{JOE} = \frac{\sum_{c=3}^{c=27} (c - \bar{c})(R_n(IC)_c - \overline{R_n(IC)_c})}{\sum_{c=3}^{c=27} (c - \bar{c})^2}$$

ecuación 5

35 y la intersección 
$$b_{JOE} = R_n(V)_c - (m_{JOE} \times \bar{c})$$

ecuación 6

en las que  $\bar{x}$  representa la media de x sobre el intervalo de la línea de base.

A continuación, el delta de Rn (dRn) se calcula como la diferencia de la Rn y la fluorescencia basal en cada ciclo. Para el objetivo viral:

40 
$$dRn(V)_c = Rn(V)_c - (m_{FAM} \times c) - b_{FAM}$$

ecuación 7

y para la diana IC:

45 
$$dRn(IC)_c = Rn(IC)_c - (m_{JOE} \times c) - b_{JOE}$$

ecuación 8

El algoritmo calcula a continuación la pendiente y la intersección de dRn entre cada ciclo, empezando en el ciclo 2. Para el ciclo anterior de la diana viral,

50 la pendiente 
$$m(V)_c = \frac{dRn(V)_c - dRn(V)_{c-1}}{c - (c-1)}$$

ecuación 9

y la intersección 
$$b(V)_c = dRn(V)_c - (m(V)_c \times c)$$

ecuación 10

Para el ciclo anterior de la diana IC,

55 la pendiente 
$$m(IC)_c = \frac{dRn(IC)_c - dRn(IC)_{c-1}}{c - (c-1)}$$

ecuación 11

60 y la intersección 
$$b(IC)_c = dRn(IC)_c - (m(IC)_c \times c)$$

ecuación 12

El ciclo umbral  $C_T$  se calcula como el ciclo fraccional en el que el dRn cruza un valor umbral. Por ejemplo, el valor umbral para la diana viral, podría ser 0,1 y el valor umbral para el IC podría ser 0,02. Para la diana viral, si  $dRn(V)_c > 0,1$  y  $dRn(V)_{c-1} < 0,1$ :

5 entonces 
$$C_T(V) = \frac{0,1 - b(V)_c}{m(V)_c}$$
 ecuación 13

Para la diana IC, si  $dRn(IC)_c > 0,02$  y  $dRn(IC)_{c-1} < 0,02$ ,

10 entonces 
$$C_T(IC) = \frac{0,02 - b(IC)_c}{m(IC)_c}$$
 ecuación 14

15 Los valores de  $C_T$  calculados se redondean a dos decimales y a continuación se comparan con los valores de los resultados de la PCR. La comparación se utiliza para determinar si el archivo del componente se empareja correctamente o no con su archivo de resultados y, por lo tanto, se han originado a partir de la misma secuencia de pruebas.

20 La figura 1 es un diagrama de flujo que ilustra una realización de un procedimiento para la gestión de resultados del SDS convencional. El procedimiento de la figura 1 es capaz de superar las deficiencias de los resultados del SDS defectuosos. El procedimiento incluye la recepción de los archivos de datos, tal como se indica en el bloque 10. Los archivos de datos pueden ser recibidos, por ejemplo, a partir del SDS de un sistema de PCR o de otros sistemas de procesamiento y/o almacenamiento de datos asociados con el análisis de PCR. En el bloque 12, se calcula una señal fluorescente Rn durante un período basal que, por ejemplo, puede incluir los ciclos 3<sup>o</sup> a 15<sup>o</sup> del ensayo de PCR. En algunas realizaciones, la señal de fluorescencia Rn puede ser una señal informadora normalizada de cada ciclo que se calcula dividiendo la fluorescencia de un colorante informador por la fluorescencia de un colorante de referencia pasiva.

