

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 737 403**

51 Int. Cl.:

C12M 1/34 (2006.01)

C12M 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.11.2009 PCT/US2009/064268**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.12.2010 WO10141040**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.11.2009 E 09845651 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.07.2019 EP 2438438**

54 Título: **Garantía de la adecuación de muestras usando técnicas de dispersión de la luz por turbidez**

30 Prioridad:

03.06.2009 US 183857 P

15.09.2009 US 242628 P

09.10.2009 US 588305

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

14.01.2020

73 Titular/es:

BECTON, DICKINSON AND COMPANY (100.0%)

1 Becton Drive

Franklin Lakes, NJ 07417, US

72 Inventor/es:

MILLER, JONATHAN MATTHEW;

EDENS, CARL THEODORE;

XIA, JIULIN;

MANTEFUEL, RICHARD L. y

ALLEN, NADIA P.

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 737 403 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

Garantía de la adecuación de muestras usando técnicas de dispersión de la luz por turbidez

5 **Divulgación de solicitudes relacionadas**

La presente solicitud es una continuación en parte de la solicitud de EE.UU. N° 12/588.305 presentada el 9 de octubre de 2009 titulada "Ensuring sample adequacy using turbidity light scattering techniques" (expediente de agente N° 74708.000601), y reivindica el beneficio de la solicitud provisional de EE.UU. N° de serie 61/242.628 presentada el 15 de septiembre de 2009 titulada "Ensuring Sample Adequacy of Clinical Cervical Specimens Using Turbidity Light Scattering Techniques" (expediente de agente N° 74708.000600) y la solicitud provisional de EE.UU. N° de serie 61/183.857 presentada el 3 de junio de 2009 titulada "Ensuring Sample Adequacy of Clinical Cervical Specimens Using Turbidity Light Scattering Techniques" (expediente de agente N° 7470800300). La solicitud de EE.UU. N° 12/588.305 también reivindica el beneficio de la solicitud provisional de EE.UU. N° de serie 61/242.628 y la solicitud provisional de EE.UU. N° de serie 61/183.857, y también es una continuación en parte de la N° de serie de EE.UU. U. 12/062.950, presentada el 4 de abril de 2008, que reivindica el beneficio de la solicitud provisional de EE.UU. N° de serie 60/910.565 presentada el 6 de abril de 2007.

20 **Antecedentes**20 **1. Campo de la materia**

La presente divulgación se refiere generalmente a métodos de medición de la adecuación de una muestra clínica estimando la cifra de células en volúmenes conocidos de fluido usando técnicas de dispersión de la luz, en particular turbidez. En otro aspecto, la presente divulgación proporciona máquinas para medir la adecuación de una muestra clínica estimando la cifra de células. Estas máquinas se pueden usar para procesamiento de alto rendimiento de muestras clínicas. En otro aspecto, la presente divulgación proporciona métodos de determinación de si una muestra contiene material adecuado para probar que la muestra es informativa.

30 **2. Descripción de la técnica relacionada**

En los campos de los diagnósticos clínicos, ciencias biológicas, medicina forense y biodefensa, la garantía de la determinación de la adecuación de una muestra puede proporcionar varios beneficios al proceso de análisis de muestras. La información contenida sobre la adecuación de una muestra puede aumentar la confianza y eficacia de los posteriores resultados de la prueba usando otros ensayos químicos, físicos y/o biológicos en esa muestra. La información contenida mejora el tratamiento del paciente puesto que es más probable que se descubran pacientes cuyo estado de salud sería distorsionado por la muestra inadecuada. El evitar informar de un resultado de salud no representativo y permitir que se vuelvan a tomar muestras de un paciente son resultados beneficiosos anticipados de la determinación de la adecuación de muestras. Además, el conocimiento de la adecuación de una muestra antes de realizar otros análisis de muestra puede dar como resultado ahorros de tiempo, material y trabajo, evitando las costosas pruebas en muestras inadecuadas no investigadas. Así, el establecer la garantía de las muestras en las pruebas de cribado en grandes poblaciones donde un número significativo de los resultados de prueba confirman una ausencia de análisis puede añadir valor como confirmación de que el resultado es representativo de la entidad original muestreada.

Las muestras clínicas que están siendo analizadas para la presencia de tipos específicos de células, virus, bacterias u otros patógenos se pueden beneficiar particularmente de los métodos de prueba objeto, ya que estos métodos facilitarán la exactitud de los resultados de prueba y además potenciarán la eficiencia. Un área específica que posiblemente se puede beneficiar de la garantía de adecuación de muestras es la prueba de muestras cervicales para infección por VPH. Por ejemplo, *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test® ("HC2") ha demostrado ser de extremo valor como componente de programas de cribado de cáncer de cuello uterino y gestión clínica de pacientes con ASCUS por citología. Actualmente, la prueba HC2 de ADN de VPH da un alto valor predictivo negativo de aproximadamente 99,5 % para la predicción de lesiones cervicales de CIN3 o superiores. Sin embargo, los laboratorios y pacientes pueden desear el control adicional y la garantía que se proporcionaría por medición de la adecuación de muestras. También se puede desear la oportunidad de rechazar probar una muestra determinada por ser inadecuada. Los documentos del estado de la técnica relevantes para la invención son los documentos de patente US 2006/120566 A1 y JP S61 66151 A.

60 **Sumario**

En vista de lo anterior, existe una necesidad de métodos de determinación de la adecuación de muestras. El uso de estos métodos puede permitir que un operario determine si excluye el procesamiento de una muestra que es considerada inadecuada para métodos de prueba específicos. Estos métodos pueden proporcionar el conocimiento de la adecuación de muestras, que puede ser útil para la interpretación de resultados de pruebas y decisiones de cuidado del paciente. Por ejemplo, si una muestra es inadecuada, se puede entender que un resultado negativo no representa necesariamente un resultado negativo verdadero, aunque un resultado positivo se puede todavía

considerar informativo de ciertos tipos de pruebas. La determinación de la inadecuación de muestras puede dar la opción de volver a muestrear para obtener una muestra adecuada antes de la prueba, ahorrándose así los costes de realizar un ensayo posiblemente indeterminado. Así, los métodos descritos en el presente documento pueden establecer una mayor capacidad de toma de decisiones en manos del usuario, por ejemplo, permitiendo la

- 5 determinación de si probar una muestra inadecuada, y puede proporcionar al profesional médico y/o paciente un mejor entendimiento del significado de un resultado negativo de la prueba. Las realizaciones preferidas de la invención pueden proporcionar uno o más de los beneficios anteriores, pero se pueden realizar otros beneficios en lugar o además de estos.
- 10 La presente divulgación proporciona un sistema de medición de la adecuación de muestras según la reivindicación 1.

Breve descripción de los dibujos

- 15 La Fig. 1 es una vista en sección lateral de un sistema de medición y control de la adecuación de muestras ("SAM").
- La Fig. 2 es una vista en sección lateral de un SAM.
- 20 La Fig. 3 es una vista isométrica de un recipiente de muestra de múltiples pocillos denominado una unidad de tubos de extracción ("UTE").
- La Fig. 4 es una vista isométrica de un SAM de 8 canales adaptado para su uso con muestras contenidas en una UTE.
- 25 La Fig. 5 es una vista desde arriba de un SAM de 8 canales adaptado para su uso con muestras contenidas en una UTE, pasando cada trayectoria de haz emitido a través de una porción de la UTE que se protege relativamente de arañazos durante el uso.
- 30 La Fig. 6 es una vista isométrica de un SAM de 8 canales modular adaptado para ser incorporado como módulo dentro de un sistema de procesamiento de muestras.
- Las Figs. 7 y 8 muestran la correlación entre la celularidad de la muestra determinada por qPCR y la turbidez de la muestra.
- 35 La Fig. 9 muestra la correlación entre la celularidad de la muestra determinada por recuento óptico de células y la celularidad de la muestra determinada por qPCR.
- La Fig. 10 muestra la correlación entre la turbidez de la muestra y la celularidad de la muestra determinada por recuento óptico de células.
- 40 La Fig. 11 muestra la correlación entre la celularidad de la muestra determinada por qPCR y la turbidez de la muestra.
- 45 La Fig. 12 muestra la correlación entre la celularidad de la muestra determinada por recuento óptico de células y la turbidez de la muestra para series de dilución de especímenes clínicos.
- La Fig. 13 muestra la correlación entre la celularidad de la muestra determinada por recuento óptico de células y la celularidad de la muestra determinada por qPCR para series de dilución de especímenes clínicos.
- 50 La Fig. 14 muestra la correlación entre la celularidad de la muestra determinada por qPCR y la turbidez de la muestra para series de dilución.
- La Fig. 15 muestra la correlación entre la celularidad de la muestra determinada por qPCR y la turbidez de la muestra para una población de 1076 muestras.
- 55 La Fig. 16 muestra la correlación entre la celularidad de la muestra determinada por qPCR y la turbidez de la muestra para un subconjunto de las muestras mostradas en la Fig. 15 que tienen volumen superior a 4 ml (PC_NOR = PreservCyt / Normal).
- 60 La Fig. 17 muestra la correlación entre la celularidad de la muestra determinada por qPCR y la turbidez de la muestra para un subconjunto de las muestras mostradas en la Fig. 15 que tienen volumen inferior a 4 ml y superior a 2 ml (PC_QNS = PreservCyt / Cantidad no suficiente).
- 65 La Fig. 18 muestra la correlación entre la celularidad de la muestra determinada por qPCR y la turbidez de la muestra para un subconjunto de las muestras mostradas en la Fig. 15 que tienen volumen inferior a 2 ml

(PC_QNS = PreservCyt / Cantidad no suficiente).

La Fig. 19 muestra la correlación entre la cifra de células bacterianas y la turbidez.

5 La Fig. 20 muestra la correlación entre la cifra de células bacterianas y la turbidez.

La Fig. 21 muestra la correlación entre la cifra de células totales (células bacterianas y humanas mezcladas) y la turbidez.

10 La Fig. 22 muestra la distribución de los valores de turbidez medidos de tubos de muestra en blanco sin arañosos que contienen medio solo.

La Fig. 23 ilustra la fracción de muestras que sería retenida o eliminada a un corte de turbidez dado.

15 Las Figs. 24-25 muestran la distribución de celularidad determinada por qPCR y de valores de turbidez para muestras clínicas divididas en subpoblaciones según el volumen de muestra. En cada figura, las barras de la izquierda en cada grupo corresponden a muestras que tienen volumen > 4 ml (N:669); las barras centrales en cada grupo corresponden a muestras que tienen volumen entre 2 ml y 4 ml (N:172); y las barras derechas en cada grupo corresponden a muestras que tienen volumen <2 ml (N:240).

20 La Fig. 26 muestra la distribución de turbidez para muestras SurePath ("SP").

La Fig. 27 muestra las mediciones de señal/referencia de patrones de turbidez para un modelo de trabajo de un sistema de medición y control de la adecuación de muestras ("SAM").

25 La Fig. 28 muestra una curva de calibración para un modelo de trabajo de un SAM de 8 canales.

La Fig. 29 muestra la dependencia del volumen de la muestra en cada canal de un modelo de trabajo de un SAM de 8 canales.

30 La Fig. 30 muestra la sedimentación de muestras con el tiempo y las consecuencias para la medición de turbidez.

35 La Fig. 31 muestra que las mediciones de turbidez por un SAM de 8 canales se correlacionaron con la turbidez medida por un medidor de Hach para cinco patrones de turbidez ($R^2=0,9993$).

La Fig. 32 muestra que las mediciones de turbidez por un SAM de 8 canales se correlacionaron con la turbidez medida por un medidor de Hach para muestras clínicas ($n=235$; $R^2=0,83$).

40 La Fig. 33 muestra la distribución de mediciones de turbidez de muestras en blanco por un SAM de 8 canales.

Descripción detallada

45 Los métodos y dispositivos descritos en el presente documento se pueden usar para mejorar la calidad de los resultados de pruebas en muchas industrias y aplicaciones y con muchos tipos de muestras. Esto incluye a modo de ejemplo muestras de tejido humano masculino y femenino que están siendo probadas para la presencia de tipos específicos de células anormales, virus, bacterias y similares. Ciertos ejemplos específicos proporcionados en la presente divulgación se relacionan con la mejora de la salud femenina evaluando muestras de tejido para infección por una o más cepas virales. Es de interés específico en estos ejemplos la detección analítica de múltiples cepas del virus del papiloma humano tales como VPH 16, VPH 18 y VPH 45 que son cepas de alto riesgo conocidas por provocar cáncer de cuello uterino en mujeres. La detección del virus usando métodos existentes generalmente usa células epiteliales muestreadas por un raspado con cepillo/hisopo del cuello uterino de una paciente que se suspende en un medio líquido. Las propiedades de los medios generalmente previenen el crecimiento de bacterias o contaminantes vaginales, proporcionan estabilidad a las células epiteliales y sin virus, y permiten la división en porciones de muestras para pruebas que permiten la detección de VPH o las consecuencias de la infección por VPH, que incluyen examen histológico, ensayos inmunológicos y ensayos de ADN.

60 La inadecuada adquisición de muestras o contaminación puede dar un resultado negativo debido a la ausencia de ADN viral de VPH libre representativo o una ausencia de células infectadas. Algunas pruebas de cribado de VPH viral tales como Hybrid Capture 2 de QIAGEN Gaithersburg, Inc., de Gaithersburg, Md. ("Qiagen") pueden detectar niveles de tan solo 5000 copias del virus. Algunos protocolos de adquisición de muestras permiten el uso de un cepillo o hisopo cervical para raspar las células del área cervical de una paciente por el profesional médico. El médico gira entonces inmediatamente el cepillo alrededor de un nuevo recipiente de muestra llenado en fábrica con un medio de transporte tal como PreservCyt™ (disponible de Hologic Inc., Marlborough, MA) o SurePath™ (disponible de BD Diagnostics, Burlington, NC). El recipiente se cierra etiquetado y luego se envía a un laboratorio para el cribado de VPH. En este momento, se combinan el medio y la muestra y se considera que es el mismo.

Podrían ocurrir varias formas de error de adquisición de muestras o contaminación en el proceso. Si el médico no raspa el revestimiento del cuello uterino con fuerza o técnica apropiada, puede no recoger un número representativo de células epiteliales en el cepillo/hisopo. La transferencia de las células del cepillo/hisopo al medio de transporte puede ser mala, dando como resultado menos transferencia o transferencia no representativa de células cervicales al medio. Durante la recogida puede ocurrir contaminación. Contaminantes tales como polvo, bacterias, partículas, DNasa, pelo, moco, etc., podrían entrar en el recipiente de muestra, medio, o muestra. Alternativamente, un recipiente no usado de medio de transporte se puede etiquetar erróneamente como la muestra del paciente y enviarse al laboratorio. Dichas muestras pueden ser inadecuadas para las pruebas. Si la muestra inadecuada pasa inadvertida, entonces se informaría un resultado negativo mientras que en realidad no se ha determinado el estado de salud real del paciente y así sigue siendo desconocido.

Tras la recepción en el laboratorio, la muestra inadecuada se transferiría del recipiente primario de adquisición y se ensayaría para determinar si el virus VPH está presente en el medio de transporte. Algunos ensayos requieren la homogenización del fluido hasta cierto nivel mientras que otros no. Durante la transferencia de los recipientes primarios o posteriores, se puede obtener una versión no representativa de la muestra para el ensayo. Por ejemplo, si la muestra está aglomerándose o sedimentando en el recipiente de muestra, una porción de alícuota puede malinterpretar la muestra. Pueden ser particularmente beneficiosos métodos de establecimiento de la garantía de muestras tanto no destructivamente como mientras se consume muestra mínima debido a que la muestra se considera preciosa puesto que la adquisición de muestras es frecuentemente una causa de traumatismo menor al paciente y puede ser poco frecuente para un paciente dado. Las realizaciones preferidas de la invención pueden proporcionar uno o más de los siguientes beneficios, pero se pueden realizar otros beneficios en lugar o además de estos.

Es probable que muestras inadecuadas den un resultado de VPH negativo independientemente del estado de salud real del paciente. Los sistemas de detección basados en qPCR tales como los distribuidos por Roche y ThirdWave ofrecen un control interno que permite la confirmación de la amplificación de ADN durante la prueba de detección de analitos. Específicamente, estas pruebas amplifican y detectan beta-globina. La cuantificación de los niveles de beta-globina presentes aumenta la garantía de muestras. Se usa beta-globina para aproximar el número de células por mililitro de medio de muestra presente aunque no es un recuento directo de células epiteliales. También se pueden usar otros genes de mantenimiento tales como histona. Puesto que la determinación de beta-globina usa los mismos reactivos que el análisis del analito, se realiza al mismo tiempo que la prueba del analito. Como resultado, aumenta la confianza en los resultados de la prueba, pero no existen posibles ahorros en tiempo, trabajo o materiales debido al entendimiento post facto de la adecuación de una muestra.

La presente divulgación proporciona métodos de determinación de la adecuación de una muestra antes de la determinación de analitos en forma de un control diferencial de blanco no destructivo o control de celularidad como se describe a continuación. Si un control diferencial de blanco es un método de determinación de que existe cambio de propiedades físicas entre el medio de blanco y el medio de blanco combinado con una muestra adecuada en ese caso específico, la diferencia física es debida a la densidad celular o celularidad de la muestra y medio combinados.

En un aspecto, la presente divulgación describe un dispositivo usado para establecer la garantía de muestras (la confianza en una adecuación de una muestra a probar para un analito clínico dado para determinar el estado de salud de un paciente). Se muestra un dispositivo a modo de ejemplo para determinar la adecuación de muestras de tejidos cervicales que se recogen en un medio de transporte o que se han concentrado y resuspendido en un medio líquido propicio para la posterior determinación de analitos o de la adecuación. Estos métodos se pueden usar como control de calidad para pruebas de diagnóstico aguas abajo tales como detectar la presencia de virus de VPH en la misma muestra. También se puede usar como comprobación de calidad antes de otras pruebas de diagnóstico molecular tales como para clamidia, gonorrea, etc.

Se pueden usar realizaciones a modo de ejemplo para analizar una muestra antes de un ensayo de análisis de ADN, tal como el ensayo Next Generation Hybrid Capture® High Risk desarrollado por Qiagen. Los ejemplos de este y otros ensayos que se pueden realizar conjuntamente con la determinación de la adecuación de muestras por realizaciones de los sistemas descritos en el presente documento se desvelan en las solicitudes provisionales de EE.UU. N° de serie 61/231.371, presentadas el 5 de agosto de 2009, titulada "METHODS AND KITS FOR ISOLATING NUCLEIC ACIDS USING AN ANION EXCHANGE MATRIX" y 61/147.862, presentada el 28 de enero de 2009, titulada "SEQUENCE SPECIFIC LARGE VOLUME SAMPLE PREP SOLUTION UTILIZING HYBRID CAPTURE TECHNOLOGY".

Mientras que dicho dispositivo puede detectar la adecuación de muestras antes, durante o después de la detección de una o más pruebas de analitos, es frecuentemente beneficioso detectar la adecuación de una muestra antes del procesamiento de la muestra para permitir ahorros de costes. Los ahorros de costes se realizan más probablemente cuando una muestra se determina como inadecuada y se detiene el procesamiento aguas abajo en esa muestra. Sin embargo, puede continuar el procesamiento a pesar de la inadecuación de la muestra, por ejemplo debido a que un resultado positivo (si se obtiene) puede ser, sin embargo, significativo aunque una muestra sea inadecuada para proporcionar la interpretación segura de un resultado negativo.

Los métodos a modo de ejemplo de la presente divulgación usan la tecnología de dispersión de la luz similar a la usada en medidores de turbidez para estimar el nivel de partículas en un fluido. Por ejemplo, en el campo de las ciencias medioambientales, el nivel de turbidez de las fuentes de agua como una estimación de la calidad del agua se determina comúnmente con medidores de turbidez de un solo canal. Los niveles de turbidez se determinan generalmente iluminando una muestra líquida con luz y detectando la luz dispersada a un ángulo de incidencia de la fuente iluminación. El principio físico subyacente es que el material en partículas en el líquido absorberá, reflejará, refractará y difratará la luz. La luz mostrada en la muestra líquida será o bien absorbida o bien dispersada más allá del ángulo de incidencia de la fuente de iluminación. Generalmente, cuanto más luz dispersada (fuera del eje de iluminación) sea detectada, más partículas en el fluido. Se seleccionan longitudes de onda de iluminación que permiten la reflexión de las partículas de interés. En este caso, serían de interés las longitudes de onda que generalmente son reflejadas de las células epiteliales o virus libres debido a que, sin intentar quedar limitado por teoría, se cree que para muestras cervicales y otras similares, es más probable que la reflexión de membranas celulares dé como resultado un fenómeno detectable distinto de la reflexión de virus libres.

La intensidad de la fuente de iluminación determina la relación entre la señal y el ruido alcanzable para muestras de una cierta densidad de partículas (celularidad). Cuanto más alta sea la intensidad, menos absorbancia reducirá la señal. Se prefiere que la luz se enfoque dentro del volumen de muestra líquida a granel y lejos de las superficies del recipiente de muestra para garantizar que la medición de la dispersión sea representativa de todo el volumen de muestra. Los medidores de turbidez de un solo canal comercialmente disponibles, por ejemplo, disponibles de VWR y Hach, usan luz halógena de banda ancha (bombilla de luz halógena) y diodos emisores de luz de infrarrojo cercano (LEDs de NIR) como fuentes de iluminación primarias para evaluar la turbidez. El uso de una fuente de banda ancha es un enfoque de acercamiento para asegurar que ocurre la dispersión de la luz, pero posiblemente sacrifica la relación entre la señal y el ruido, reduciéndose así el límite de detección y la resolución del dispositivo. Además, las fuentes de banda ancha pueden desperdiciar la energía con respecto a fuentes monocromáticas para lograr el mismo nivel de señal para una concentración de partículas dada en una muestra líquida.

Preferentemente, se utilizan el control y la medición de la intensidad de la luz para reducir la variabilidad entre las lecturas de dispersión. Por ejemplo, controlando directamente la tensión hasta una fuente de iluminación (por ejemplo, LED) en un sistema de bucle cerrado que está midiendo independientemente la intensidad de iluminación de la fuente, se puede generar una intensidad de iluminación constante. Similarmente, la intensidad de la fuente de iluminación se podría comprobar simplemente en un proceso de bucle más abierto para garantizar que esté dentro de un intervalo de intensidad aceptable. También se podría aplicar una corrección a la dispersión detectada final basada en la intensidad de bucle abierto de la luz de la fuente en un sistema precalibrado para corregir la variación en la intensidad de la luz de la fuente. Ciertas realizaciones a modo de ejemplo descritas en el presente documento usan la última comprobación del intervalo de bucle abierto y la corrección precalibrada de señal detectada basada en la intensidad de la fuente medida como medio primario de reducción de la variabilidad entre lecturas.

Las fuentes de luz a modo de ejemplo, que producen preferentemente luz monocromática, incluyen generación de luz láser; filtrado de fuentes de banda ancha usando filtros de absorción selectivos dicróicos (por ejemplo, vidrio coloreado), filtros de interferencia o diodos emisores de luz. Se cree que es ventajoso el mayor monocromatismo de la luz de la fuente de iluminación ya que puede reducir la cantidad de autofluorescencia en el recipiente de muestra, muestra líquida y materiales de construcción del dispositivo circundante cuando el monocromatismo está en el espectro de NIR donde generalmente se excitan menos materiales en autofluorescencia. La autofluorescencia se evita preferentemente debido a que tiende a elevar la señal de fondo y reducir la relación entre la señal y el ruido del sistema y podría reducir el límite de detección y la resolución del sistema.

El ángulo del haz y la coherencia de la luz de la fuente afectan el patrón de dispersión y la representación de la muestra. Una fuente de iluminación que se propaga demasiado próxima a la superficie del recipiente puede dispersar luz directamente en el detector de medición si el material del recipiente actúa de tubo de luz para el detector o refleja o refracta directamente luz en el detector de medición. Para evitar esta posible fuente de señal de fondo, se prefiere iluminar un núcleo, excepto la gran sección de la muestra dentro del campo de visión del detector de muestras. Normalmente, cuanto más grande sea el volumen iluminado dentro del campo de visión del detector, más representativo es el resultado de todo el volumen a granel de la muestra.

El rechazo de la luz ambiente es de particular preocupación para un dispositivo óptico con bajo límite de detección o resolución fina cerca de un valor de corte. Es preferible reducir o retirar los niveles de ruido de fondo. Se conocen en la técnica del diseño óptico varias formas de eliminar la luz ambiente, pero aparentemente estos métodos se tienen que aplicar todavía a la aplicación específica de determinar la adecuación de muestras antes de la prueba analítica con un método de dispersión de la luz. Un método de eliminación de la luz ambiente es polarizar la luz de la fuente de iluminación y luego detectar solo luz de una polarización similar, eliminando así la luz aleatoriamente polarizada de otras posibles fuentes ambientales. Esto reduce el nivel detectado de luz ambiente. Si se conoce el espectro de la luz ambiente, entonces el filtrado de las longitudes de onda conocidas de la luz detectable es otro medio de rechazo de la luz ambiente. La modulación de la intensidad de la fuente de iluminación a una frecuencia tanto diferente como distinguible de las variaciones de intensidad en fuentes de luz ambiental comunes permite un rechazo de la señal electrónica o rechazo de la señal post-procesamiento algorítmico de la luz ambiente de la señal detectada. Por ejemplo, un filtro paso banda análogo de Butterworth o un filtrado discreto de ChebyChev

podría distinguir una luz de la fuente de iluminación de 10 Hz de una fuente de luz ambiente de luz de 50-60 Hz y sus armónicos.

5 El método más básico de rechazo de luz ambiente es aislar/bloquear físicamente la muestra y el detector de la luz ambiente. El aislamiento en un sistema automatizado puede aumentar el coste, control de calidad, complejidad del ensamblaje, o requerir partes móviles adicionales y controles. Por consiguiente, ciertas realizaciones rechazan luz usando otros medios, mientras que establecen una vía óptica más accesible.

10 Las longitudes de onda de detección generalmente se seleccionan basándose en la sensibilidad del detector disponible en una longitud de onda de interés. Se prefiere que la sensibilidad del detector sea aceptable en el intervalo de luz que es dispersada de la muestra. En ciertas realizaciones a modo de ejemplo, este último intervalo es la misma longitud de onda que la luz de la fuente de iluminación.

15 La reflectancia de la interfase aire-líquido del menisco formado por la muestra en el recipiente de muestra puede afectar negativamente la señal, de manera que la colocación del volumen de muestra iluminado detectable fuera del menisco situando apropiadamente el detector puede mejorar la relación entre la señal y el ruido y limita los efectos volumétricos sobre la señal dispersada.

20 El recipiente de muestra o sus aberturas permiten la transmisión de tanto la luz iluminada como dispersada. El propio recipiente se puede usar beneficiosamente para filtrar, polarizar, o simplemente transmitir la luz de interés. Una realización de la presente divulgación seleccionaría un recipiente de muestra hecho de material con una alta transmitancia de la luz de la fuente de iluminación en la longitud de onda de interés. La geometría del recipiente se puede diseñar para evitar el paso de luz de la luz de la fuente de iluminación o luz ambiente al detector de medición. La geometría del recipiente puede actuar como una lente para enfocar, desenfocar, girar, o modificar de otro modo la forma o ángulo del haz de la fuente de iluminación y/o la luz que emana de la dispersión detectada para reducir o 25 agrandar el volumen iluminado central de muestra visible al detector de medición para potenciar la determinación de la adecuación de muestras. Las realizaciones de la presente divulgación pueden usar el recipiente de muestra como medio para controlar el ángulo de iluminación del haz o detectar luz. Las realizaciones adicionales usan manipulaciones ópticas separadas con lentes u otros elementos ópticos dentro de las trayectorias de iluminación o 30 de luz dispersa.

Un lector/medidor de garantía de muestras puede comprender un único o una pluralidad de canales para leer una o más muestras al unisono o por separado. El lector puede incluir un mecanismo de homogenización tal como un 35 agitador orbital o lineal que mezcla la muestra antes o durante una lectura. Alternativamente, el medidor se puede controlar por un sistema de software central o de lógica programable que permite separar el agitador orbital o lineal para homogeneizar la muestra antes o durante las lecturas. El agitador puede ser un brazo robótico que mueve el recipiente de muestra en un modo que homogeneiza la muestra. El mecanismo agitador también se puede proporcionar por la operación de un pipeteador; por ejemplo, cuando se usa un pipeteador para transferir una muestra al recipiente en el que se mide la garantía de muestras, el movimiento del propio pipeteador o la acción de 40 dispensación del pipeteador puede proporcionar la homogenización deseada.

El lector o el recipiente de muestra se puede o no se puede rotar/escanear durante la lectura o durante múltiples lecturas que se combinan algorítmicamente para informar una única determinación del nivel de garantía de 45 muestras. Un beneficio de rotar/escanear la muestra sería permitir una interpretación más representativa del nivel de garantía de muestras y/o reducir la dependencia de la claridad óptica (ausencia de arañazos, marcas, etc.) del recipiente de muestra.

Un lector de la garantía de muestras puede comprender una arquitectura de comunicación que es compatible con una mayor arquitectura del sistema automatizado para controlar el momento exacto y la funcionalidad del lector. El 50 lector puede comprometer una placa de detectores que amplifica pequeñas corrientes o tensiones generadas por el detector. Un caso a modo de ejemplo de la placa de detectores contiene 8 detectores de medición y sus circuitos de amplificación. Un lector puede comprender una placa de iluminación que ilumina la muestra con luz de la fuente. Un caso a modo de ejemplo de la placa de iluminación contiene 8 LED y sus circuitos controladores. El lector puede comprender una arquitectura de distribución de potencia que toma potencia eléctrica externamente proporcionada y 55 la distribuye a electrónica funcional en el módulo. Se concibe en el momento de desarrollo que la electrónica usada para alimentar, detectar, transmitir o interpretar la potencia y señales usadas en el dispositivo se podría montar remotamente de la localización de medición óptica real. También se concibe que añadir disposición de diseño para mejorar la compatibilidad electromagnética (EMC) para el dispositivo tales como apantallamiento por jaula de Faraday, añadir capacitancia de desacoplamiento, evitar bucles de tierra, etc., pueden mejorar el rendimiento del 60 dispositivo en una amplia variedad de entornos.

En la práctica, todos los recipientes de muestras que son plástico o vidrio tienen un nivel de turbidez o arañazos que puede alterar el patrón de dispersión de la luz. Las realizaciones a modo de ejemplo pueden utilizar 65 rotación/escaneado del recipiente de muestra para mitigar algunos de estos efectos. Otras realizaciones a modo de ejemplo pueden emplear detectores de medición en una localización en la que es poco probable que sean arañados en uso y/o producción. Alternativamente o además de estos métodos, el recipiente de muestra podría ser

comprobado para su calidad por arañazos ya sea antes de la transferencia de muestras al sistema automático como previamente en el proceso de producción del propio recipiente de muestra. Se podrían usar películas protectoras, bolsas o embalajes adicionales para proteger la naturaleza sin arañazos de un recipiente de muestra antes de la lectura.

5 Similarmente, es beneficioso controlar y medir en la producción la turbidez de los medios de transporte o de ensayo con los que se mezclará la muestra en el proceso de recogida. El cribado previo de la calidad de los medios permitirá el control más estricto del nivel de fondo y, por tanto, mejorará en rendimiento de la señal con respecto al ruido. Además, los niveles absolutos de turbidez media podrían afectar el límite de detección del sistema.

10 **Definiciones**

15 Una muestra es un subconjunto de o una entidad completa que está siendo probada para determinar características sobre la entidad. Por ejemplo, un ser humano puede proporcionar una muestra de sangre que se probará para un análisis de ADN viral de VIH. Se podría encontrar que la persona es VIH positiva y evaluar la carga viral de su sangre. Los tipos de muestras comunes que se podrían beneficiar de los métodos descritos en este documento son sangre, plasma, orina, raspados de tejido, muestras de pelo, muestras de gas, muestras líquidas, muestras sólidas, o muestras de partículas, dependiendo de la aplicación e industria.

20 La garantía de muestras se define como la confianza en la adecuación de una muestra.

La adecuación de muestras se define como una muestra en la que un resultado de prueba es representativo o predictivo del estado actual verdadero de la entidad que se prueba, tal como la presencia o ausencia de un virus específico (tal como VPH 16 u otros) en un individuo.

25 La invención se describirá ahora con más detalle con respecto a los siguientes ejemplos no limitantes específicos.

30 Con referencia ahora a la Figura 1, se muestra un primer sistema de medición y control de la adecuación de muestras ("SAM") 100 a modo de ejemplo capaz de medir la turbidez de una muestra. Se proporciona una muestra en el recipiente 150 que está soportado por la carcasa 120. La fuente de luz 102 que comprende un LED, por ejemplo, emite luz que se desplaza a lo largo de una trayectoria de haz de iluminación 104 esquemáticamente mostrada e ilumina la muestra 112. Se refleja o dispersa la luz de partículas suspendidas dentro de muestra 112 y se desplaza a lo largo de la trayectoria de haz emitido 106 al detector de muestras 108. La muestra 112 tiene volumen suficiente tal que el menisco 113 esté por encima de la porción de muestra 112 que refleja o dispersa luz, algo de la cual se desplaza a lo largo de la trayectoria de haz emitido 106. El detector de referencia 110 detecta luz transmitida de la fuente de luz 102 a lo largo de la trayectoria de haz de referencia 111 para permitir la corrección de la intensidad de la luz emitida de la fuente de luz 102. Se puede usar la intensidad de la luz detectada como detector de referencia 110 para calibrar la salida de luz de la fuente de luz 102 (por ejemplo, variando la tensión a esta fuente de luz), como una referencia tal que la turbidez se pueda calcular a partir de la comparación de la señal de luz detectada por el detector de muestras 108 y el detector de referencia 110, y como un indicador de si la fuente de luz 102 está funcionando apropiadamente o está funcionando mal y se debe sustituir.

45 El detector de referencia se puede usar para monitorizar las variaciones en la salida de luz LED. Se pueden usar calibradores de turbidez convencionales comercialmente disponibles o de uso (soluciones de suspensiones de partículas/células caracterizadas en densidades o tamaños de partículas/celulares diferentes) para mapear una relación entre el detector de medición y el nivel de turbidez. Además, el mapeo de una relación de turbidez en función del detector de medición y el detector de referencia pueden permitir la corrección de las lecturas de turbidez con variaciones razonables de la fuente de luz. Un mapeo a modo de ejemplo sería un mapeo lineal cerca del intervalo de corte donde la relación entre la señal del detector de medición y la señal del detector de referencia se mapea linealmente por partes a un curva de calibración de múltiples puntos (por ejemplo, 2 puntos, 3 puntos, n-puntos).

50 Para evitar la necesidad de muchos puntos de calibración para tratar no linealidades en el sistema, se pueden incorporar en el sistema la capacidad de detectar si la fuente de iluminación y el detector están funcionando. Por ejemplo, el dispositivo puede tener el destello de la fuente de iluminación a una frecuencia conocida para confirmar que ambos detectores y la fuente están funcionando con o sin un recipiente de muestra presente. La confirmación del canal óptico permite entonces que señales saturadas sean consideradas muestras adecuadas en una determinación cualitativa de adecuación de muestras. Por ejemplo, se puede informar simplemente de la adecuación de muestras como positiva o alternativamente como >200.000 células/ml para una señal saturada del detector de medición. Esta autocomprobación del canal óptico permite al diseño lograr mayor resolución estableciendo el convertidor analógico a digital (ADC) a una resolución más fina. Normalmente, la señal amplificada puede variar desde 0-12 V del detector. Si se establece un ADC de 16 bit a 0,7 V para cubrir el intervalo de aproximadamente 0-49 UNT (unidades nefelométricas de turbidez), puede mejorar la resolución cerca del corte y reducir la posibilidad de una zona gris en la determinación de la garantía de muestras. Alternativamente, el intervalo dinámico completo necesario para informar de un resultado cuantitativo único en toda la población de mujeres puede requerir la detección cerca de 700 UNF (unidades nefelométricas de formacina). Esto requeriría que el ADC se estableciera en

el intervalo de 10 V y así se podría reducir significativamente la resolución del lector cerca del corte. Cuando se desea una medición cuantitativa de la adecuación de muestras, se puede cambiar activamente la ganancia dentro de la lectura o mediante lecturas adicionales de la turbidez para lograr mejor sensibilidad a través del intervalo de turbidez. Este dispositivo también puede permitir una determinación binaria de la adecuación de muestras por lo que no se requiere el control activo de ganancia. Se conoce en la técnica la construcción y la programación de circuitos de detección capaces de tanto lecturas de intervalo limitado de alta sensibilidad como lecturas de intervalo extendido de baja sensibilidad, y no se necesitan tratar aquí en detalle.

El lector puede informar de lecturas corregidas al sistema automático mediante un puerto de comunicaciones. El software puede entonces comparar el valor con un valor de corte absoluto predefinido para ese tipo de muestra. Se pueden considerar adecuadas las muestras con una lectura de dispersión de la luz superior o igual al corte. Se pueden considerar inadecuadas en celularidad las muestras con un valor inferior al corte.

Con referencia ahora a la Figura 2, se muestra otro sistema de medición y control de la adecuación de muestras ("SAM") 200 a modo de ejemplo capaz de medir la turbidez de una muestra. En esta realización, la luz emitida y/o detectada se desplaza a través de canales de haz formados como pasadizos cerrados, generalmente cerrados o tapados. Se espera que los canales de haz, que pueden incluir un medio transmisor de luz tal como aire, gas, vidrio, plástico transparente, o similares, reduzcan el fondo que surge de la luz ambiente, y de luz dispersada de defectos en el recipiente de muestra 150. La luz emitida de la fuente de luz 202 se desplaza a través del canal de haz de entrada 209 e ilumina la muestra 212. Las partículas suspendidas dentro de la muestra 212 reflejan o dispersan la luz, algo de la cual se desplaza a través del canal de haz emitido 214 al detector de muestras 208. Se inhibe o previene que la luz dispersada de arañazos o imperfecciones en la porción iluminada 252 del recipiente de muestra 250 se desplace al detector 208 por el canal de haz emitido 214, disminuyendo posiblemente el fondo y haciendo las mediciones de turbidez relativamente menos sensibles a los arañazos en la porción iluminada 252 del recipiente de muestra 250. Similarmente, el detector de referencia 210 detecta luz transmitida de la fuente de luz 202 a lo largo del canal de haz de referencia 216, que excluye luz reflejada, dispersada y ambiente, y por consiguiente puede disminuir la señal de fondo que llega al detector de referencia 210 y que mejora la fiabilidad de esta medición.

La Figura 3 ilustra una realización a modo de ejemplo de una unidad de tubos de extracción ("UTE") 1100 que se puede usar como recipiente intermedio en los procesos y sistemas descritos en el presente documento o en otros sistemas. Esta UTE 1100 puede ser similar o idéntica a la descrita con respecto a las Figuras 4-6. Normalmente, una UTE incluirá una característica identificadora, tal como un código de barras, y una superficie de agarre que facilita la sujeción y/o movimiento de la UTE por un sistema automático. Una posición de muestra individual o tubo de ensayo dentro de una UTE se pueden denominar un tubo de UTE o posición de UTE.

La UTE 1100 a modo de ejemplo comprende un marco 1102 y varios tubos de ensayo 1104. En esta realización, se proporcionan ocho tubos de ensayo 1104. Sin embargo, en otras realizaciones se pueden usar doce tubos de UTE y UTEs que tienen otros números de tubos de ensayo. El marco 1102 puede comprender una estructura rígida que tiene resistencia adecuada para transportar los tubos 1102 y las muestras contenidas en su interior durante todas las etapas de procesamiento sin deformarse sustancialmente bajo las cargas aplicadas. El material también debe ser estable y suficientemente fuerte a las temperaturas de operación dentro del sistema. Los materiales adecuados pueden incluir, por ejemplo, metal, madera o plástico (por ejemplo, nailon, poli(cloruro de vinilo), polipropileno, poliestirenos tales como ABS y HIPS, etc.).

Los tubos 1104 pueden comprender cualquier forma adecuada. La realización representada tiene un fondo redondo que facilita la mezcla con vórtex y minimiza pipetear el volumen muerto. Los tubos de fondo cónico también compartirían estas características. Se pueden usar otras formas, tales como formas de fondo plano, en otras realizaciones. Se pueden configurar las dimensiones y formas de los tubos 1104 para facilitar el procesamiento aguas arriba o aguas abajo. Los tubos 1104 se pueden hacer de cualquier material adecuado, tal como vidrio o plástico. Para facilitar la prueba óptica, tal como en un ensayo de turbidez, los tubos de ensayo 1104 se forman preferentemente en parte o completamente de un material transparente o semitransparente que tiene claridad y transparencia suficientes para permitir la prueba deseada. Los tubos de ensayo 1104 pueden formar parte integrante del marco 1102 (tal como formándolos del mismo material que forma el marco 1102 o moldeándolos en el sitio dentro del marco 1102), o se forman por separado y se unen al marco (tal como por accesorio a presión, adhesivos, tornillos pasadores, roscas formadas en los tubos de ensayo 1104, etc.).

Los tubos de ensayo 1104 se disponen en una línea a lo largo de la longitud del marco 1102, pero en otras realizaciones, en las que el marco 1102 puede tener diferentes formas, los tubos de ensayo 1104 se pueden disponer en cualquier otra matriz o patrón adecuado. Como se muestra en la Figura 3, el marco 1102 es alargado, y puede tener extremos agrandados 1106 que dan como resultado cavidades que se forman a lo largo de uno o ambos lados largos del marco 1102. En la realización mostrada, el marco tiene una forma de "hueso de perro" como se observa desde arriba. Como resultado de proporcionar los extremos agrandados 1106, las cavidades crean espacios entre UTEs adyacentes cuando múltiples UTEs se embanan muy juntas. Esto permite que una pinza acceda y coja individualmente cada UTE 1100.

La Figura 4 muestra una realización a modo de ejemplo de un sistema de medición y control de la adecuación de

muestras ("SAM") adaptado para su uso con un recipiente de muestra multi-canal tal como una unidad de tubos de extracción ("UTE"). La UTE puede ser similar o idéntica a la descrita en el Ejemplo 2. SAM 400 incluye la carcasa 420 que soporta la UTE 1100. Las fuentes de luz, detectores y tubos de la UTE se configuran individualmente similarmente a las configuraciones descritas en el Ejemplo 1. En la realización representada, cada tubo de la UTE 1104 tiene su propia fuente de luz, detector de muestras y detector de referencia, aunque no todos se muestran o etiquetan en la figura. La luz emitida desde una fuente de luz debajo de cada tubo de muestra ilumina cada muestra. Las partículas suspendidas dentro de cada muestra reflejan o dispersan la luz, algo de la cual se desplaza a través de cada canal de haz emitido 414 a cada detector de muestras 408. Cada detector de referencia 410 detecta la luz transmitida desde cada fuente de luz a lo largo de cada canal de haz de referencia 416. Cada detector de muestras y detector de referencia están montados en un soporte 422 que puede comprender una placa de circuito impreso. En otras realizaciones, se pueden integrar múltiples detectores e incluso emisores en una única placa de detectores, y dicha placa puede incluir los ocho detectores de medición en el sistema de 8 tubos mostrado.

La fuente de iluminación puede ser o bien un LED rojo o de NIR con un ángulo del haz de cinco grados o más estrecho que está iluminando un PS, PETG, PP, PC, PMMA, vidrio, u otro recipiente de muestra de material transparente (por ejemplo, un tubo de ensayo de fondo redondo de 5 ml que generalmente contiene aproximadamente 1,5 ml de líquido de medio de muestras). El ángulo del haz es suficientemente estrecho para evitar la iluminación de las paredes del tubo antes de que se llegue al menisco. Además, el haz se dirige a una superficie plana o curvada del tubo que es principalmente perpendicular al haz de iluminación entrante de forma que sea poco probable que la pared del recipiente de muestra actúe de tubo de luz debido a que se espera que esta disposición evite la reflexión interna total y reflexiones internas parciales de la luz. El haz de iluminación tiene un tamaño de punto pequeño cuando entra en el tubo que reduce el área de la superficie del tubo a través de la que pasa el haz. Así, solo esta área relativamente pequeña es sensible a arañazos o turbidez que podrían afectar la cantidad y dirección de luz disponible para la detección de la adecuación de muestras. Preferentemente, esta área se mantiene sin arañazos, pero se espera cierta tolerancia del sistema a arañazos y otras imperfecciones. El campo de visión del detector de medición puede incluir la mayoría de la porción de la región de fluido central que es iluminada, y poco de la región central sin iluminar, para rechazar la luz ambiente y la dispersión secundaria de las reflexiones distintas de la iluminación primaria.

En la realización representada en la Figura 4, cada detector está situado para detectar luz emitida a lo largo de una trayectoria de haz a un desplazamiento de ángulo desde el eje largo de la UTE. En esta configuración, la trayectoria de haz emitido se desplaza preferentemente a través de una superficie protegida de la UTE, es decir, la porción de la UTE que es menos probable que se frote contra otra superficie durante el uso y, por consiguiente, se protege de arañazos. En la realización mostrada de una UTE 1100, las superficies del tubo que se van a arañar más probablemente son los lados de los tubos a lo largo de los planos exteriores que son tangentes a los diámetros externos de todos los tubos - dicho de otro modo, las porciones de los tubos perpendiculares al eje largo de la UTE 1100. Las restantes porciones de cada tubo 1104 se protegen, al menos hasta cierto grado, por los tubos adyacentes 1104, debido a que un objeto debe llegar al menos parcialmente entre tubos para ponerse en contacto y dañar o arañar las porciones protegidas de la superficie del tubo. Sin embargo, los tubos de los extremos no gozan necesariamente de este tipo de protección, y la trayectoria de haz emitido se puede desplazar a través de una localización posiblemente expuesta. Por ejemplo, en la realización de la Figura 4, los detectores (unidos al soporte 422) en la posición más a la derecha pueden detectar la turbidez a través de una porción del tubo derecho que no está protegido por un tubo adyacente.

Con referencia ahora a la Figura 5, se representa en una vista desde arriba una realización alternativa de SAM 500. En esta realización, los detectores para los cuatro tubos de la izquierda se sitúan en un lado diferente de la UTE que los detectores para los tubos de la derecha. Además, a diferencia de la realización de la Figura 4, los detectores están todos orientados para detectar la turbidez a través de porciones de los tubos que se protegen por tubos adyacentes. En la realización representada, cada UTE tiene su propia fuente de luz, detector de muestras y detector de referencia (tal como se muestra en la Figura 1 o 2), aunque no todos se muestran o etiquetan en la figura. Cada detector de muestras y detector de referencia está montado en un soporte 522 que puede comprender una placa de circuito impreso. Se ilumina una muestra contenida en cada tubo individual de UTE 1100 desde debajo por una fuente de luz, y una porción de la luz dispersada o reflejada de las partículas contenidas dentro de cada luz de la muestra se desplaza hacia la trayectoria de luz 514 y es detectada por el detector de muestras 508. El detector de referencia 510 detecta la luz transmitida desde la fuente de luz 502 a lo largo del canal de haz de referencia 516. Las trayectorias de luz 514, 516 y detectores 508, 510 están orientados en un ángulo oblicuo con respecto al eje largo de la UTE 1100, de manera que la trayectoria de luz pasa a través de las porciones protegidas de los tubos (es decir, porciones de los tubos que son adyacentes a otro tubo u otra estructura que inhibe el contacto con el entorno). Esta disposición también puede facilitar la colocación más cercana de múltiples SAMs 500 el uno al lado del otro.