30 En el bloque 14, los valores del ciclo umbral ( $C_T$ ) se calculan a partir de los archivos de datos. Tal como se describe en más detalle a continuación, la figura 2 incluye un proceso para la integración de este cálculo del  $C_T$  según una realización. En el bloque 16, los valores de  $C_T$  calculados en el bloque 14 se comparan con los valores de  $C_T$  recibidos directamente del SDS. En el bloque de decisión 18, se determina si los valores comparados en el bloque 16 coinciden o no, asegurando de este modo la identificación correcta de los conjuntos de resultados. Si los valores coinciden, entonces el flujo se dirige al bloque 20. En el bloque 20, se hace una indicación de que los valores de  $C_T$  se han corregido y que los valores de  $C_T$  recién calculados se han verificado y se consideran fiables. Si los valores no coinciden, entonces el flujo se dirige al bloque 22, en el que se presenta una indicación al usuario de que se ha producido un error. El error podría ser el resultado del emparejamiento incorrecto de los valores de  $C_T$  recién calculados y los valores de  $C_T$  calculados por el SDS. El error podría ser además el resultado de un error en la instrumentación. Después de notificar el error en el bloque 26, termina el diagrama de flujo.

40 En el bloque de decisión 24, se determina si la fluorescencia durante el período basal aumenta o no en, como mínimo, un determinado porcentaje, por ejemplo, el 20%, en comparación con la fluorescencia durante ciclos fuera del período basal. Si no aumenta, se determina entonces que la muestra no contiene una titulación elevada de ácido nucleico. En este caso, el proceso incluye la verificación de que los valores originales de los resultados de la prueba de PCR son sustancialmente exactos, tal como se indica en el bloque 26, dado que los valores originales no han sido comparados con niveles elevados. Cuando los valores originales se verifican en el bloque 26, la rutina llega a un final. Sin embargo, si se determina en el bloque de decisión 24 que el aumento de fluorescencia es de, como mínimo, el porcentaje determinado, entonces la muestra puede ser marcada como que contiene un titulación elevada de ácido nucleico, tal como se indica en el bloque 28.

50 La figura 2 es un diagrama de flujo que ilustra una realización de un procedimiento para el cálculo de  $C_T$ . El procedimiento de la figura 2 se puede utilizar, por ejemplo, en lugar del bloque 14 mostrado en la figura 1 en el que se calcula  $C_T$ . En este procedimiento, bloque 30 indica que se calcula una señal de fluorescencia Rn. En algunas realizaciones, Rn se calcula mediante FAM / ROX. En el bloque 32, se calcula una fluorescencia basal utilizando un procedimiento de regresión lineal. En realizaciones alternativas, pueden utilizarse otros procedimientos estadísticos para calcular la fluorescencia basal. En el bloque 34, se calcula una señal diferencial dRn en la que dRn es la diferencia entre la señal de fluorescencia Rn y la fluorescencia basal en cada ciclo. En el bloque 36, se realiza un cálculo de la pendiente y la intersección de la señal diferencial dRn entre cada ciclo y el ciclo anterior. En el bloque 38, el ciclo umbral  $C_T$  se calcula como el ciclo fraccional en el que la señal diferencial dRn cruza un umbral. En el bloque 40,  $C_T$  se redondea a dos decimales.

65 Las operaciones y los procedimientos de los procedimientos descritos en la presente memoria descriptiva pueden ser incorporados en uno o más programas de software y se utilizan para procesar las correcciones y/o ajustes descritos en la presente memoria descriptiva y para generar una lectura de resultados más precisa en comparación con los resultados calculados originalmente en un SDS tradicional. Estos programas de software podrían ser utilizados para sustituir una sección de código de software en cualquier SDS relacionado o desarrollado en el propio

5 SDS. Los programas de software se podrían utilizar en SDS existentes en la actualidad o que se puedan desarrollar en el futuro. Además, el programa de software se puede incorporar en cualquier sistema de análisis por PCR que utiliza un formato de procesamiento similar para el análisis de una muestra. En algunas realizaciones, el programa de software se podría incorporar en un dispositivo autónomo y conectado a una salida de un sistema de PCR convencional que proporciona los resultados potencialmente defectuosos como se ha descrito anteriormente.

10 Además de los procedimientos ahora dados a conocer, que se utilizan para corregir la lectura del SDS, el procedimiento podría proporcionar además una indicación de las correcciones efectuadas. De esta manera, los procedimientos se pueden utilizar para proporcionar resultados más precisos después de procesar las señales tal como se ha descrito. La lógica de software para corregir o ajustar las señales se podría almacenar en un medio legible por ordenador. En algunas realizaciones, los procedimientos y operaciones se podrían implementar en hardware o software e incorporar en un sistema de gestión de datos, tal como un sistema de gestión de información de laboratorio (LIMS), y/o incorporar en un espectrómetro, tal como un espectrómetro de interferómetro de infrarrojos (IRIS).

15 Se debe entender que las etapas, procesos u operaciones de los procedimientos descritos en la presente memoria descriptiva pueden representar cualquier módulo o secuencia de código que se puede implementar en hardware, software, firmware, o una combinación de los mismos. Cuando se implementan en software o firmware, los procedimientos se pueden almacenar en la memoria y se pueden ejecutar mediante un dispositivo de procesamiento. Cuando se implementan en hardware, los procedimientos se pueden implementar, por ejemplo, utilizando circuitos de lógica discreta, un circuito integrado de aplicación específica (ASIC), una matriz de puertas programable (PGA), una matriz de puertas de sectores programables (FPGA), etc. o cualquier combinación de los mismos. Estos módulos y secuencias de código pueden incluir comandos o instrucciones para la ejecución de etapas, procesos u operaciones lógicas específicos dentro de los componentes físicos.

25 Además, se debe entender que una o más de las etapas, procesos y/o las operaciones descritos en la presente memoria descriptiva se pueden ejecutar de forma sustancialmente simultánea o en un orden diferente del que se describe de forma explícita, tal como comprendería una persona con experiencia habitual en la técnica. Los programas o códigos de software que incluyen instrucciones lógicas ejecutables, tal como las que se describen en la presente memoria descriptiva, se pueden incorporar en cualquier medio adecuado legible por ordenador para la ejecución mediante cualquier dispositivo de procesamiento adecuado. El medio legible por ordenador puede incluir cualquier medio físico que puede almacenar los programas o código de software durante un periodo de tiempo medible.

35 Las realizaciones descritas en la presente memoria descriptiva solamente representan implementaciones a título de ejemplo y no se pretende que limiten necesariamente la presente descripción a cualquiera de los ejemplos específicos. En cambio, se pueden hacer varias modificaciones a estas realizaciones tal como comprendería una persona con experiencia habitual en la técnica. Se pretende que cualquiera de dichas modificaciones quede incluida dentro del espíritu y alcance de la presente descripción y protegidas mediante las siguientes reivindicaciones.