Con referencia ahora a la Figura 6, se representa un SAM de 8 canales 600 que se puede incorporar como módulo dentro de un sistema de procesamiento de muestras. La carcasa 620 contiene los componentes de un SAM multi-canal similar al descrito anteriormente que se puede montar dentro de un sistema automático. Por ejemplo, un sistema automático puede usar recipientes individuales o UTEs o recipientes similares como recipiente intermedio en los procesos y sistemas. Los ejemplos de dichos sistemas se describen en la solicitud de EE.UU. N° 12/062.950, titulada "SAMPLE PREPARATION SYSTEM AND METHOD FOR PROCESSING CERVICAL SPECIMENS",

presentada el 4 de abril de 2008, solicitud de EE.UU. N° 12/588.304 (expediente de agente N° 75820.000401), titulada "AUTOMATED ASSAY AND SYSTEM", presentada el 9 de octubre de 2009, y en la solicitud de EE.UU. N° 12/588.306 (expediente de agente N° 74708,001001), titulada "Open Platform Automated Sample Processing System", presentada el 9 de octubre de 2009, cada una de las cuales se incorpora por este documento como referencia en su totalidad.

La Figura 27 muestra las mediciones de señal/referencia de patrones de turbidez para un modelo de trabajo de un sistema de medición y control de la adecuación de muestras ("SAM"). Se midieron los patrones de turbidez (muestras que tienen valores de turbidez conocidos) usando un SAM de 8 canales. La señal/referencia proporciona la relación entre la señal medida en el detector de muestras y la señal medida en el detector de referencia.

La Figura 28 muestra una curva de calibración para un modelo de trabajo de un SAM de 8 canales. Se han representado los valores de señal/referencia frente a valores de turbidez conocidos de patrones de turbidez, y ajustado una curva de calibración lineal a los datos.

La Figura 29 muestra la dependencia del volumen de muestra en cada canal de un modelo de trabajo de un SAM de 8 canales. Para volúmenes de 1,2 ml e inferiores, la tensión muestra una fuerte dependencia del volumen de muestra, mientras que la tensión es relativamente independiente del volumen para volúmenes de muestra de 1,3 ml y superiores. Tomados conjuntamente, estos resultados indican que el presente modelo puede medir con exactitud la turbidez de volumen que tiene 1,3 ml y superior, mientras que el volumen de muestra tiene un impacto significativo sobre las mediciones de muestras que tienen un volumen de 1,2 ml e inferior. Para proporcionar mayor exactitud de la garantía de medición, se puede elegir un mayor volumen mínimo (por ejemplo, se usa un volumen mínimo de 1,5 ml en los ejemplos de a continuación). La Figura 30 muestra la sedimentación de muestras con el tiempo y las consecuencias para la medición de turbidez.

Ejemplos

Ejemplo 1

Comparación del sistema de detección de 8 canales con el turbidímetro de Hach

Se compararon las mediciones de turbidez tomadas usando un sistema de detección de 8 canales similar a los sistemas mostrados en las Figuras 1-2 y 4-6 con mediciones de turbidez tomadas usando un medidor de turbidez (modelo de turbidímetro de laboratorio 2100N, Hach Company, Loveland, Co., ("medidor de Hach")). Se midieron cinco patrones de turbidez con cada dispositivo, dando un coeficiente de correlación $R^2=0,9993$ (Figura 31). Además, como se ilustra en la Figura 32, hubo una fuerte correlación ($n=235$; $R^2=0,83$) entre las mediciones tomadas con el medidor de Hach y el sistema de detección de 8 canales para especímenes clínicos en medio PreservCyt (disponible de Qiagen). Estos resultados confirman además la validez de las mediciones obtenidas con un sistema de detector de 8 canales a modo de ejemplo.

En este ejemplo y los otros ejemplos descritos en el presente documento, las mediciones de turbidez usando el medidor de turbidez HACH 2100N o HACH 2100AN se realizaron esencialmente según el siguiente protocolo. Con el medidor encendido, se activa el programa "Collect" ("Recoger") en el ordenador. De la parte superior del menú se selecciona "Instruments" ("Instrumentos"), luego "Abrir" ("Open"), luego "HACH 2100AN". Se elige un destino de datos y se abre una hoja de cálculo con una plantilla de turbidez de la muestra. De la parte superior del menú se selecciona "Instrumentos" ("Instrumentos"), luego "Comando" ("Command"), luego se selecciona "leer 30 veces por segundo" ("30 read at 1 second interval") del menú de comandos. Está listo un número de ID de muestra escaneando el código de barras de la muestra. Se pipetea un volumen de muestra de 1,5 a 2 ml en un tubo de poliestireno o PETG, se agita con vórtex durante 2 segundos, y se pone en la ranura de muestra del medidor de HACH. Entonces se selecciona "Enviar" ("Send") del menú "Comando" ("Command"). Cuando termina, se selecciona el botón "Parar" ("Stop") situado en la parte superior del menú. Finalmente, se seleccionan "Instrumento" ("Instrument"), luego "Salir" ("Exit").

En este ejemplo y los otros ejemplos descritos en el presente documento, se realizaron mediciones de turbidez usando un medidor de turbidez de 8 canales esencialmente según el siguiente protocolo. En el ordenador, se abre SAC-UI (Interfaz de usuario del control de adecuación de muestras); esto abre "Simulador de interfaz de QIAGEN SAC" ("QIAGEN SAC interface Simulator"). SAC UI tiene cuatro opciones de comandos. La 1ª opción de comando es "Comandos de operación" ("Operation Commands"), 2ª "Comandos de diagnóstico" ("Diagnostic Commands"), 3ª "Comandos de calibración" ("Calibration Commands"), 4ª "Comandos del fabricante" ("Manufactures Commands"). *Operation Commands* permite al usuario cambiar el modo de usuario y tomar mediciones de turbidez. *Calibration Commands* permite a los usuarios crear o cargar datos de calibración. De *Operation Commands* se selecciona *-MD-Set Mode* y el modo se establece en "M" (fabricación); este modo permite al usuario crear o cargar datos de calibración. Entonces se selecciona "Calibration Commands", luego "CD-Upload Calibration" para cargar los datos de calibración. A continuación, se selecciona "Operation Commands" y el modo se establece en "O" (modo operativo), que desactiva el acceso a datos de calibración y previene el cambio accidental de la calibración de la unidad. Una vez se han completado estas etapas, el sistema está listo para leer la turbidez de las muestras. Las

muestras se cargan en un portamuestras de 8 canales con un volumen mínimo de 1,5 ml. "Operation Commands" proporciona dos funciones para leer y muestrear el valor de turbidez. "BG-Begin Read" envía la señal para que sea leída la turbidez. "SA-Acquire Sample" envía la señal para que se muestre el valor de turbidez. Hacer clic en "SA-Acquire Sample" para ver el valor de turbidez. Primero, se selecciona BG-Begin Read, y segundo, se selecciona SA-Acquire Sample. Una vez se completa la lectura de turbidez, el recuadro de error mostrará "no error" en tanto la columna de BG-Begin Read como de SA-Acquire Sample. Entonces, el "Recuadro de resultados" muestra el valor de turbidez para cada canal empezando con el canal uno (canal 1, canal 2, ... canal 7, canal 8). Se presenta el valor de turbidez hasta tres cifras decimales. El valor presentado es UNTx10. Por ejemplo, si el valor mostrado es '053' la turbidez es 5,3 UNT; si el valor mostrado es '235' la turbidez es 23,5 UNT.

Ejemplo 2

Mediciones de turbidez de muestras en blanco

Se midió la turbidez de muestras "en blanco" (que contienen solo agua o medio PreservCyt). Con referencia ahora a la **Figura 33**, hubo muy poca contribución por el medio en blanco a los valores de turbidez. Específicamente, 75 % de los tubos tuvieron lecturas de 0,2 UNT e inferiores, mientras que 97,5 % tuvieron lecturas de 0,9 UNT. Estas lecturas más altas (>1,0) fueron evidentemente debidas a arañazos en los tubos y cómo se embalaron. Los efectos de los arañazos se pueden reducir tomando medidas para minimizar los arañazos a los tubos durante la fabricación, embalaje, o manipulación, y/o tomando medidas para minimizar el efecto de los arañazos, tales como transmitiendo luz a la muestra y al detector a través de las porciones de los tubos en las que es menos probable que se arañen, por ejemplo como se ha descrito anteriormente.

Ejemplo 3

Comparación de la celularidad de la muestra determinada por medición de turbidez, cifras de células y cuantificación de ADN.

Este ejemplo describe estudios que comparan la celularidad de la muestra determinada por medición de turbidez, recuento directo de células por hemacitometría y cuantificación de ADN por qPCR. Estos dos últimos métodos, recuento directo de células por hemacitometría y cuantificación de ADN por qPCR, son métodos ampliamente aceptados de determinación de la celularidad, siendo el recuento directo de células por hemacitometría generalmente considerado el método más preciso. Estos experimentos se realizaron usando muestras cervicales recogidas de una población no sesgada de mujeres en Laurel, MD. Se recogieron cientos de muestras y se evaluaron para reunir estos datos preliminares. Ciertos de estos estudios usaron menos del número total de muestras de pacientes disponibles. Se obtuvieron muestras de PreservCyt (PC) de centros cervicales en Laurel, MD. Se realizó un estudio de comparación entre medición de turbidez, cifras de células y densidad celular a partir de la cuantificación de ADN. Un medidor de Hach midió la turbidez en tubos de poliestireno de 75 ml con alícuotas de muestra de 2 ml.

Se usó un hemocitómetro para cuantificar las células en un volumen de muestra de 22 μ L (N=99). Se usó un ciclador térmico en tiempo real de Stratagene con detección de fluorescencia para cuantificar ADN usando un control de beta-globina por qPCR ABI (N=691, N=398). Entonces se convirtió la cuantificación de ADN en densidad celular (células/ml) para la comparación. La mayoría de las muestras contuvieron 10.000-1.000.000 células/ml dando valores superiores a 10 UNT (UNF). Los medios de PC de blanco (N=100) confirmaron un umbral del IC de 99,5 % de 2 UNT usando el medidor de Hach. Se muestra un ajuste de curva logarítmica a través de estos datos en la **Figura 7**. La población de Laurel, MD, muestra una correlación media entre valores de qPCR y valores de turbidez, con R^2 igual a aproximadamente 0,36. Estos resultados ilustran tanto la naturaleza de la población en ensayo como la relación real entre la turbidez y la celularidad cerca del punto de corte para la adecuación de muestras. Muestreando en exceso la población típica para encontrar valores en el intervalo de corte (>40 UNT), se encontró una correlación moderada de $r^2=0,52$ (N=398) entre la turbidez y la densidad celular como se mide por beta-globina (**Figura 8**).

Para determinar si la variabilidad era provocada por un método específico de adecuación de muestras o variabilidad en la muestra real, se compararon tanto los métodos de turbidez como de qPCR con la estimación de hemocitometría (recuento manual de células) de células humanas. Comparando ambos métodos contra el método de recuento manual de células se encontró que ambos métodos tenían grandes correlaciones con la cifra de células pero que el método de la turbidez tenía una mayor correlación. Con referencia ahora a las **Figuras 9, 10, y 11**, se analizaron las 99 muestras de baja celularidad seleccionadas al azar para turbidez, qPCR de beta-globina y hemocitología. La correlación entre mediciones de turbidez y hemocitología ($R^2 = ,7586$) fue mejor que la correlación entre qPCR de beta-globina y hemocitología ($R^2 = ,5722$), (la correlación entre turbidez y qPCR fue $R^2 = 0,5861$) que indica que la turbidez puede ser una forma más precisa de medir la celularidad que qPCR.

Para confirmar adicionalmente la relación y reducir los efectos de la variabilidad de muestras, se diluyeron sucesivamente 5 muestras de densidad celular y se encontró que la correlación entre la cifra de células y la turbidez era grande con $r^2>0,89$ para tanto la turbidez como beta-globina frente a la cifra de células (**Figura 12, 13 y 14**).

Esta evidencia soporta la noción de que se podría definir un corte que asegurara la adecuación de muestras para 90-100 % de la población de prueba.

5 Con referencia ahora a la **Figura 15**, la celularidad evaluada por mediciones de turbidez y por valores de qPCR para más de 1000 especímenes clínicos en medio PreservCyt reveló una gran correlación entre la turbidez y la densidad celular (células/ml) ($R^2=0,672$). También se muestran individualmente subconjuntos de los datos que tienen diferentes volúmenes de muestra: > 4 ml de volumen (N=669, $R^2=0,311$) (**Figura 16**); > 2 ml y < 4 ml de volumen (N=172, $R^2=0,6004$) (**Figura 17**); y < 2 ml de volumen (N=235, $R^2=0,657$) (**Figura 18**). En general, este estudio comparativo de valores de turbidez y valores de qPCR para más de 1000 especímenes clínicos en medio PreservCyt reveló una gran correlación entre la turbidez y la densidad celular (células/ml) ($R^2=0,7$).

15 En este ejemplo y los ejemplos adicionales descritos en el presente documento, se realizó el recuento celular esencialmente según el siguiente protocolo. Se mezcla una muestra usando una mezcladora mecánica durante 30 segundos a 4000 rpm. Después de la mezcla rigurosa, entonces se pipetea 50 uL de muestra en tubo de centrifugadora de 1,5 ml, y se añaden 5 uL de colorante Cyto-stain a la muestra y se mezcla. Entonces se incuba la mezcla de muestra-colorante a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se limpian un hemacitómetro y cubreobjetos usando agua desionizada, luego 70 % de alcohol, y el cubreobjetos limpio se pone cuidadosamente sobre el hemocitómetro. Entonces se pipetea en la cámara 11 uL de mezcla de muestra-colorante; entonces se dispersa uniformemente por acción capilar. Se tiene cuidado de no mover el cubreobjetos una vez se ha añadido una muestra, ya que el mover el cubreobjetos puede alterar la distribución homogénea de células. Se visualiza el hemacitómetro a través de un microscopio y se cuentan las células en al menos cinco cinco cuadrados de 1 mm² de área (los cuatro cuadrados en cada esquina y el cuadrado del centro). Para una muestra de bajas células se cuentan los 18 cuadrados. Solo las células que están contenidas dentro de un cuadrado o que solapan los bordes superiores e izquierdos del cuadrado (se omiten las células que solapan los bordes inferior y derecho del cuadrado para prevenir el contar en exceso o contar dos veces). Si existen menos de 50 células o más de 200 células por 1 mm² de área, se ajusta la dilución y se vuelve a contar la muestra. Se calcula la concentración de células del siguiente modo: Primero, se divide el número de células entre el número de cuadrados contados para dar las células promedio por cuadrado; entonces se multiplica por 10⁴ el número promedio de células por cuadrado para dar el número de células por ml en la muestra contada; y finalmente, si se ha diluido la muestra, este resultado se multiplica por el factor de dilución para dar el número de células por ml en la muestra original sin diluir.

35 En este ejemplo y los otros ejemplos descritos en el presente documento, se realizó la extracción de ADN de células usando el protocolo de extracción QIAamp (Protocolo QIA96 MinElute – Para aislamiento de ADN), esencialmente del siguiente modo. Cuando el kit es nuevo, se prepara tampón AW2 añadiendo 30 ml de etanol a la botella de reactivo (viene previamente con una alícuota de 13 ml) y se etiqueta la botella de tampón AW2 para mostrar que se ha añadido EtOH. El reactivo es estable a temperatura ambiente durante un año. Todas las muestras y reactivos ATL, AL, AVE, AW2 se llevan hasta temperatura ambiente. Se encienden los calentadores de placas de pocillos profundos y se equilibran hasta 56 °C y 70 °C. Se mezcla tampón ATL suficiente con proteinasa K en una relación 80:20 para añadir 100 uL a cada muestra. Se añaden 100 uL de mezcla de tampón ATL/PK a cada pocillo de S-Block. Entonces se añaden 250 uL de cada muestra a un pocillo en S-Block y se mezcla en un agitador de placas a 1100 rpm durante 15 s. Entonces se incuba la placa a 56 °C en el calentador de placas de pocillos profundos durante 30 minutos. Durante esta incubación se añade cRNAAVE (véase más adelante) al tampón AL según los cálculos de más adelante. Entonces se retira S-Block del calentador de placas de pocillos profundos, y se añaden 250 uL de tampón AL con ARNc a cada pocillo de S-Block y se mezcla en un agitador de placas a 1100 rpm durante 15 s. Entonces se incuba S-Block a 70 °C en el calentador de placas de pocillos profundos durante 15 minutos. Mientras se incuba, se prepara un S-Block de equilibrio añadiendo 900 ul de agua a los mismos pocillos en S-Block de equilibrio que las posiciones que contienen muestra en S-Block de muestra. Entonces se añaden 300 uL de 100 % de etanol a cada muestra. Entonces se cubre S-Block y se mezcla a 1000 rpm durante 15 segundos, con una breve pausa cada 5 segundos (se tiene cuidado para prevenir las salpicaduras durante la mezcla). Entonces se incuba S-Block a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se usa una pipeta multicanal para transferir lisado de S-Block a una placa QIA96 en un S-Block NUEVO. Se etiqueta un mapa de placas con cada posición sobre la placa QIA96. Entonces se centrifuga la placa QIA96 durante 1 min a 3000 rpm. Excepto se indique de otro modo, cada centrifugación se realiza con un S-Block situado debajo de la placa QIA96 para recoger el residuo; después de cada centrifugación, se vuelca S-Block y se seca. Se retiran 150 ul de cada posición en S-Block de equilibrio. Se agita bien el tampón AW2, y se añaden 750 uL de tampón AW2 a los pocillos de la placa QIA 96 y se dispone en S-Block. Entonces se centrifuga la placa QIA 96 durante 1 min a 3000 rpm. Se añaden 750 uL de 100 % de EtOH a cada pocillo en la placa QIA 96, se centrifuga durante 1 min a 3000 rpm y luego se centrifuga durante 3 minutos adicionales. Entonces se pone un Kimwipe (o placa Hyb) debajo de la placa QIA96 y se incuba a 56 °C durante 5 min en el calentador de pocillos profundos para secar más la membrana. Entonces se pone el bloque QIA96 sobre una placa de elución, se añaden 100 uL de tampón AVE directamente a la membrana, luego se añaden 35 uL de fluido Top-E a los pocillos, y se incuba a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se añaden 135 ul de agua a una placa de elución de "equilibrio" y se centrifuga durante 1 min a 3000 rpm. El eluato en el tubo se añade entonces en alícuotas a múltiples placas a 10 ul cada una y se guarda a -20 °C (o 4 °C si se usa el mismo día). Para preparar la solución de cRNAAVE (ARN portador en tampón AVE a 1 ug/uL), se añaden 310 uL de tampón AVE a un tubo que contiene 310 ug de ARNc (proporcionado liofilizado), se mezclan suavemente pero minuciosamente, luego se añade en alícuotas a tubos individuales para almacenamiento a -20 °C. Entonces se prepara tampón AL con ARNc del

siguiente modo: por muestra, se mezclan 300 microlitros de tampón AL con 1,5 microlitros de cRNAAVE. Ejemplo: para 96 muestras, mezclar 28800 microlitros de tampón AL y 144 microlitros de cRNAAVE.

- 5 En este ejemplo y los otros ejemplos descritos en el presente documento, se realizó qPCR esencialmente según el siguiente protocolo. En una sala sin amplicones, se sacan los componentes de la reacción de PCR del liofilizador a -20 °C y se dejan descongelar completamente. Se dejan descongelar completamente a temperatura ambiente muestras, ADN genómico y reactivos. Se prepara una dilución sucesiva de ADN genómico (se agitan las muestras con vórtex durante 10 segundos antes de cada alícuota). Se hace una disposición de placa como se muestra a continuación (STD = patrón; NTC = control negativo sin molde). Los patrones y controles ocupan 16 posiciones, dejando 80 posiciones para las muestras por placa.

.Disposición de placa:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	STD-1	STD-1	S1	S9								
B	STD-2	STD-2	S2	S10								
C	STD-3	STD-3	S3	S11								
D	STD-4	STD-4	S4	S12								
E	STD-5	STD-5	S5	S13								
F	STD-6	STD-6	S6	S14								
G	STD-7	STD-7	S7	S15								
H	NTC	NTC	S8	S16								

- 15 En una sala limpia se prepara una PCR Master Mix. El volumen total es el volumen por el número de reacciones que se necesitan. Usando una pipeta de repetición se añaden 45 µl de Master Mix a cada pocillo como se indica por la disposición de placa. Los patrones se agitan con vórtex durante 10 segundos y se añaden 5 µl a los pocillos diseñados. Se agita con vórtex el ADN aislado de las muestras clínicas durante 10 segundos y se añaden 5 µl a los pocillos diseñados (muestras de PreservCyt). Se añaden 5 µl de agua MBG (calidad para biología molecular) a los pocillos designados de control negativo (NTC).

- 20 Entonces se pasan las muestras a una máquina de qPCR de Strategene. Se programa el ciclado térmico del siguiente modo:

Ciclo 1

- 25 95 °C durante 5 min

Ciclo 2 (45X)

- 30 95 °C durante 15 s

52 °C durante 30 s

72 °C durante 30 s

- 35 Después de la serie, se guardan los resultados. Se aceptan los resultados si cumplen los siguientes criterios de aceptación: la pendiente de la curva patrón está en el intervalo de -2,5 a -3,8; R² para la curva patrón es igual o superior a 0,90; y C_T para los controles negativos en la placa es superior a 40 ciclos.

Ejemplo 4

- 40 **Turbidez de muestras que contienen células bacterianas y humanas.**

Puesto que la dispersión de la luz es una función de tanto el número como el tamaño de materia en partículas reflectante en una muestra, se probó si los métodos de turbidez podrían distinguir bacterias del hisopo original de las células humanas. Con referencia ahora a las **Figuras 19, 20 y 21**, usando el medidor de turbidez de Hach es evidente de los datos de más adelante, donde las bacterias y células humanas se contaron por separado, que el tamaño de las bacterias (aproximadamente un décimo del tamaño de las células epiteliales) no dominan las lecturas de turbidez. Más bien, las lecturas de turbidez de células humanas dominan la parte inferior derecha de la línea que crea un límite. Además, la correlación de la cifra de células bacterianas con la turbidez es inferior a la correlación de la cifra de células humanas con la turbidez. Estos resultados sugieren que el factor dominante en la medición de turbidez es la cifra de células epiteliales.

Ejemplo 5

- 55 **Distribución de turbidez de muestras cervicales.**

La **Figura 22** muestra la distribución de turbidez en muestras de la población de Laurel, MD (descritas adicionalmente en el Ejemplo 4 anterior). La **Figura 23** muestra la fracción de la población de Laurel, MD, que se consideraría inadecuada basándose en su turbidez para una decisión de corte de la adecuación de muestras dada. Por ejemplo, si se seleccionó un corte de 9, entonces se consideraría que 2,5 % de la población estudiada tiene celularidad inadecuada. Obsérvese que el umbral del medidor es justamente suficiente ya que podría detectar toda la población. Para la prueba HC2 de VPH, el corte previsto es entre 2 - 20 UNF. Se analizan poblaciones adicionales por estos métodos para determinar la naturaleza representativa de la muestra y la importancia clínica del valor de corte para determinar si una muestra es adecuada.

10 Ejemplo 6

Distribución de turbidez y celularidad determinada por qPCR para muestras cervicales.

Las **Figuras 24 y 25** muestran la distribución de turbidez y celularidad y el porcentaje de la distribución de la cifra de células convertidas de las muestras analizadas por qPCR de beta-globina y con el medidor de turbidez de Hach, respectivamente. En cada figura, las barras de la izquierda en cada grupo corresponden a muestras que tienen volumen > 4 ml (N:669); las barras centrales en cada grupo corresponden a muestras que tienen volumen entre 2 ml y 4 ml (N:172); y las barras derechas en cada grupo corresponden a muestras que tienen volumen <2 ml (N:240). La **Figura 26** muestra la distribución de turbidez para muestras tomadas según el protocolo SurePath ("SP").

20 Ejemplo 7

Determinación del valor de corte de turbidez para la adecuación de muestras

25 Se determinó que el mínimo de un percentil para la turbidez de muestras clínicas en medio PreservCyt era 7,4 UNT usando un sistema de detección de 8 canales similar a los sistemas descritos en el Ejemplo 3, anteriormente. El intervalo de confianza del 99,7 % fue 2 a 11,6 UNT. Del análisis de turbidez de 800 muestras de PreservCyt, los valores de corte de 2, 7,5, y 11,6 darían como resultado la inadecuación de muestras para 0,125 %, 1 % o 1,75 %, respectivamente, de la población. Se pueden analizar muestras clínicas adicionales como se describe, proporcionándose así la medición de la distribución de turbidez con mayor potencia estadística, y proporcionando una determinación más precisa de la fracción de la población que se excluiría por un corte de turbidez dado.

30 Ejemplo 8

Determinación del umbral de suficiencia para QIAGEN HR HPV DNA Test®.

40 Como se trata anteriormente, una muestra puede ser inadecuada cuando el número de células en una muestra es insuficiente para permitir la detección de un distintivo de infección por VPH (tal como ADN de VPH). El ensayo particular empleado indica la cantidad de muestra requerida para la detección positiva; así, a medida que mejora la sensibilidad del ensayo, la adecuación de muestras requiere cada vez menos muestra. Por consiguiente, se puede establecer un umbral de suficiencia con respecto a un ensayo particular. Además, se espera que las características específicas del paciente y específicas de la muestra (tales como contaminantes y materiales no deseados que contribuyen a la turbidez) y otras fuentes de variabilidad contribuyan a la varianza en el número de células suficiente para la detección. Por consiguiente, se puede expresar un "umbral" de adecuación como una relación probabilística entre cantidades de muestra y la probabilidad de que la muestra sea suficiente para la detección de un positivo verdadero.

50 El siguiente ejemplo describe un método que se puede usar para determinar un umbral de suficiencia para QIAGEN HR HPV DNA Test® (también denominado el ensayo HC2). Se obtienen muestras de células de individuos infectados por VPH. Se determina el contenido de células de las muestras por recuento de células, por cuantificación de ADN genómico y/o por medición de turbidez (todos como se describen en los ejemplos anteriormente). Entonces se prueban individualmente diluciones sucesivas de los números de células conocidos para establecer la concentración de muestra a la que la muestra clínica VPH positiva verdadera da un da resultado negativo falso. Se prueban de este modo muestras independientemente recogidas de múltiples individuos, en números suficientes para establecer una correlación estadísticamente validada entre la concentración de muestra y la probabilidad de detección de una infección por VPH positiva verdadera. Basándose en la correlación entre las mediciones de turbidez y los resultados de las pruebas de VPH, entonces se establecen umbrales de turbidez a los que se obtiene la sensibilidad definida, tales como 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,9 %, 99,95 % o 99,99 % de probabilidad de que una muestra por encima de una turbidez umbral sea adecuada para un infección por VPH positiva verdadera que va a detectarse.

60 Ejemplo 9

Métodos de uso de adecuación de muestras determinada para ahorrar reactivos o proporcionar garantía de muestras.

65

Los métodos y las máquinas descritos en el presente documento se pueden usar para determinar si una muestra contiene material celular suficiente u otro material como para ser considerada adecuada para dar sensibilidad por encima de un umbral determinado para una prueba dada. Como se observa anteriormente, para algunas pruebas, se puede obtener un resultado positivo y ser significativo aún cuando una muestra sea inadecuada para proporcionar la confianza en un resultado negativo. Si no se prueba una muestra inadecuada, se pueden ahorrar reactivos, posiblemente reducir costes. Se puede tomar por adelantado una decisión por defecto de que solo se probarán muestras por encima de cierto nivel umbral de adecuación. Alternativamente o además de un criterio prefijado por defecto, se puede mostrar un indicador a un responsable al que entonces se le daría la opción de determinar si se debe probar una muestra inadecuada (posiblemente ignorando el valor por defecto).

Además, se puede proporcionar un indicador de adecuación de muestras junto con los resultados de la prueba. La adecuación de muestras se puede indicar como dos o más valores discretos (por ejemplo, "sí", "límite" o "no"). Por ejemplo, la adecuación de muestras se pueden dar como una medida de fiabilidad que refleja la probabilidad estadística de que se hubiera detectado un resultado positivo dado el determinado nivel de adecuación de muestras.

Además, se puede informar la adecuación de muestras (por ejemplo, como valores individuales o en forma resumida o total) a los individuos responsables de recoger las muestras u otras personas implicadas que incluyen supervisores, directores, instructores, etc. La información de adecuación de muestras puede posiblemente proporcionar indicaciones a estos individuos que puede revelar una necesidad de acción correctiva apropiada.

REIVINDICACIONES

1. Un sistema de medición de la adecuación de muestras:

- 5 una unidad de tubos de muestra (1100) que comprende un marco (1102) que se extiende horizontalmente a lo largo de un eje longitudinal y una pluralidad de tubos de muestra (150, 1104) conectados al marco y dispuestos en una línea a lo largo del eje longitudinal, extendiéndose cada tubo de muestra hacia abajo en una dirección vertical desde el marco;
- 10 una carcasa (120, 420, 520) que tiene un receptáculo formado en su interior, extendiéndose el receptáculo en la dirección vertical y estando dimensionado para recibir selectivamente la pluralidad de tubos de muestra en su interior;
- una pluralidad de estaciones de medición de la adecuación de muestras asociadas a la carcasa, comprendiendo cada estación de medición de la adecuación de muestras:
- 15 una fuente de luz (102, 202) adaptada para generar selectivamente un haz de iluminación dirigido hacia arriba en la dirección vertical a través del receptáculo y en un tubo respectivo de los tubos de muestra;
- un detector de muestras (108, 208, 408, 508) situado a lo largo de una extensión vertical del tubo respectivo de los tubos de muestra y adaptado para recibir un haz emitido que comprende al menos una porción del haz de iluminación dispersado por la turbidez en el tubo respectivo de los tubos de muestra, en donde el detector de muestras se sitúa en el extremo de un canal de haz emitido, y en donde el canal de haz emitido (106, 214, 414, 514) se extiende en un plano que es perpendicular a la dirección vertical y está orientado en un ángulo oblicuo con respecto al eje longitudinal del marco;
- 20 un canal de haz de referencia (111, 216, 416, 516) situado debajo del tubo respectivo de los tubos de muestra y que se extiende un ángulo desde el haz de iluminación y que no pasa a través del tubo respectivo de los tubos de muestra, en donde el canal de haz de referencia está orientado un ángulo oblicuo con respecto al eje longitudinal del marco; y
- 25 un detector de referencia (110, 210, 410, 510) situado en el extremo del canal de haz de referencia para recibir un haz de referencia que pasa a través del canal de haz de referencia.
- 30 2. El sistema de medición de la adecuación de muestras de la reivindicación 1, en donde el receptáculo comprende una pluralidad de receptáculos para recipientes, estando cada receptáculo para recipientes adaptado para recibir uno de la pluralidad de los tubos de muestra en su interior.
- 35 3. El sistema de medición de la adecuación de muestras de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la pluralidad de estaciones de medición de la adecuación de muestras están dispuestas con sus detectores de muestras respectivos en un único lado de la pluralidad de tubos de muestra.
4. El sistema de medición de la adecuación de muestras de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde los haces emitidos de la pluralidad de estaciones de medición de la adecuación de muestras pasan cada uno a través de una superficie protegida de un tubo de muestra respectivo.
- 40 5. El sistema de medición de la adecuación de muestras de la reivindicación 4, en donde la superficie protegida comprende una porción de una pared lateral del tubo de muestra que se sitúa al menos parcialmente entre dos tubos de muestra adyacentes.
- 45 6. El sistema de medición de la adecuación de muestras de la reivindicación 4 o 5, que comprende además al menos una estación de medición de la adecuación de muestras adicional que tiene un haz emitido respectivo que no pasa a través de una superficie protegida de un tubo de muestra respectivo.
- 50 7. El sistema de medición de la adecuación de muestras de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el haz de iluminación de cada estación de medición de la adecuación de muestras pasa perpendicularmente a través de un extremo inferior del tubo respectivo de los tubos de muestra.
8. El sistema de medición de la adecuación de muestras de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el haz de iluminación de cada estación de medición de la adecuación de muestras pasa a través de un fondo redondeado del tubo respectivo de los tubos de muestra.
- 55 9. El sistema de medición de la adecuación de muestras de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el haz emitido de cada estación de medición de la adecuación de muestras pasa generalmente perpendicularmente a través de una pared lateral del tubo respectivo de los tubos de muestra.
- 60 10. El sistema de medición de la adecuación de muestras de la reivindicación 1 o 2, en donde la pluralidad de estaciones de medición de la adecuación de muestras comprende:
- 65 un primer conjunto de estaciones de medición de la adecuación de muestras dispuestas con sus detectores de muestras respectivos en un primer lado de la pluralidad de tubos de muestra, y

un segundo conjunto de estaciones de medición de la adecuación de muestras dispuestas con sus detectores de muestras respectivos en un segundo lado de la pluralidad de tubos de muestra.

- 5 11. El sistema de medición de la adecuación de muestras de la reivindicación 10, en donde:
- la carcasa se extiende a lo largo del eje longitudinal desde un primer extremo hasta un segundo extremo; el primer conjunto de estaciones de medición de la adecuación de muestras están dispuestas en una primera serie que se extiende desde el primer extremo hacia el segundo extremo, estando cada ángulo oblicuo respectivo de su canal de haz emitido inclinado hacia el segundo extremo; y
- 10 el segundo conjunto de estaciones de medición de la adecuación de muestras están dispuestas en una segunda serie que se extiende desde el segundo extremo hacia el primer extremo, estando cada ángulo oblicuo respectivo de su canal de haz emitido inclinado hacia el primer extremo.
- 15 12. El sistema de medición de la adecuación de muestras de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la pluralidad de tubos de muestra tienen cada uno un perfil en sección transversal generalmente circular en un plano perpendicular horizontal a la dirección vertical.
- 20 13. El sistema de medición de la adecuación de muestras de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el ángulo oblicuo del canal de haz emitido es igual al ángulo oblicuo del canal de haz de referencia.
14. El sistema de medición de la adecuación de muestras de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la fuente de luz de cada estación de medición de la adecuación de muestras comprende un diodo emisor de luz.
- 25 15. El sistema de medición de la adecuación de muestras de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde cada estación de medición de la adecuación de muestras comprende además un canal de haz de entrada (209) situado encima de la fuente de luz respectiva a través de la que pasa el haz de iluminación respectivo, y el canal de haz de referencia respectivo corta el canal de haz de entrada en un ángulo recto.

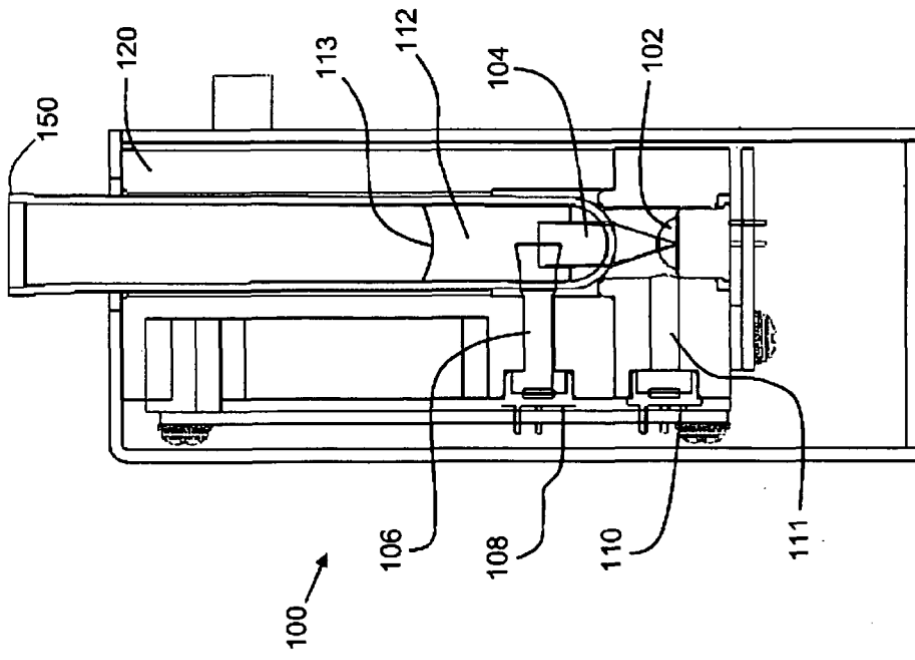


Fig. 1

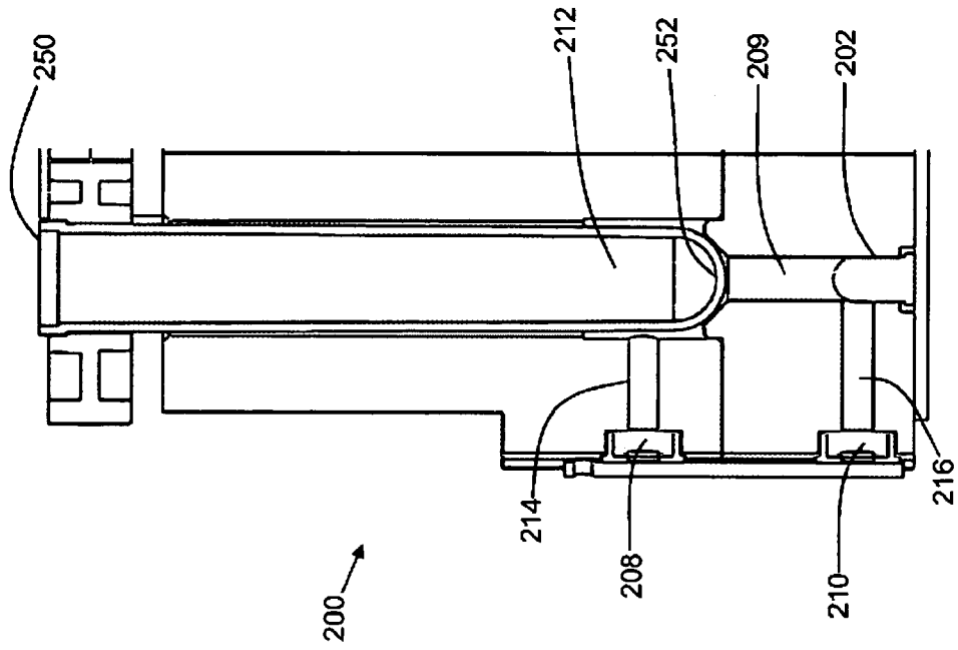


Fig. 2

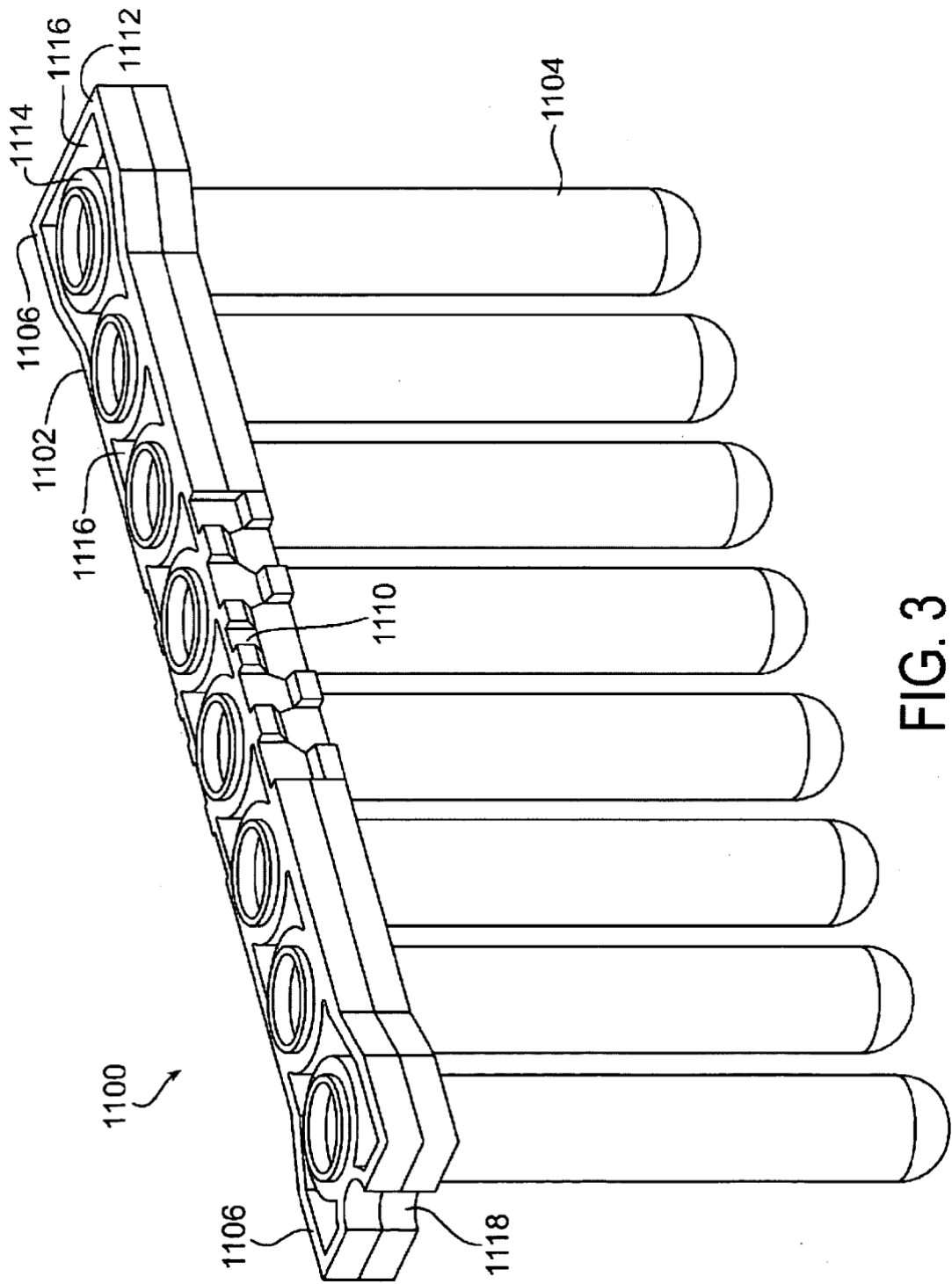


FIG. 3

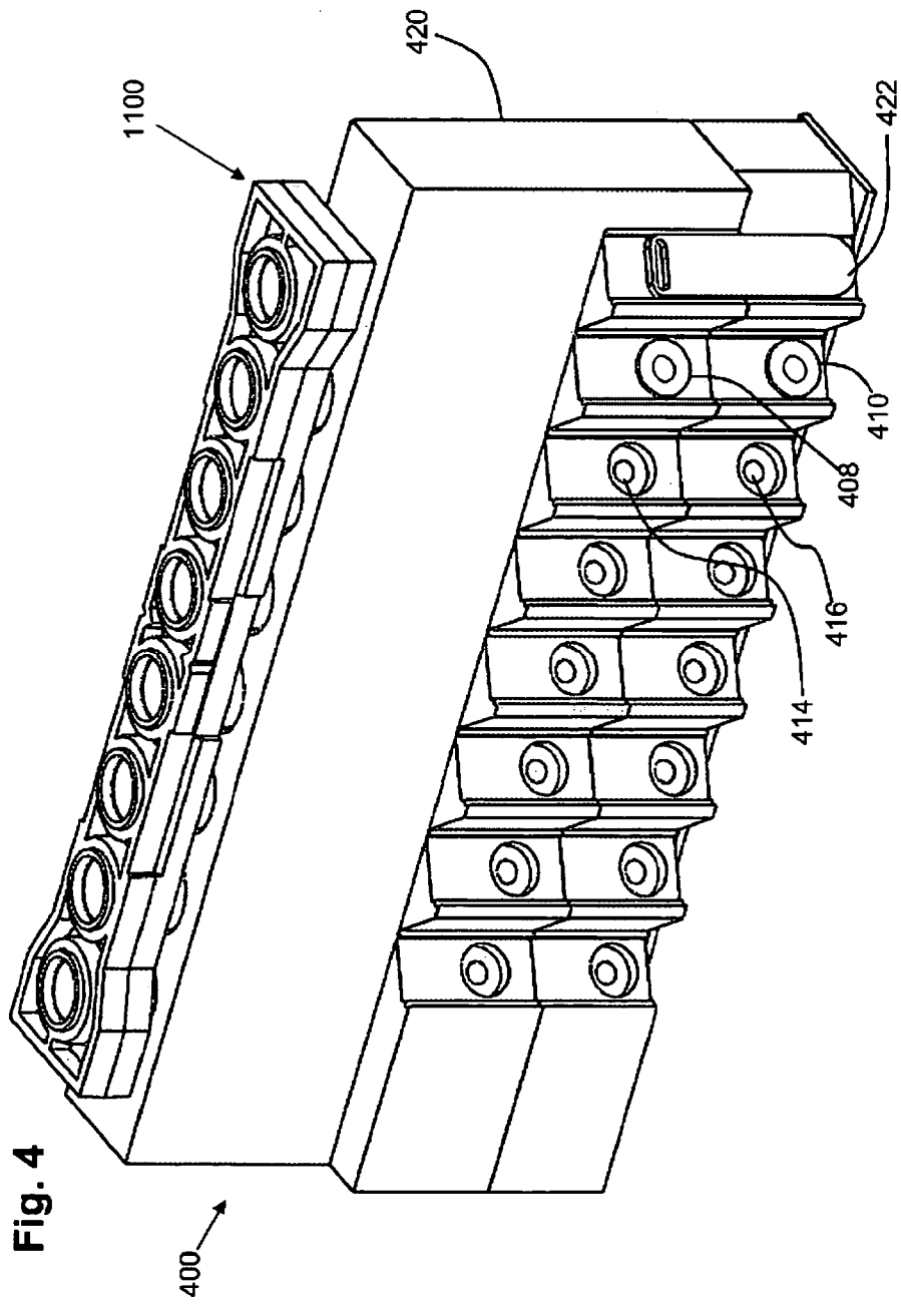
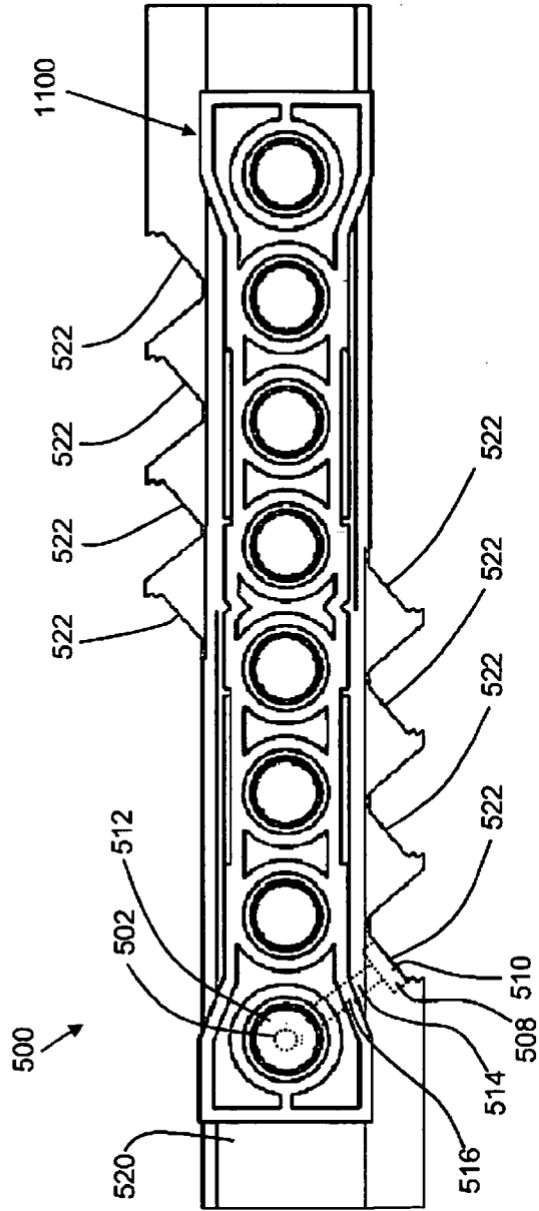