40

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Procedimiento para la gestión de resultados de un instrumento de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real, comprendiendo el procedimiento:
- calcular, a partir de resultados del instrumento de PCR en tiempo real, una señal de fluorescencia de una muestra durante un período basal del instrumento de PCR en tiempo real;
- 10 determinar si la señal de fluorescencia durante el período basal aumenta o no en, como mínimo, un cierto porcentaje; y
- 15 marcar la muestra como una muestra de titulación potencialmente elevada, cuando la señal de fluorescencia aumenta en, como mínimo, el porcentaje determinado.
2. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que el porcentaje es del 20%.
3. Procedimiento, según la reivindicación 1, que comprende además:
- 20 verificar que los valores de fluorescencia originales detectados por el software de detección de secuencias (SDS) asociado con la PCR son sustancialmente precisos cuando se determina que la señal de fluorescencia durante el período basal no aumenta, como mínimo, el porcentaje determinado.
4. Procedimiento, según la reivindicación 1, que comprende además:
- 25 calcular el ciclo umbral ( $C_T$ ) a partir de los valores de fluorescencia originales detectado por el software de detección de secuencias (SDS) asociado con la PCR, y
- 30 comparar el  $C_T$  con los valores de ciclo umbral detectados por el SDS para determinar si hay coincidencia.
5. Procedimiento, según la reivindicación 4, que comprende además:
- 35 indicar el  $C_T$  calculado a partir de los valores de fluorescencia originales como los valores correctos cuando hay coincidencia, e
- indicar la aparición de error cuando no hay coincidencia.
6. Procedimiento, según la reivindicación 4, en el que el cálculo de  $C_T$  comprende además:
- 40 calcular una señal de fluorescencia como una proporción de FAM / ROX;
- calcular una fluorescencia basal utilizando un procedimiento de regresión lineal,
- 45 calcular una señal diferencial entre la señal de fluorescencia y la fluorescencia basal en cada ciclo;
- calcular la pendiente y la intersección de la señal diferencial entre cada ciclo y el ciclo anterior, y
- calcular la  $C_T$  como el ciclo fraccional en el que la señal diferencial cruza un umbral.
- 50 7. Procedimiento para analizar una muestra de sangre, procedimiento que comprende:
- cuantificar una muestra de sangre utilizando un instrumento de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR) para proporcionar resultados de PCR;
- 55 calcular una señal de fluorescencia a partir de los resultados de PCR proporcionados durante un período basal;
- determinar si la señal de fluorescencia aumenta, como mínimo, un porcentaje predeterminado durante el período basal, y
- 60 marcar la muestra de sangre como una muestra de titulación potencialmente elevada, cuando la señal de fluorescencia aumenta en, como mínimo, el porcentaje predeterminado.
8. Procedimiento, según la reivindicación 7, que comprende además:
- 65 verificar que los resultados de la PCR son sustancialmente precisos cuando se determina que la señal de fluorescencia durante el período basal no aumenta, como mínimo, en el porcentaje predeterminado.

9. Procedimiento, según la reivindicación 7, que comprende además:
- 5     calcular el ciclo umbral ( $C_T$ ) a partir de los resultados de la PCR, y
- comparar el  $C_T$  con los valores de ciclo umbral detectados por el software de detección de secuencias (SDS) asociado con la PCR para determinar si hay coincidencia.
10. Procedimiento, según la reivindicación 9, que comprende además:
- 10    indicar el  $C_T$  calculado a partir de los resultados de PCR como valores correctos cuando hay coincidencia; e
- indicar la aparición de error cuando no hay coincidencia.
- 15    11. Procedimiento, según la reivindicación 9, en el que el cálculo del  $C_T$  comprende además:
- calcular una señal de fluorescencia;
- calcular una fluorescencia basal utilizando un procedimiento de regresión lineal;
- 20    calcular una señal diferencial entre la señal de fluorescencia y la fluorescencia basal en cada ciclo;
- calcular la pendiente y la intersección de la señal diferencial entre cada ciclo y el ciclo anterior, y
- 25    calcular  $C_T$  como el ciclo fraccional en el que la señal diferencial cruza un umbral.
12. Medio legible por ordenador que incorpora una secuencia de código de software que es ejecutable por un dispositivo de procesamiento, secuencia de código de software que comprende:
- 30    una lógica configurada para calcular una señal de fluorescencia de una muestra durante un período basal de ciclos de ensayo de un instrumento de reacción en cadena de la polimerasa (PCR);
- una lógica configurada para determinar si la señal de fluorescencia durante el período basal aumenta o no en, como mínimo, un cierto porcentaje; y
- 35    una lógica configurada para marcar la muestra como una muestra de titulación potencialmente elevada, cuando la señal de fluorescencia aumenta en, como mínimo, el porcentaje determinado.
- 40    13. Medio legible por ordenador, según la reivindicación 12, en el que el porcentaje es del 20%.
- 40    14. Medio legible por ordenador, según la reivindicación 12, que comprende además:
- una lógica configurada para verificar que los valores de fluorescencia originales detectados por el software de detección de secuencias (SDS) asociado con la PCR son sustancialmente precisos cuando se determina que la
- 45    señal de fluorescencia durante el período basal no aumenta en, como mínimo, el porcentaje determinado.
15. Medio legible por ordenador, según la reivindicación 12, que comprende además:
- una lógica configurada para calcular el ciclo umbral ( $C_T$ ) a partir de los valores de fluorescencia originales detectados por el software de detección de secuencias (SDS) asociado con la PCR; y
- 50    una lógica configurada para comparar el  $C_T$  con los valores de ciclo umbral detectados por el SDS para determinar si hay coincidencia.
- 55    16. Medio legible por ordenador, según la reivindicación 15, que comprende además:
- una lógica configurada para indicar el  $C_T$  calculado a partir de los valores de fluorescencia originales como los valores correctos cuando hay coincidencia; y
- 60    una lógica configurada para indicar la aparición de error cuando no hay coincidencia.
17. Medio legible por ordenador, según la reivindicación 15, en el que la lógica configurada para calcular  $C_T$  está configurada además para:
- 65    calcular una señal de fluorescencia;