Fig. 4

Fig. 5



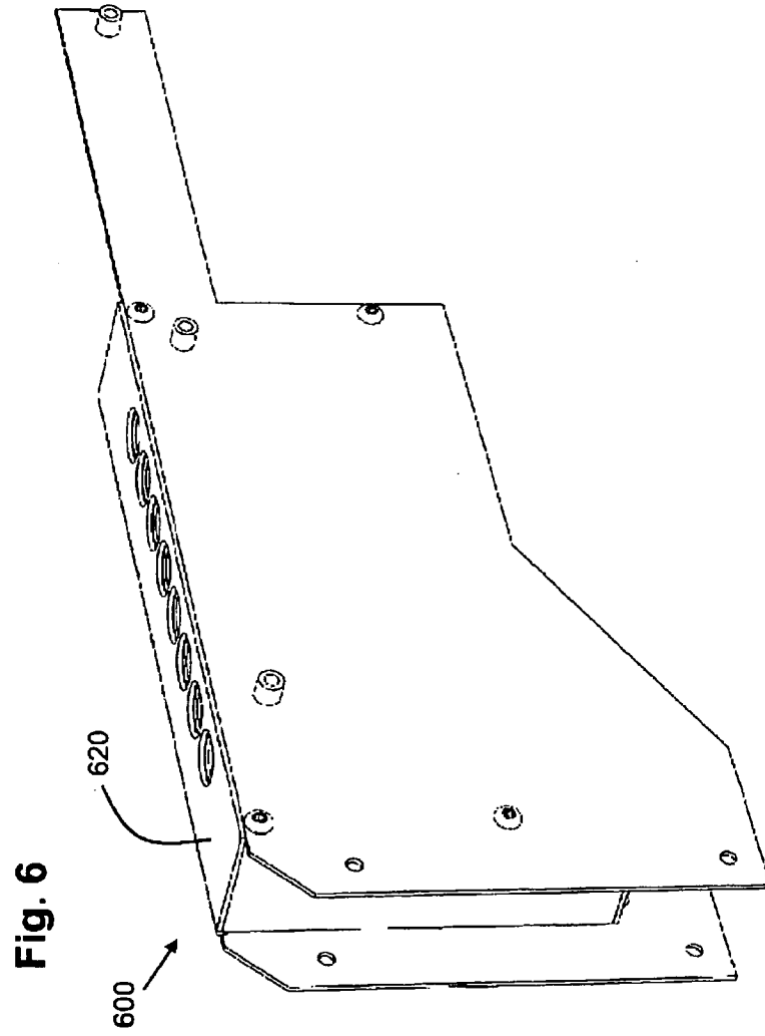


Fig. 7 Comparación entre los niveles celulares por qPCR y los valores de turbidez (vol: >4 ml: N=669)
y (vol: >2 ml, < 4 ml: N=23)

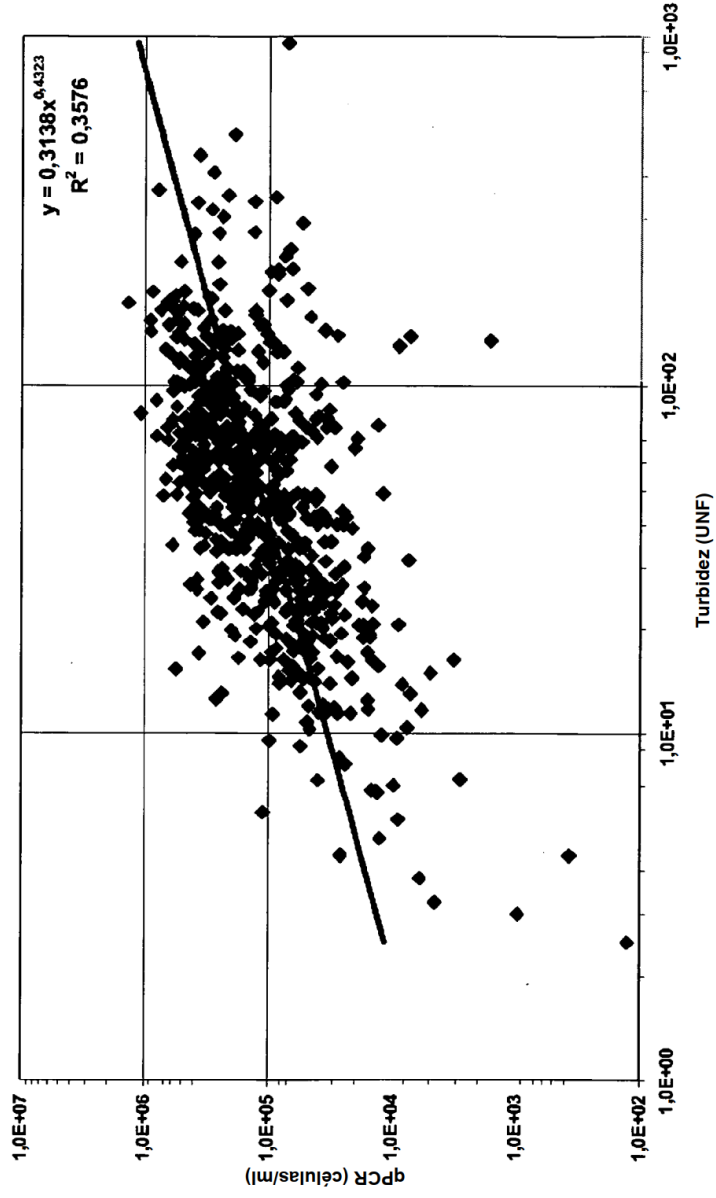


Fig. 8 Comparación: Niveles celulares por qPCR y valores de turbidez (<40 UNT):
Muestra de PC (vol: >4 ml: N=247) y (vol: >2 ml, < 4 ml: N=155)

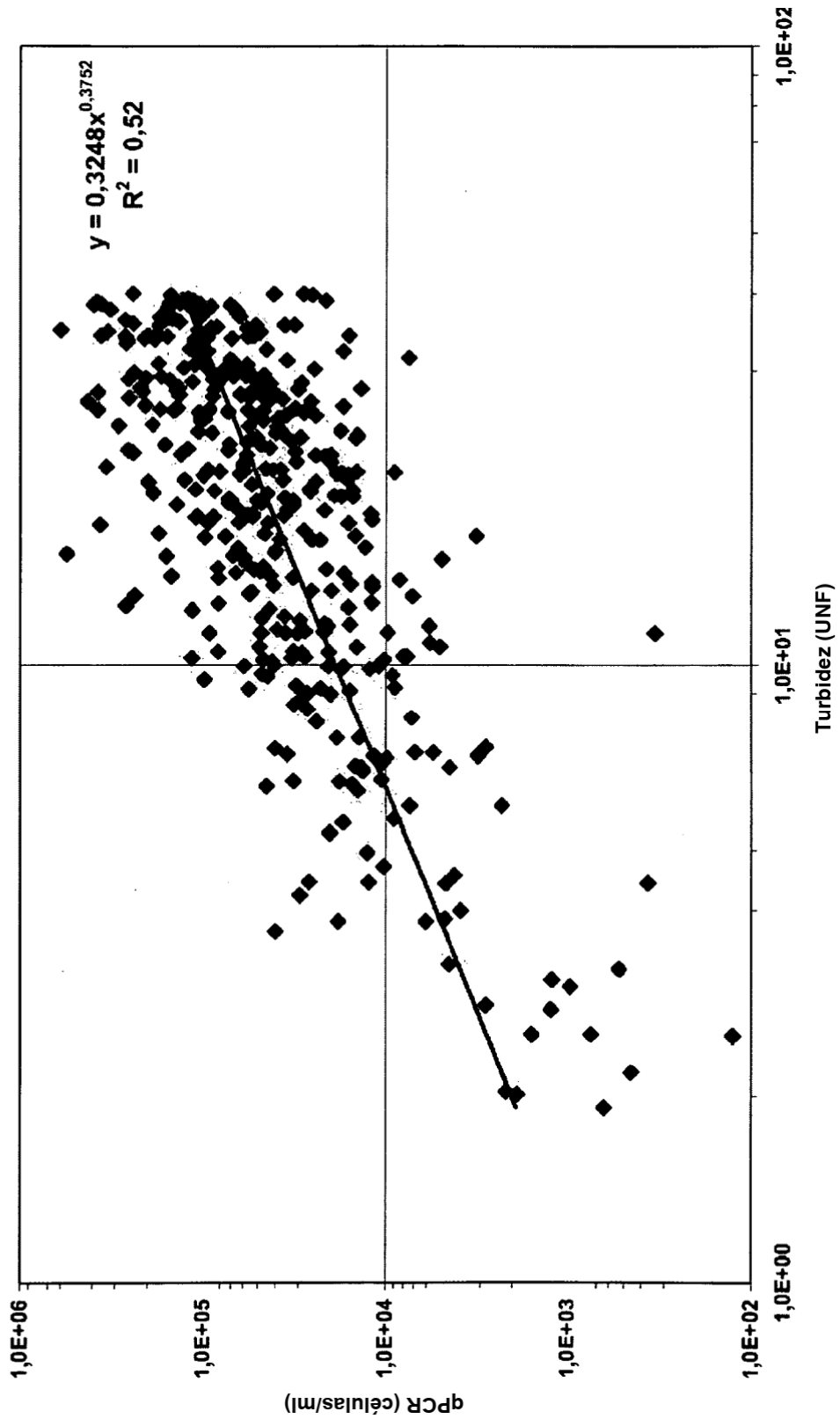


Fig. 9 Comparación del recuento óptico de células con qPCR: N=99

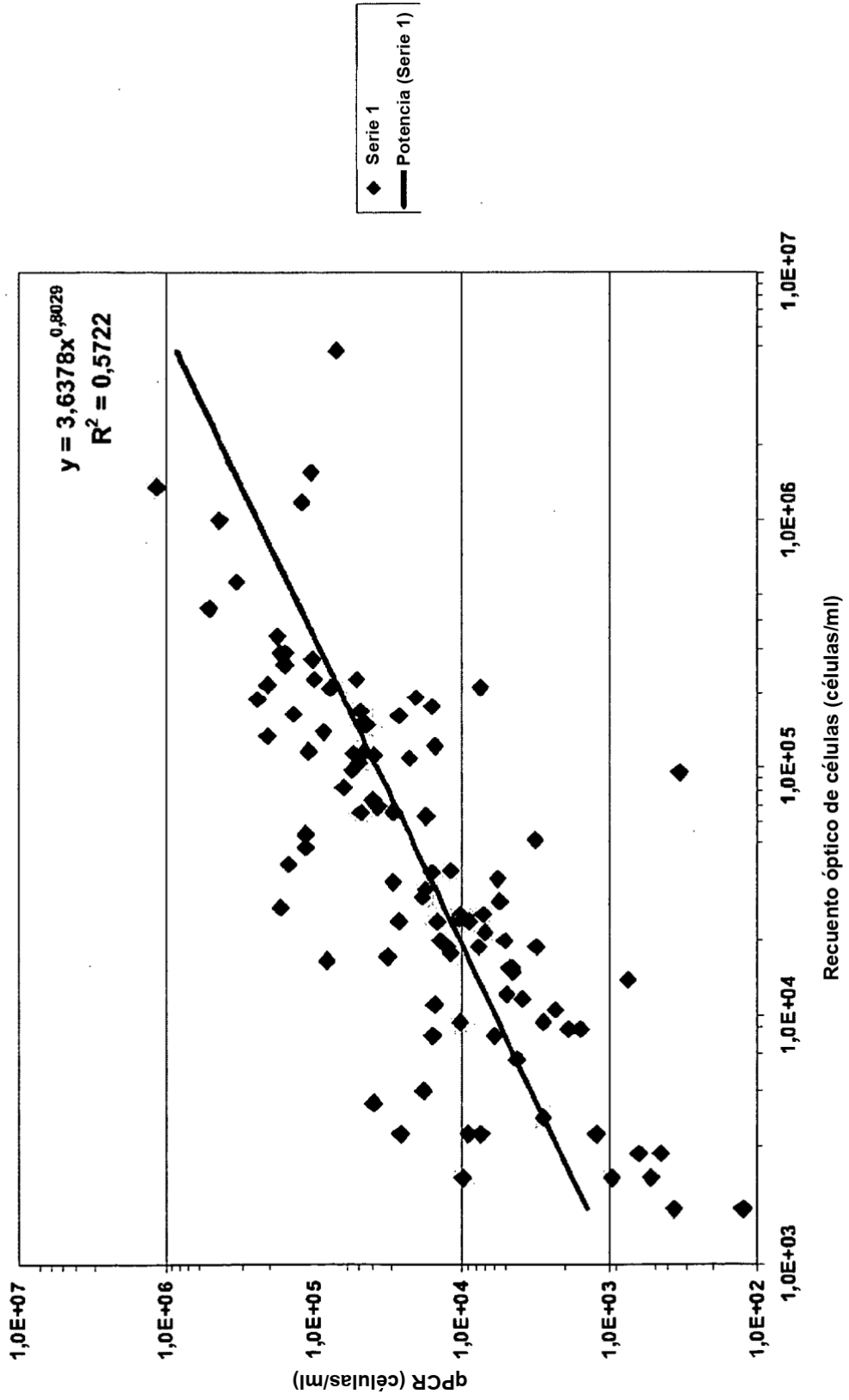
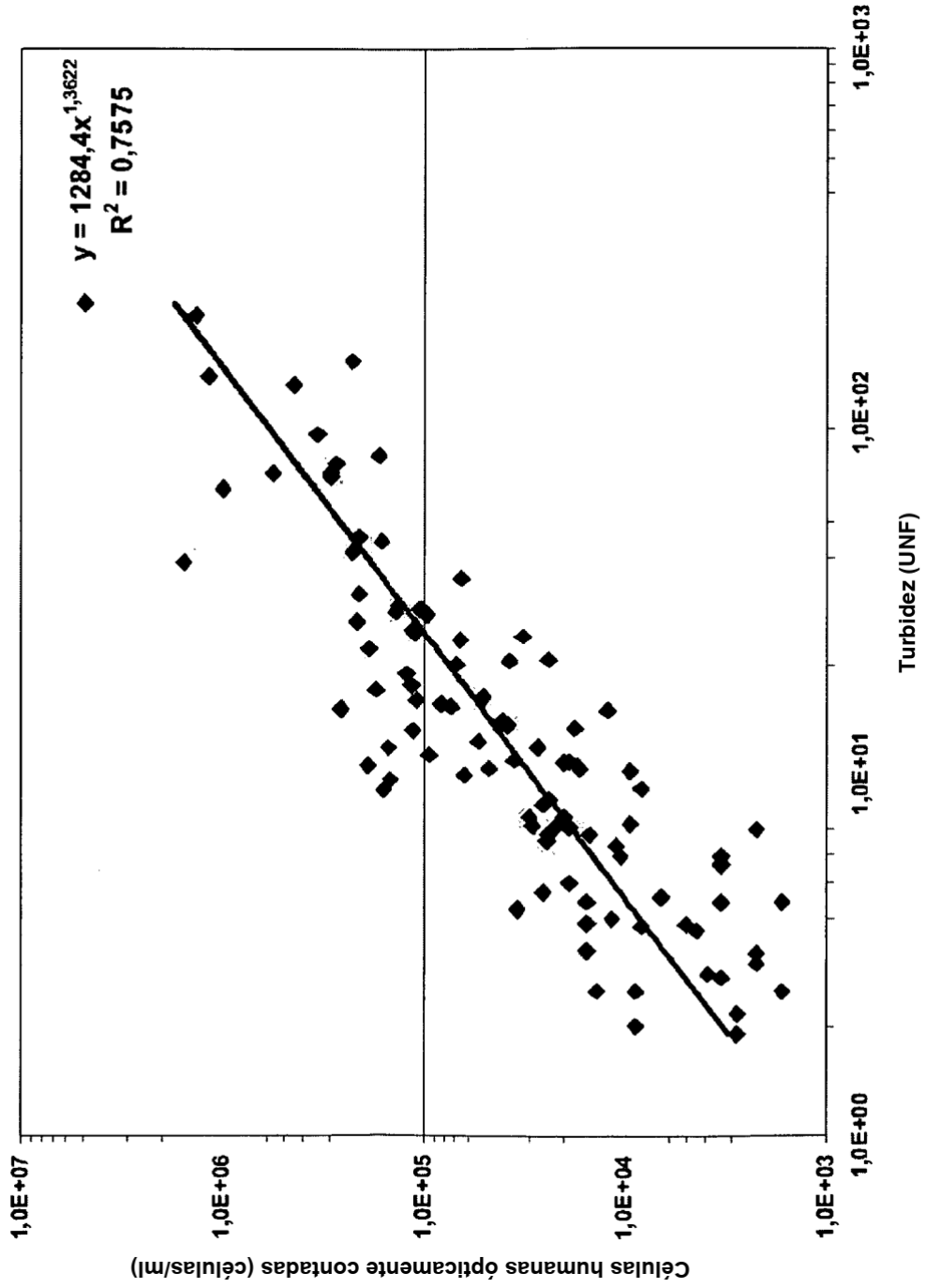


Fig. 10 Comparación de células ópticamente contadas con valores de turbidez: N=99



Comparación de qPCR con turbidez: N=99

Fig. 11

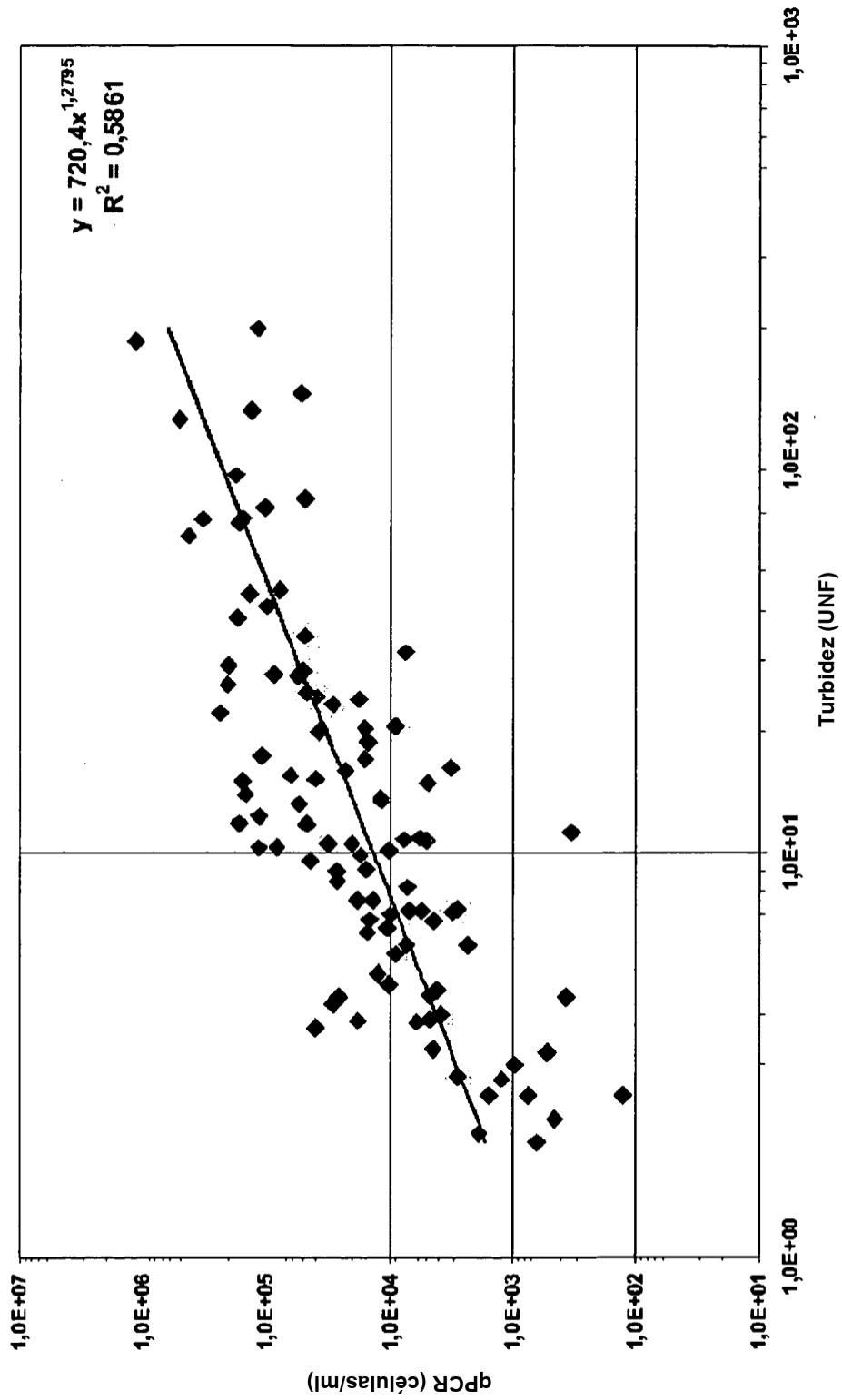


Fig. 12 Comparación de la turbidez con la cifra de células humanas en series de dilución de mezclas clínicas positivas: N=28

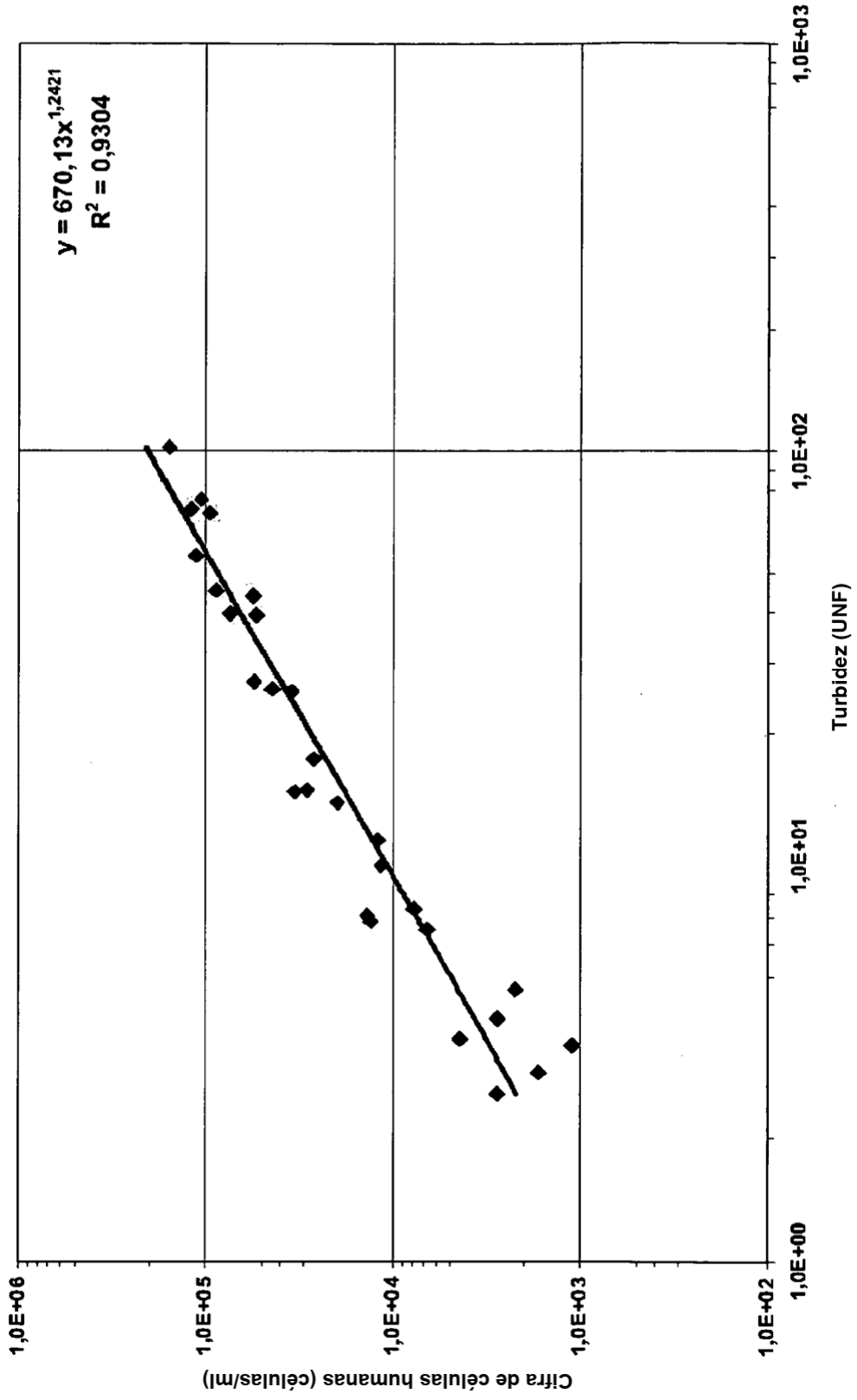


Fig. 13 Comparación de qPCR con la cifra de células humanas en series de dilución de mezclas clínicas positivas: N=28

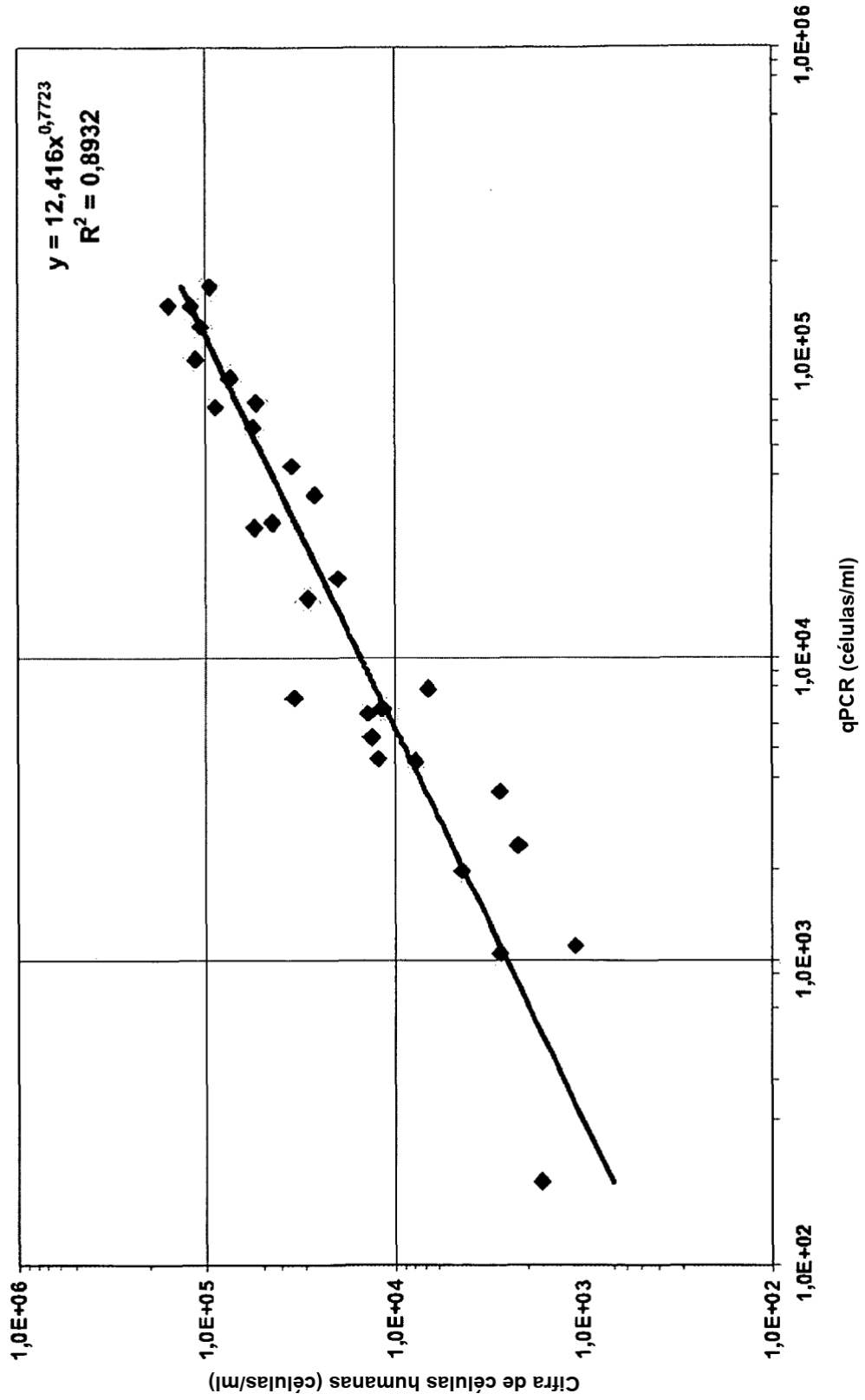
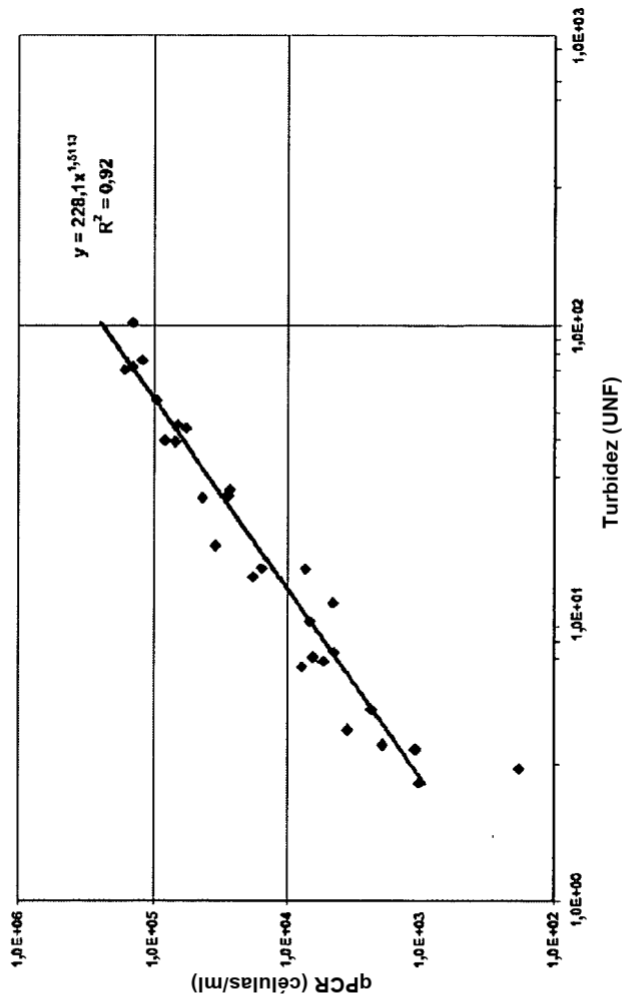


Fig. 14

Comparación de la turbidez con qPCR (células/ml) en estudios de dilución de mezclas clínicas positivas:



Serie	HC2.0 RLU/CO	NGA RLU/CO	Turbidez	qPCR (células/ ml)	Cifra de células humanas
	1539,0	1443,1	55,1	96455	112778
	183,9	240,5	7,1	6481	13889
	18,4	20,5	1,7	384	3333
SERIE 1	9,2	16,3	1,9	293	3689
	4,6	6,4	1,6	70	1111
	2,3	1,8	2,9	185	1667
	1,2	4,9	1,2	21	0
	0,6	0,6	1,5	12	0
	0,3	0,6	1,5	0	3333
	40,3	6,9	76,2	122303	106111
	20,2	6,9	44,0	57091	56111
	10,1	1,2	26,8	27897	44444
SERIE 2	5,0	1,7	14,3	7330	30889
	2,5	0,8	10,9	4579	12222
	1,3	0,5	3,5	1968	4444
	0,6	0,5	2,6	1049	2778
	0,3	0,3	1,9	453	0
	21,4	2,3	102,3	143818	156667
	10,7	11,1	45,3	66485	87778
SERIE 3	5,4	0,9	26,8	26727	55000
	2,7	1,0	14,4	16636	28889
	1,3	0,9	7,4	4501	7778
	0,7	0,5	4,7	2376	2222
	0,3	0,3	3,4	1108	1111
	12,7	1,4	70,1	166000	94444
	6,4	2,0	39,5	88788	53889
SERIE 4	3,2	1,5	17,3	34242	26667
	1,6	0,7	9,4	6755	11667
	0,8	0,5	6,8	5399	13333
	0,4	0,4	4,0	3577	2778
	5,8	2,8	71,9	143152	120000
	2,9	2,9	39,8	62667	73889
SERIE 5	1,5	0,6	25,4	42848	35000
	0,7	0,6	13,5	18121	20000
	0,4	0,4	6,5	7873	6667

Fig. 15 Comparación de la turbidez con qPCR (células/ml): N=1076

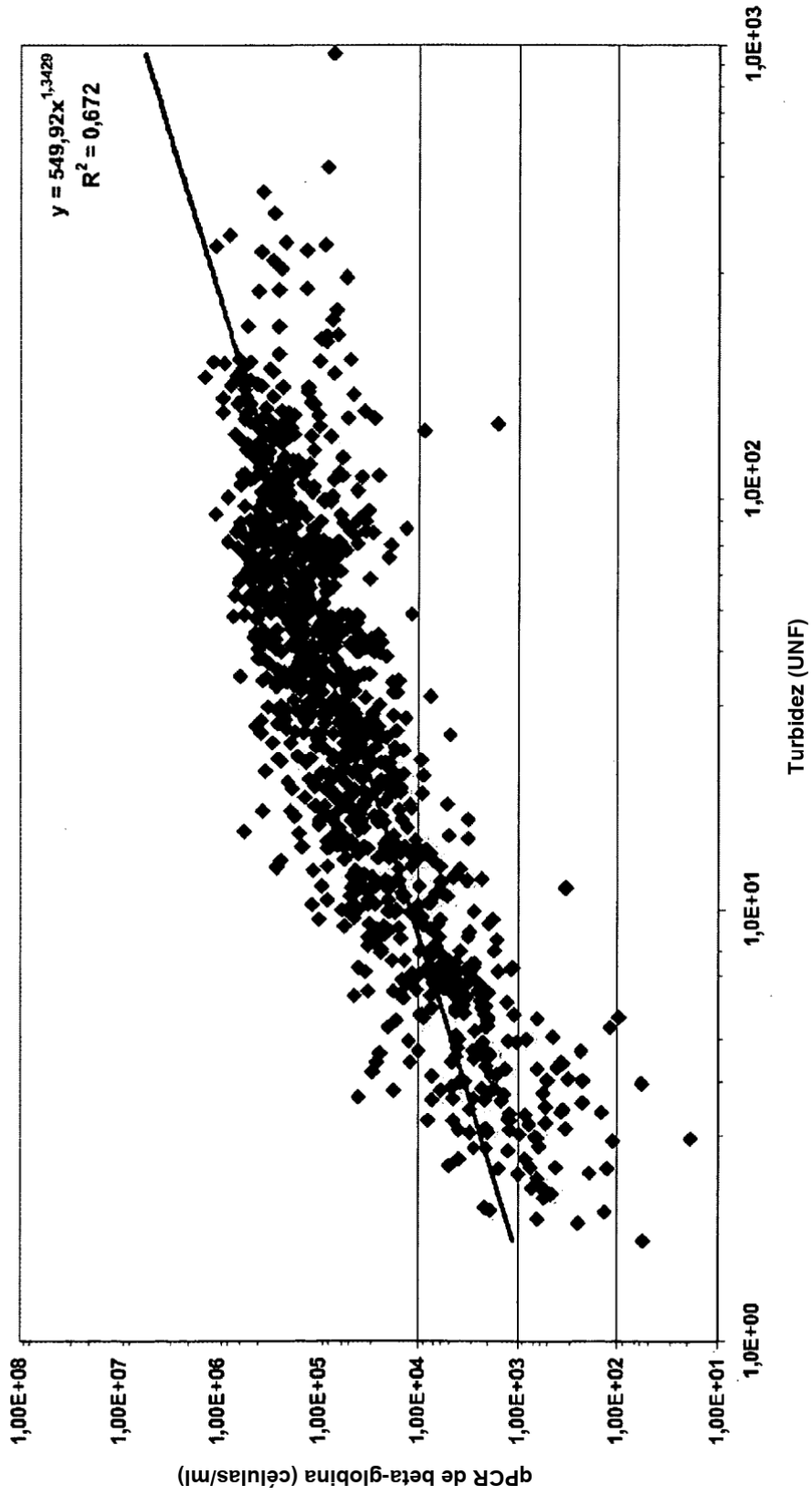


Fig. 16 Comparación de células PC_NOR con vol (> 4 ml) frente a qPCR de beta-globina (N=669)

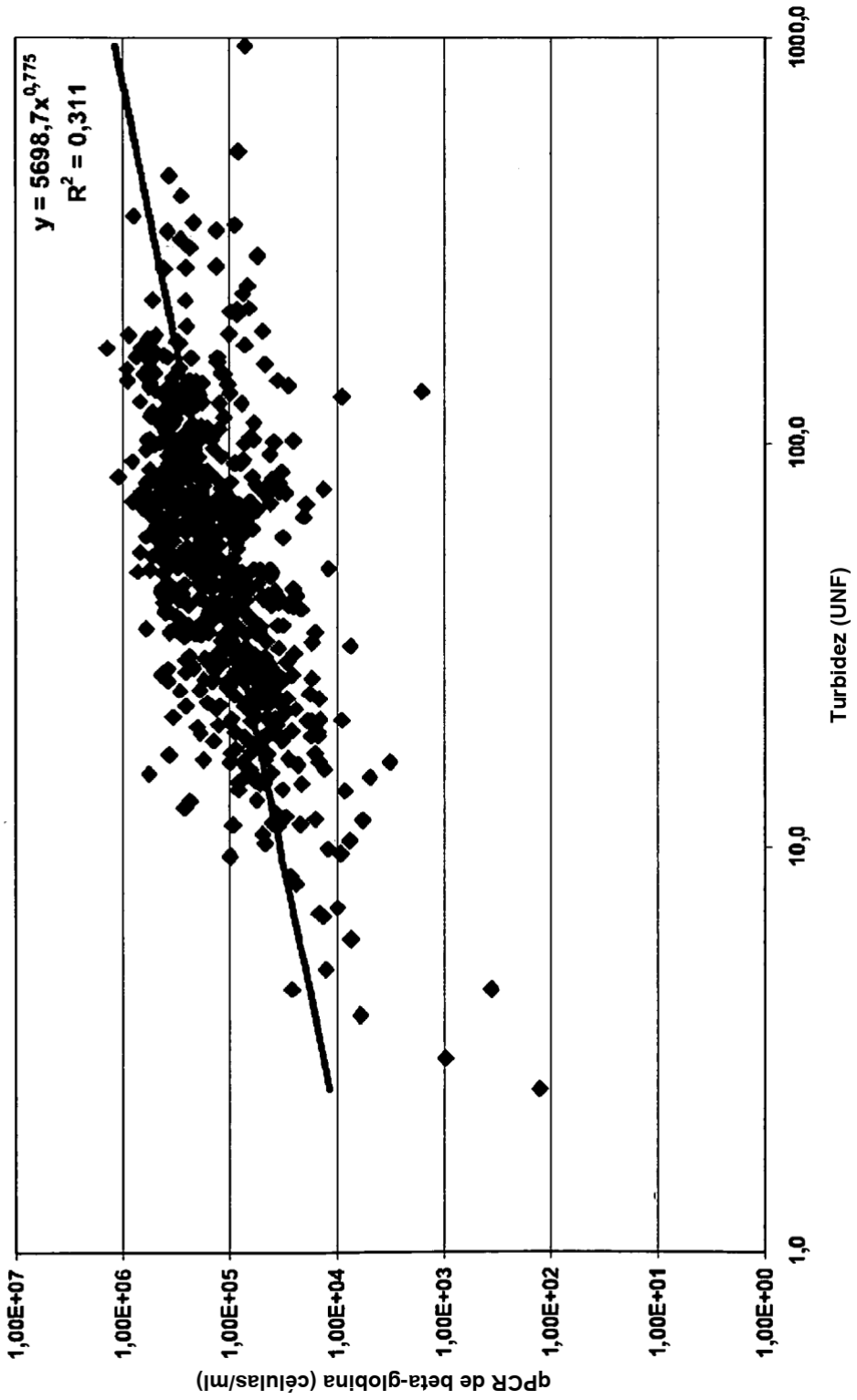


Fig. 17 Comparación de PC_QNS (vol > 2 ml <4 ml) frente a la turbidez (N=172)

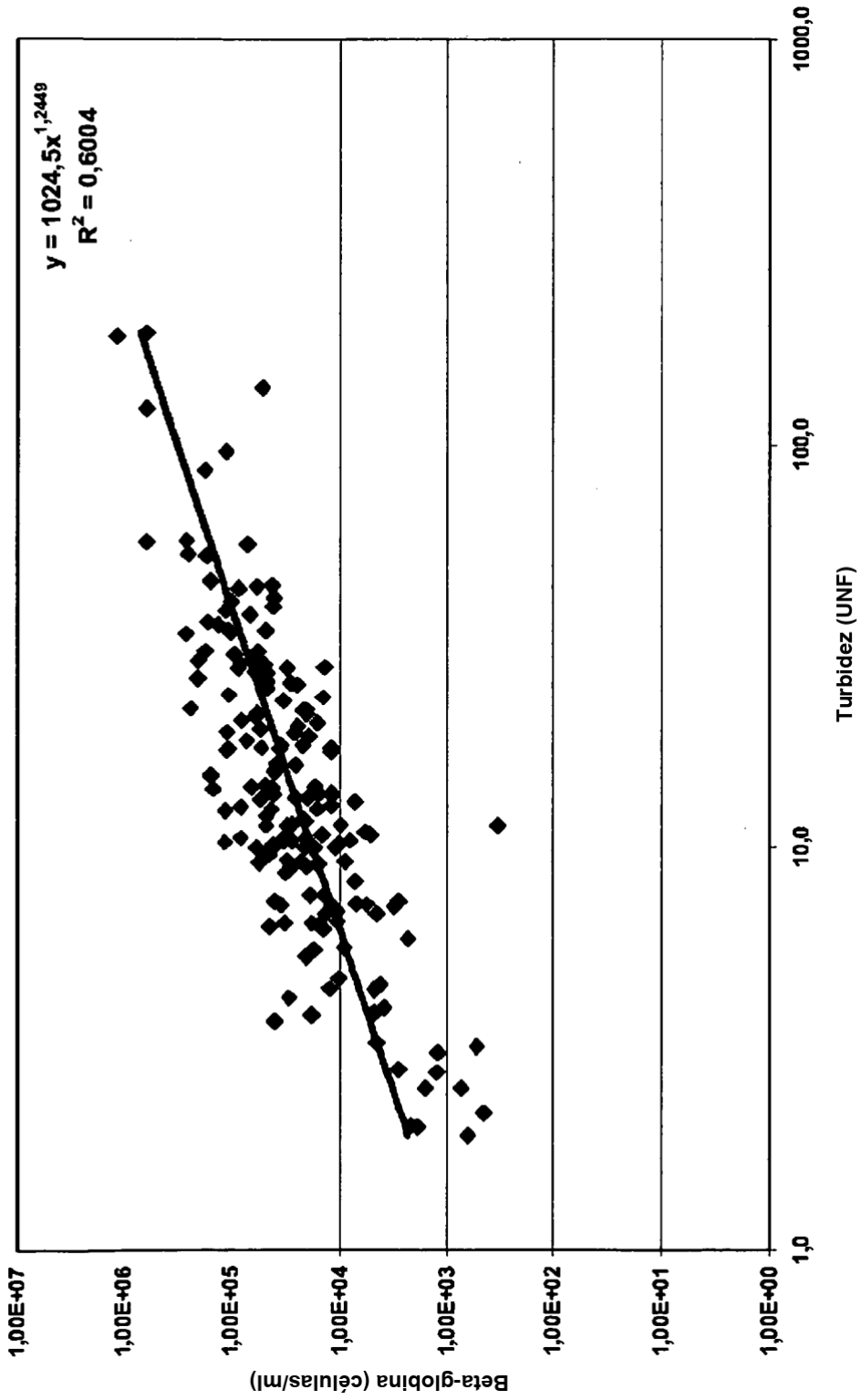


Fig. 18 Comparación de muestras de PC_QNS (vol > 0 ml <2 ml) frente a la turbidez (N=235)

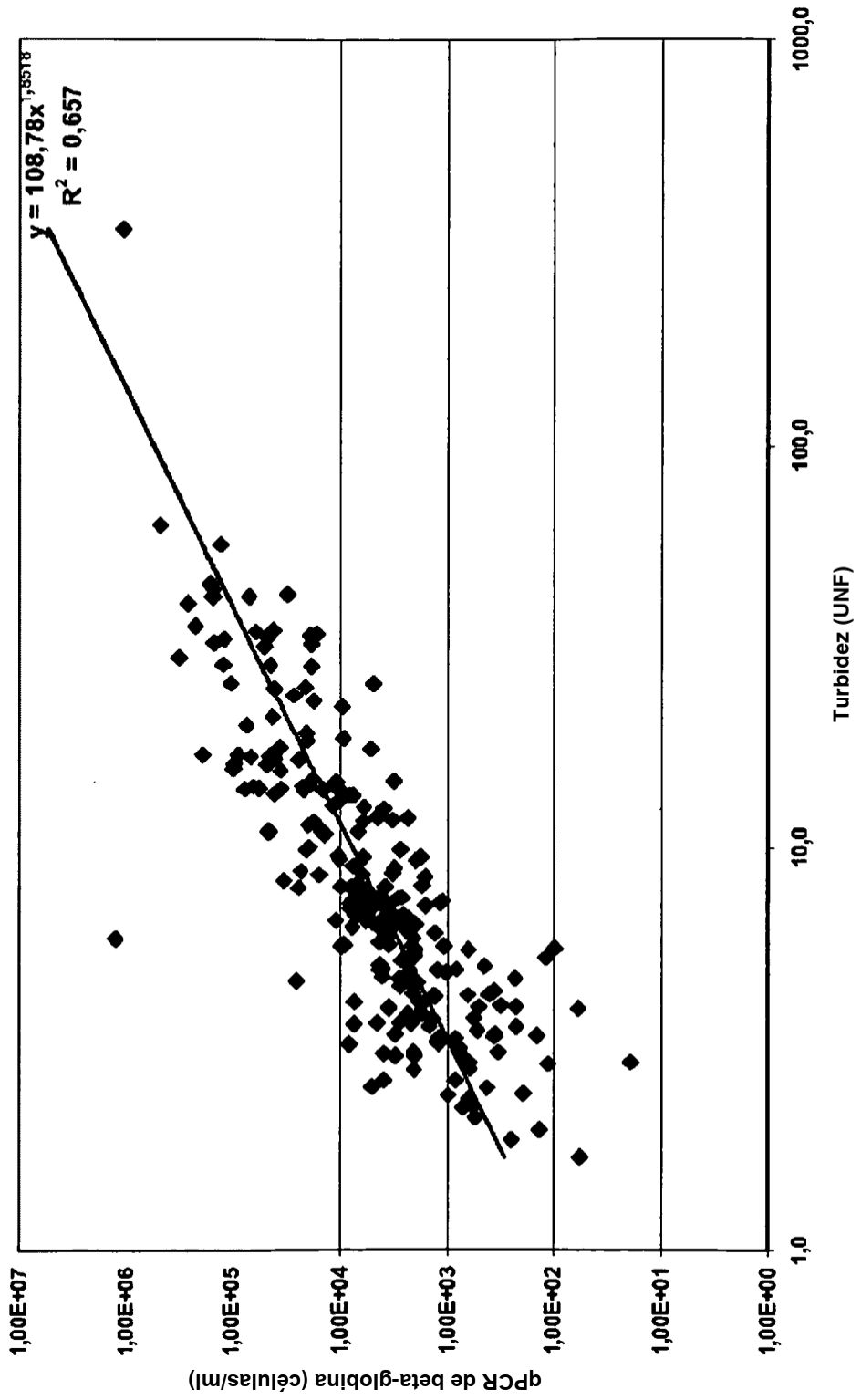


Fig. 19 Comparación de la cifra de células bacterianas con la turbidez (N=63)