calcular la fluorescencia basal utilizando un procedimiento de regresión lineal;

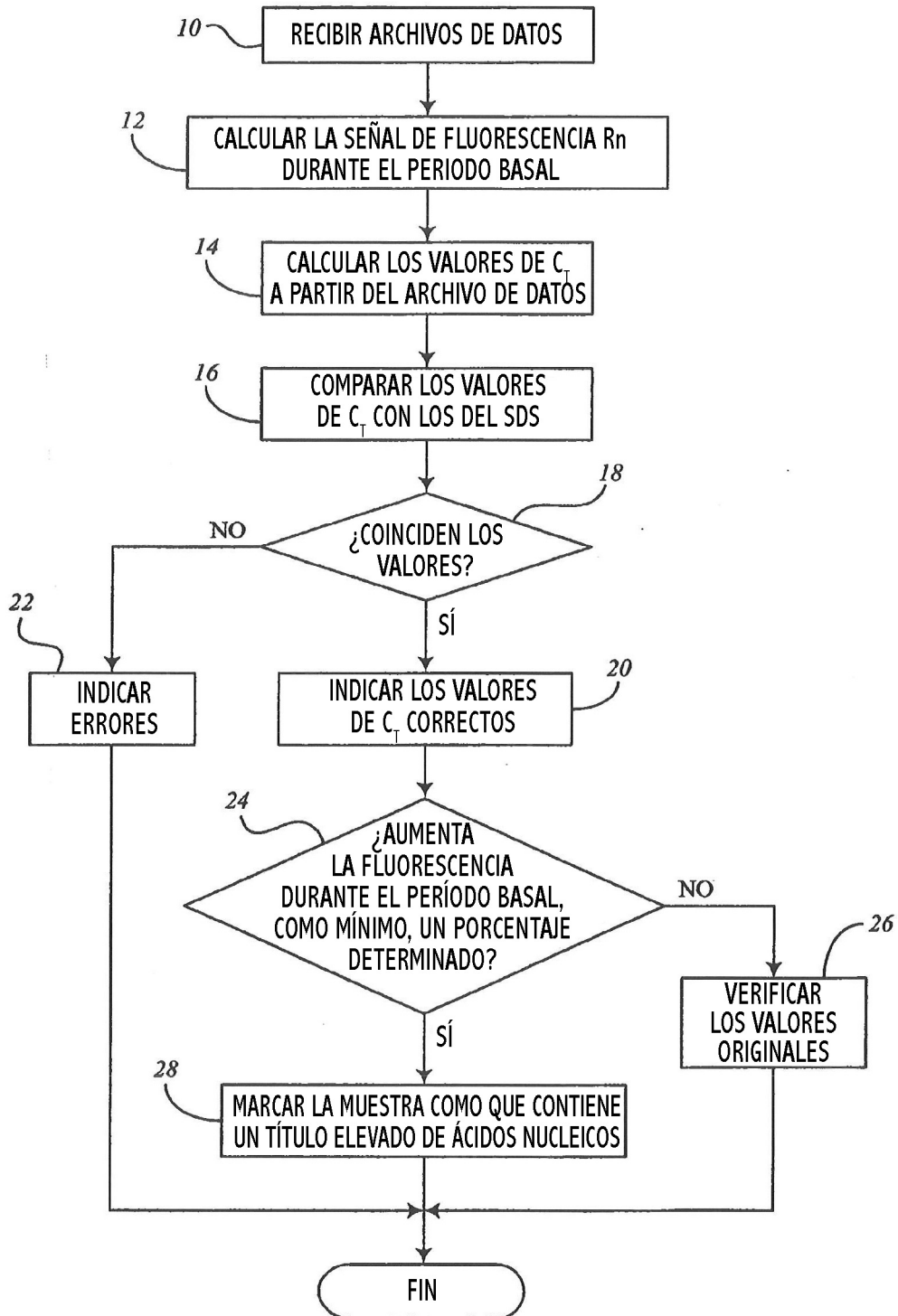
calcular una señal diferencial entre la señal de fluorescencia y la fluorescencia basal en cada ciclo;