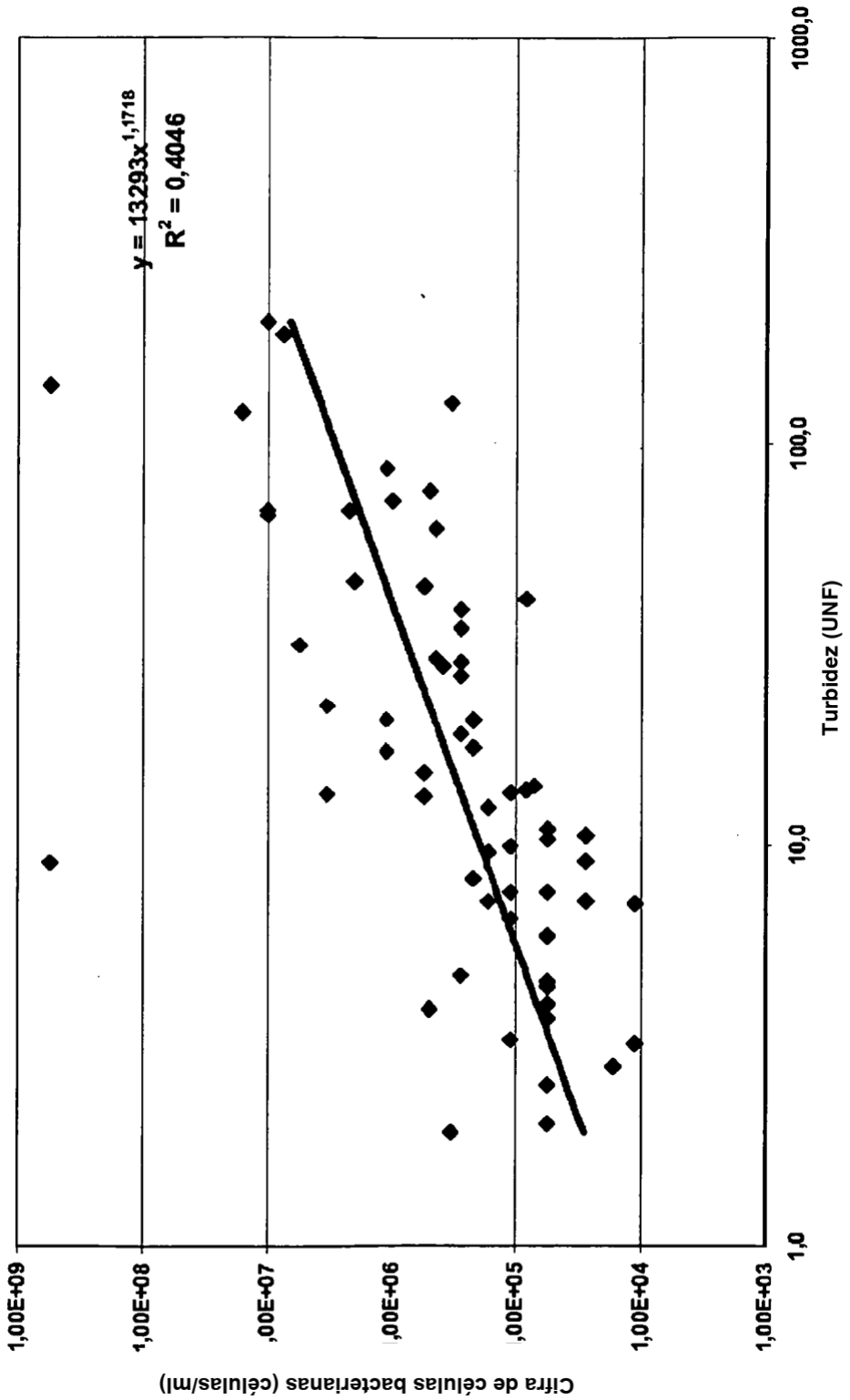


Fig. 20 Comparación de la cifra de células humanas con la turbidez (N=63)

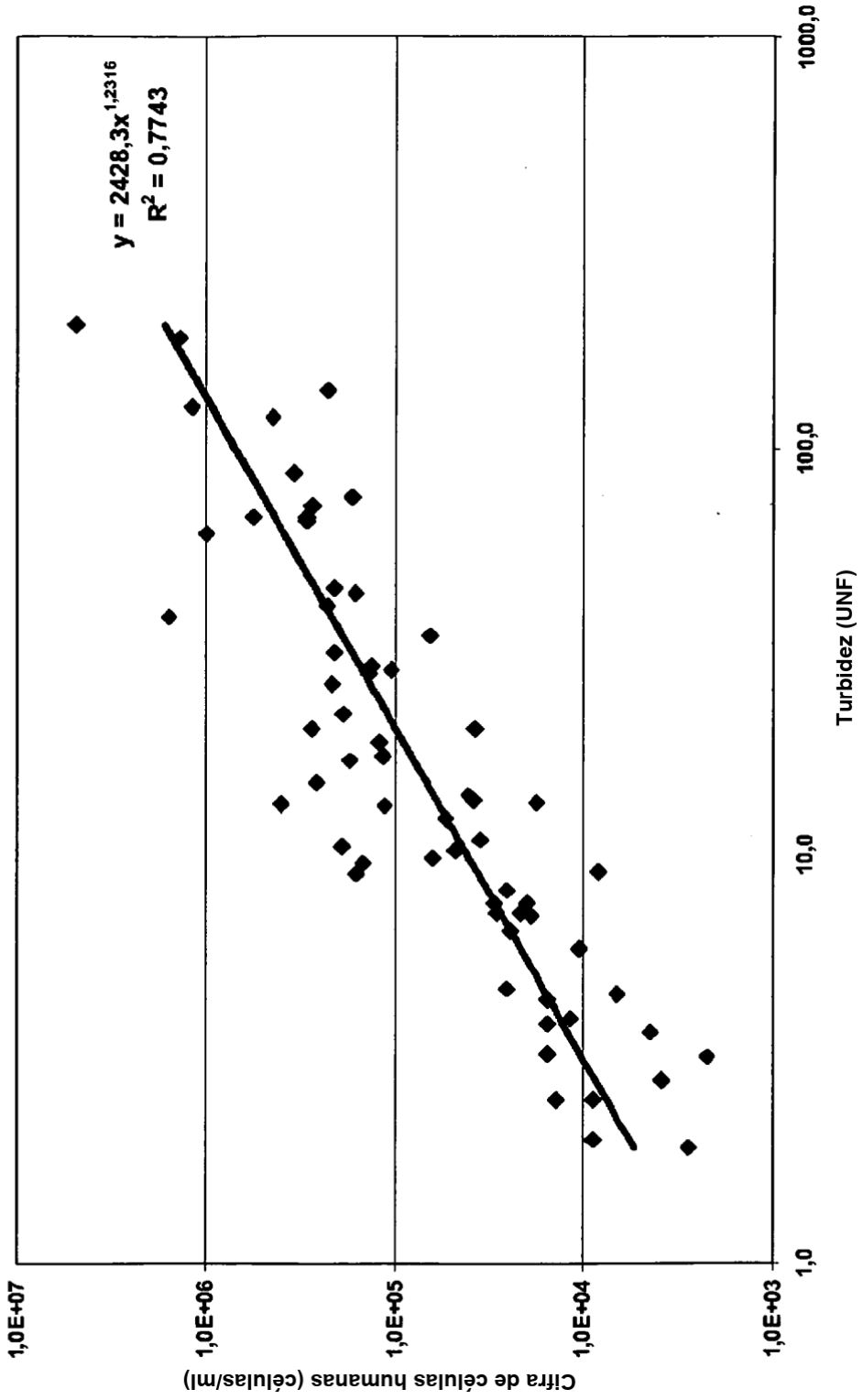


Fig. 21 Comparación de la cifra de células totales (humanas y bacterianas) con la turbidez (N=63)

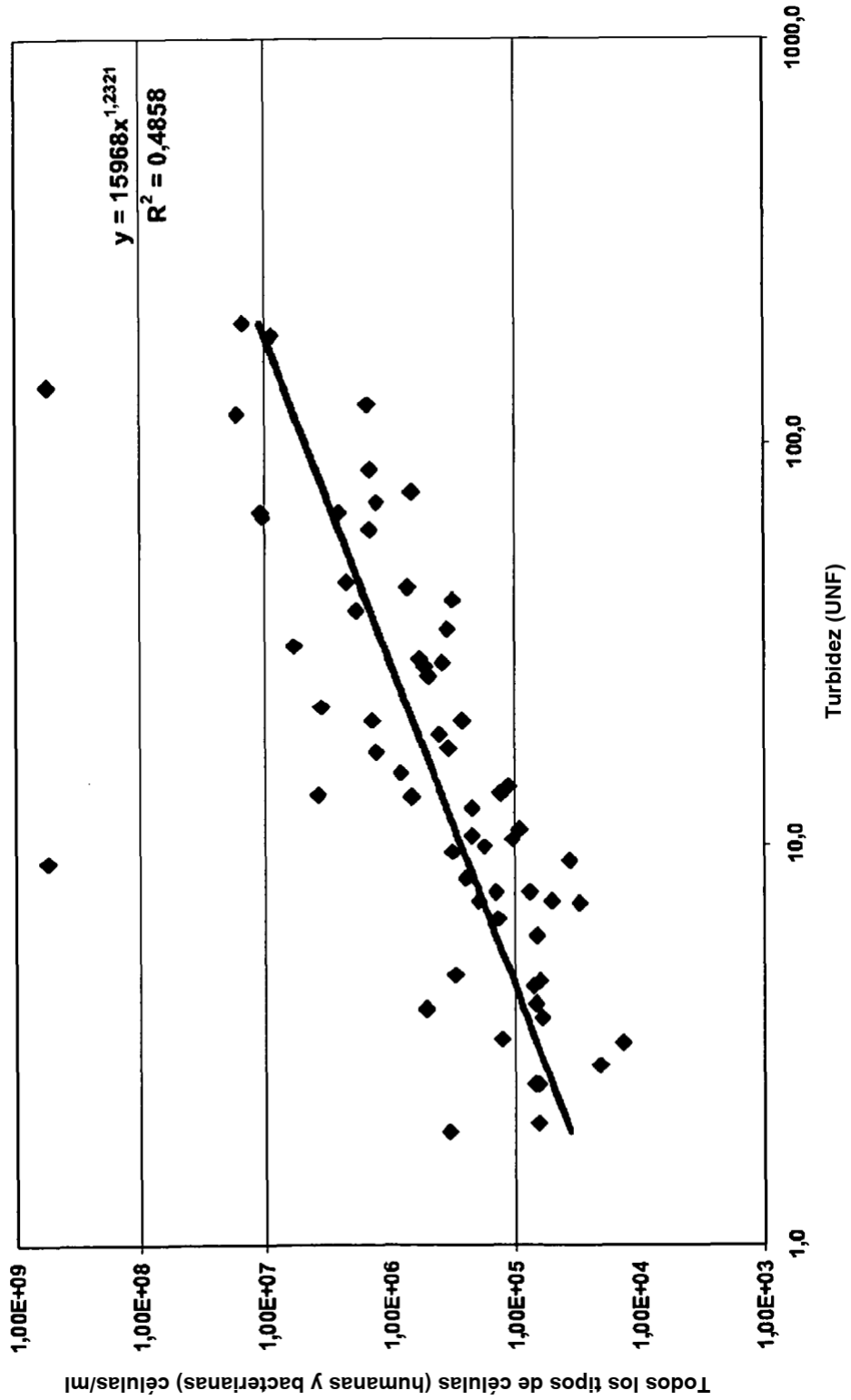


Fig. 22

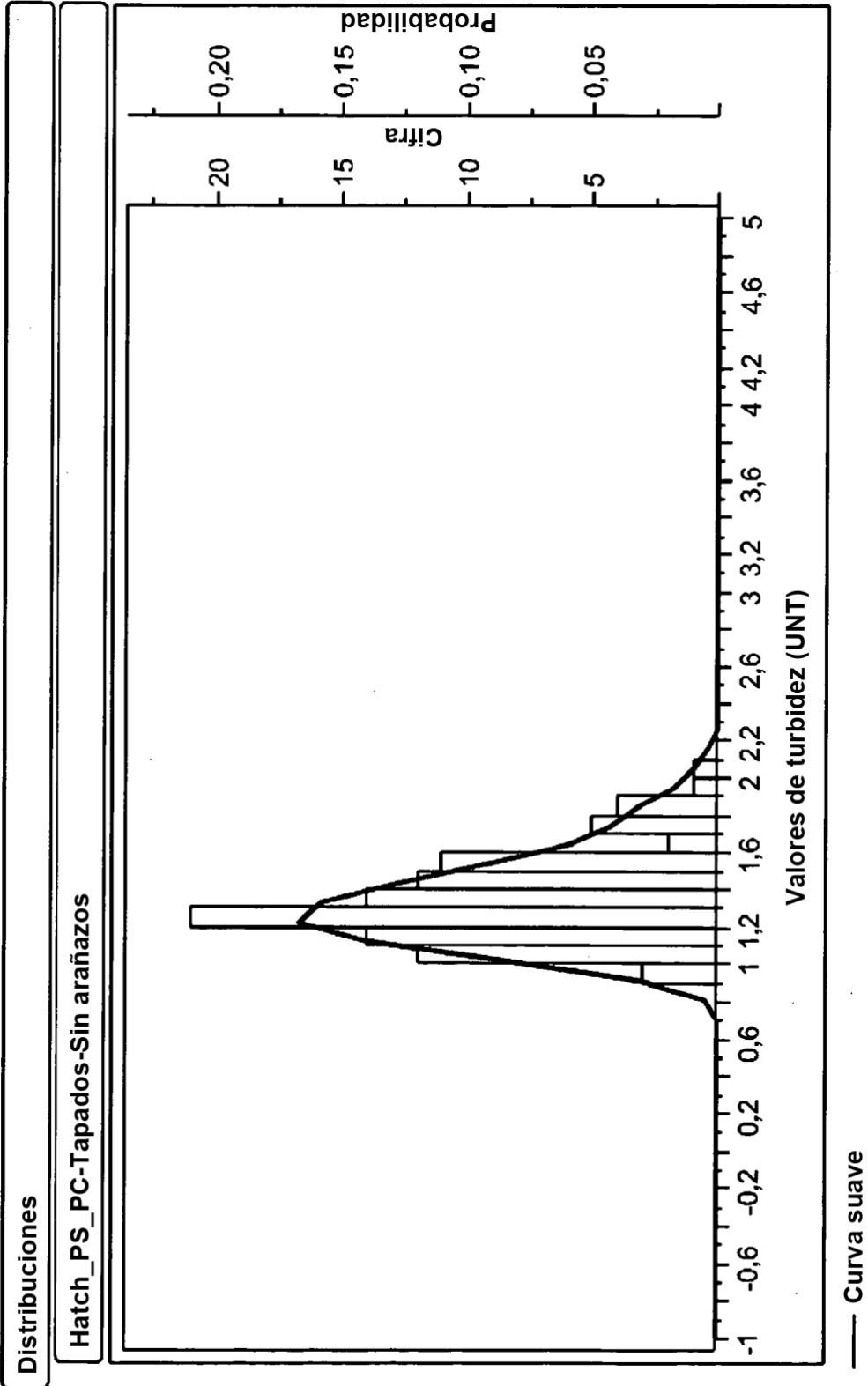
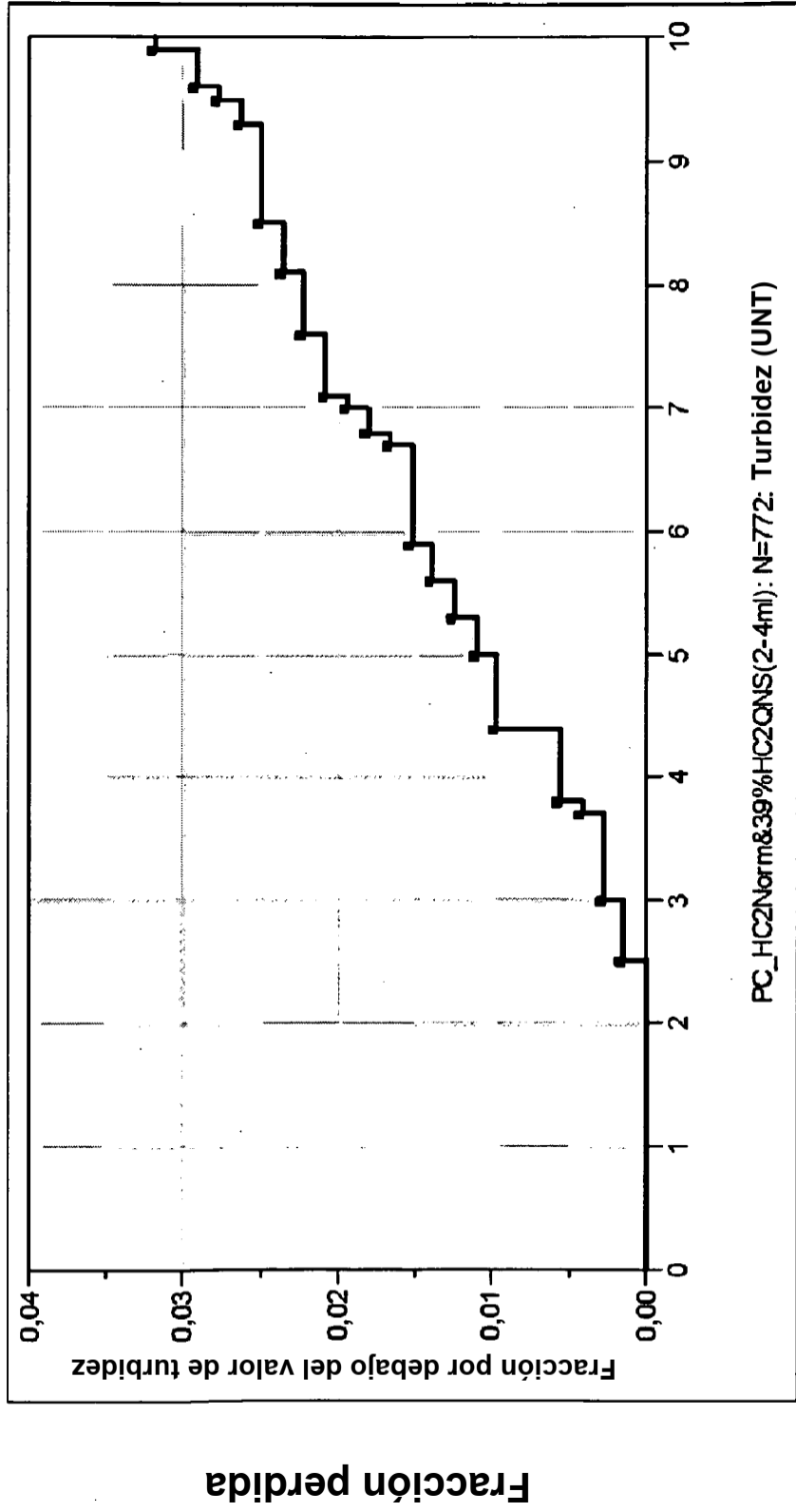


Fig. 23



tiempo hasta el evento: PC_HC2Normal&39%HC2QNS(2-4ml)

Corte de turbidez (UNT)

Fig. 24 Porcentaje de la distribución de la cifra de células convertidas de muestras de PC analizadas por qPCR de beta-globina

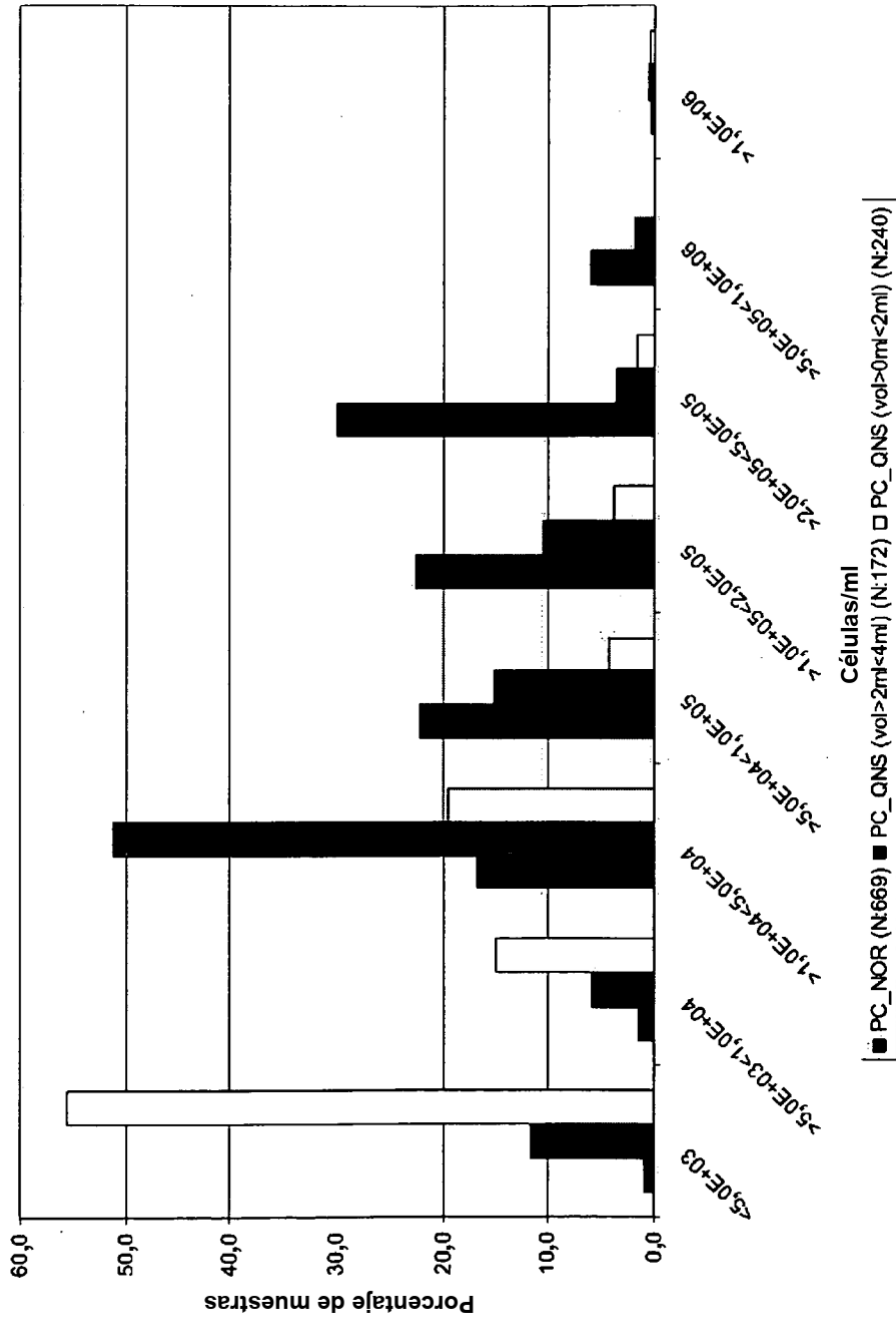


Fig. 25 Porcentaje de la distribución de turbidez de muestras de PC usando el medidor de Hach