5 calcular la pendiente y la intersección de la señal diferencial entre cada ciclo y el ciclo anterior; y

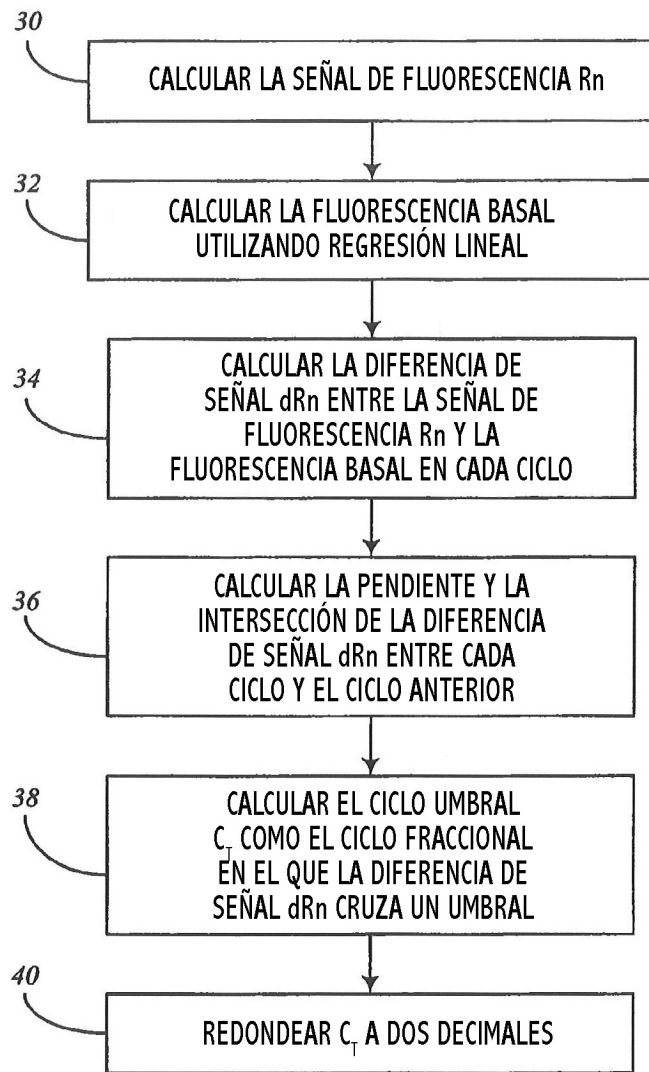
calcular el  $C_T$  como el ciclo fraccional en el que la señal diferencial cruza un umbral.

10 18. Medio legible por ordenador, según la reivindicación 12, en el que la secuencia de código de software está incorporada en el software de detección de secuencias.

15 19. Medio legible por ordenador, según la reivindicación 12, en el que la secuencia de código de software está incorporada en un dispositivo independiente configurado para recibir resultados de la PCR a partir de un software de detección de secuencias asociado con la PCR.



**FIG. 1**



**FIG. 2**