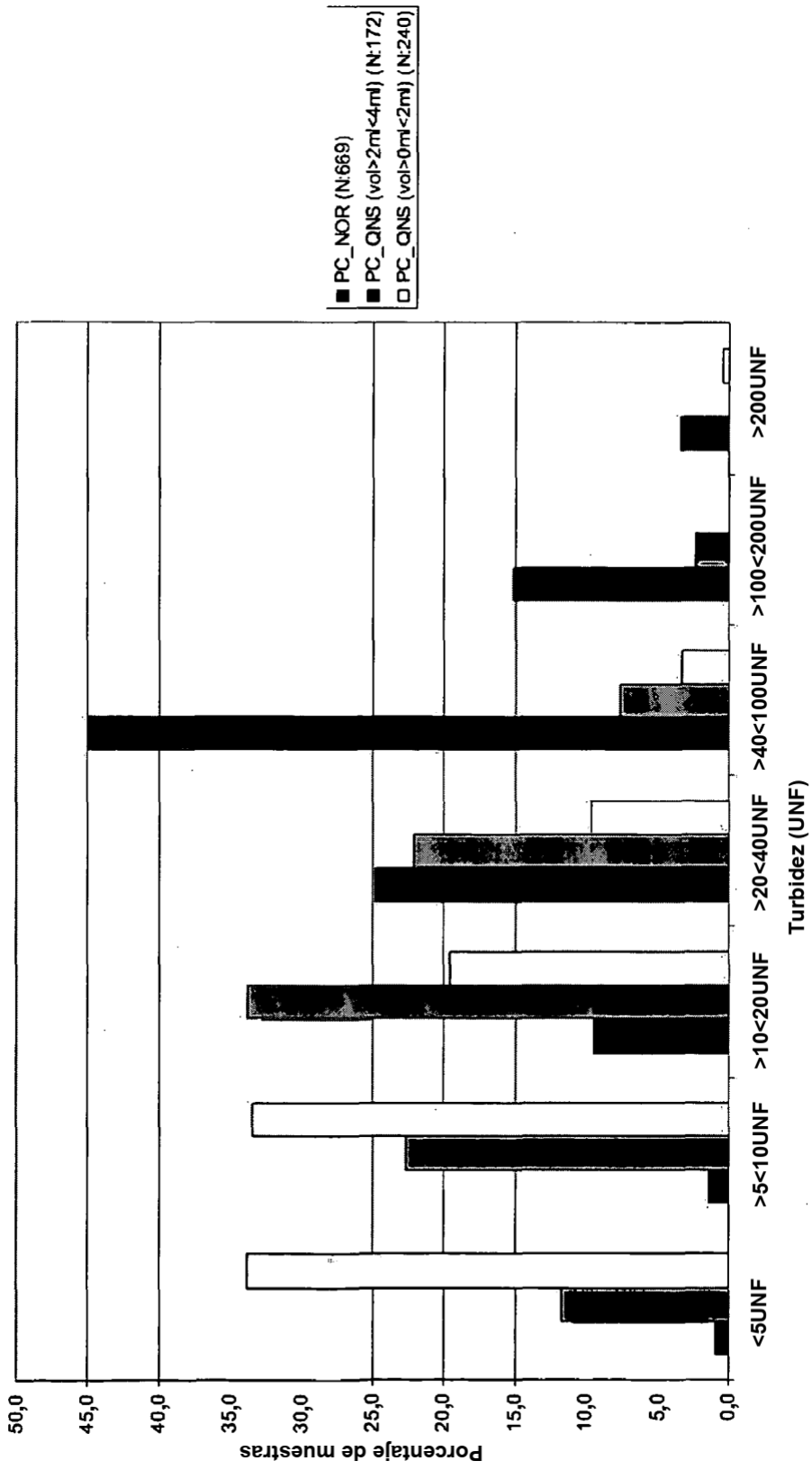


Fig. 26 Distribución de turbidez para muestras de SP (N=393)

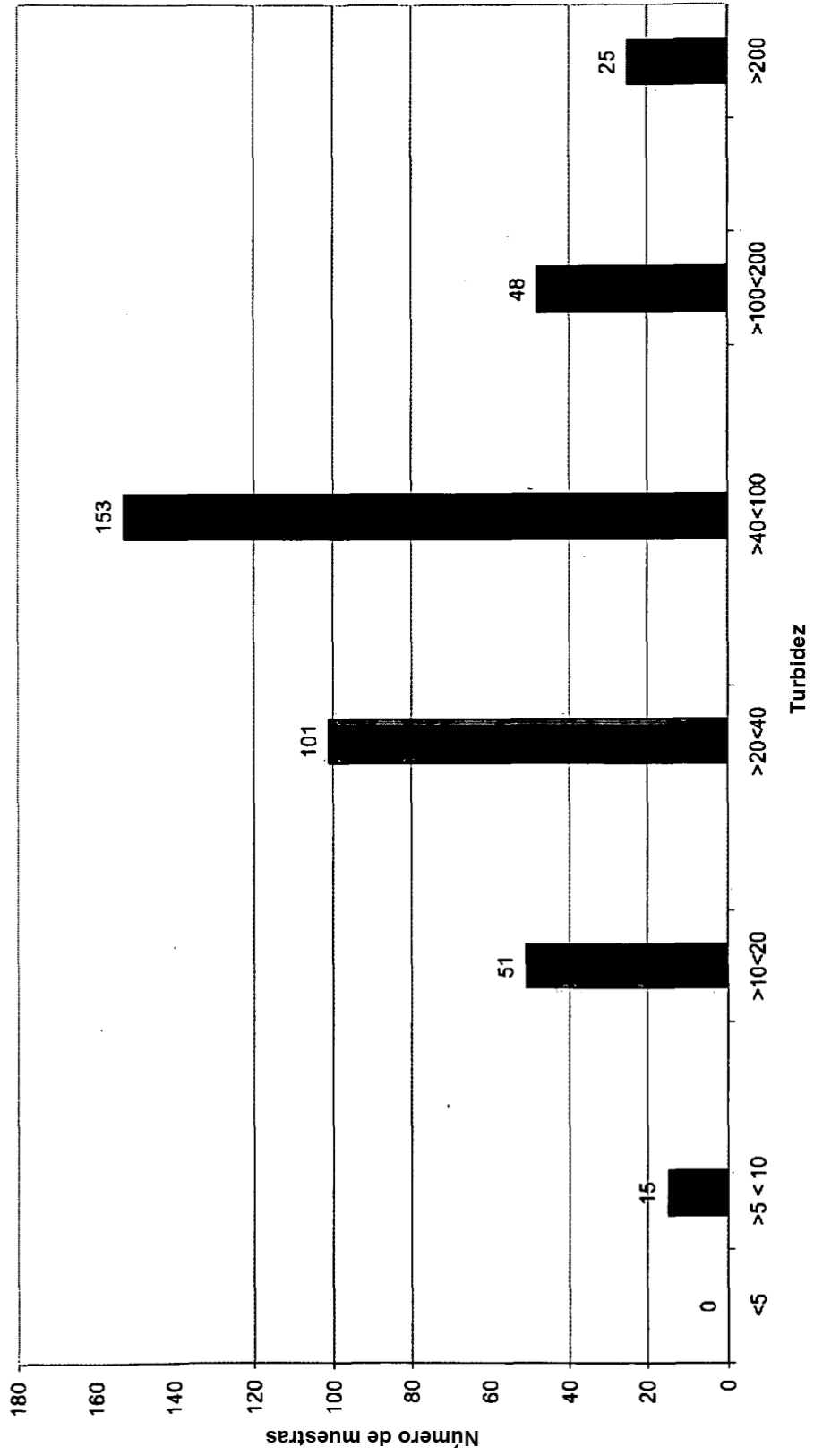


Fig. 27 Curva de calibración del canal 1 usando patrones de turbidez

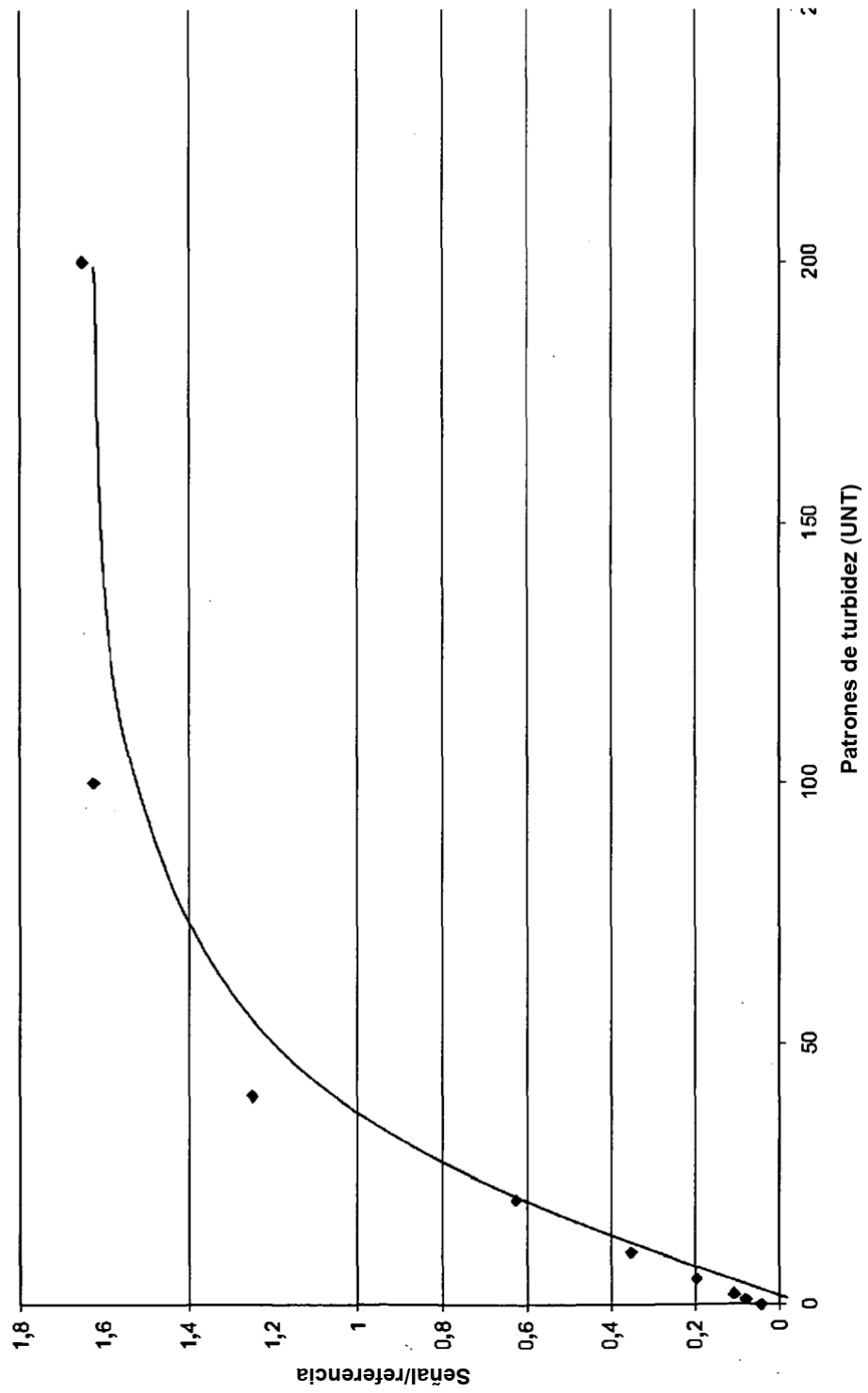


Fig. 28

Curva de calibración del canal 1 usando patrones de turbidez

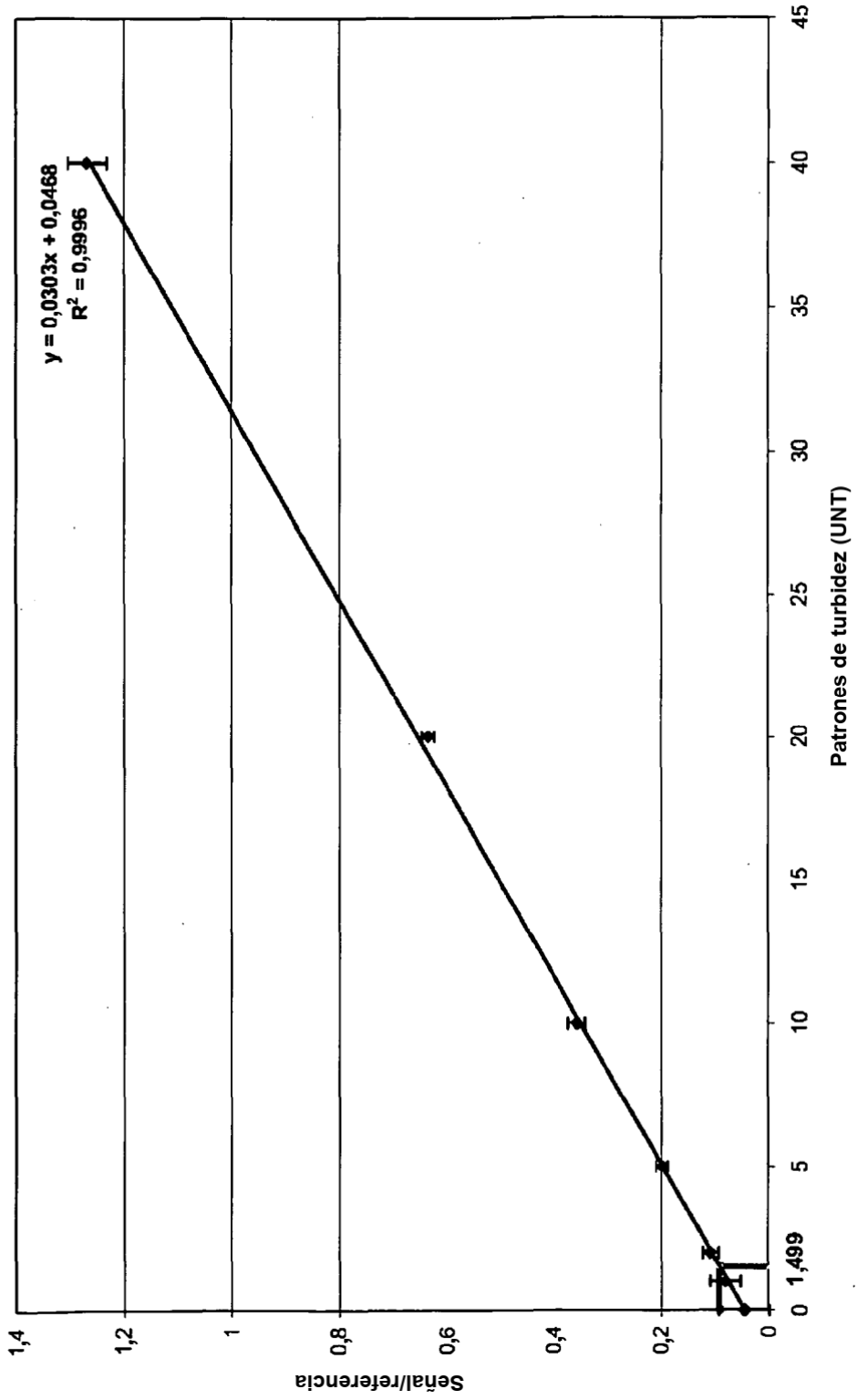


Fig. 29

Volumen mínimo de muestra para SAC1

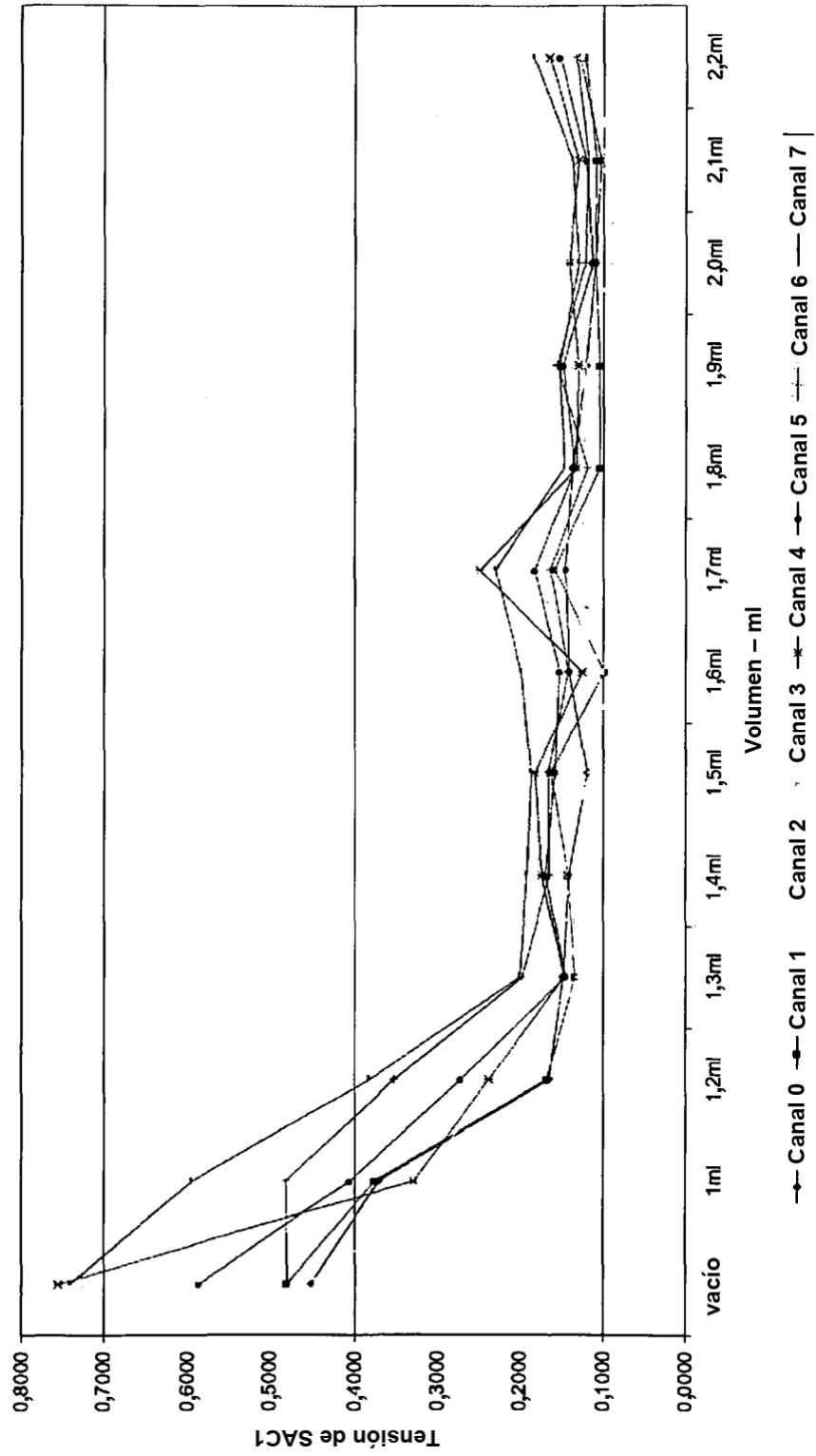
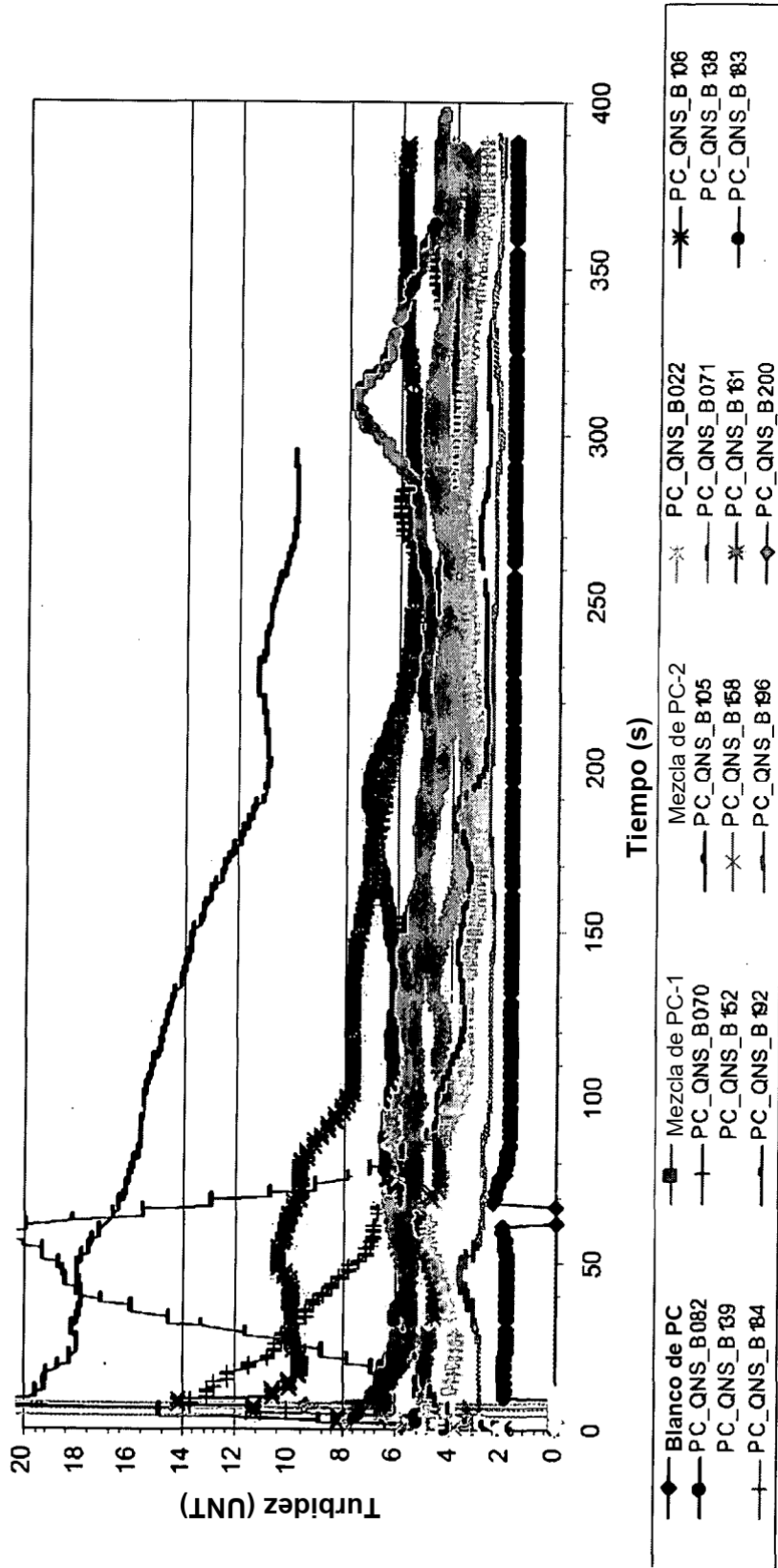
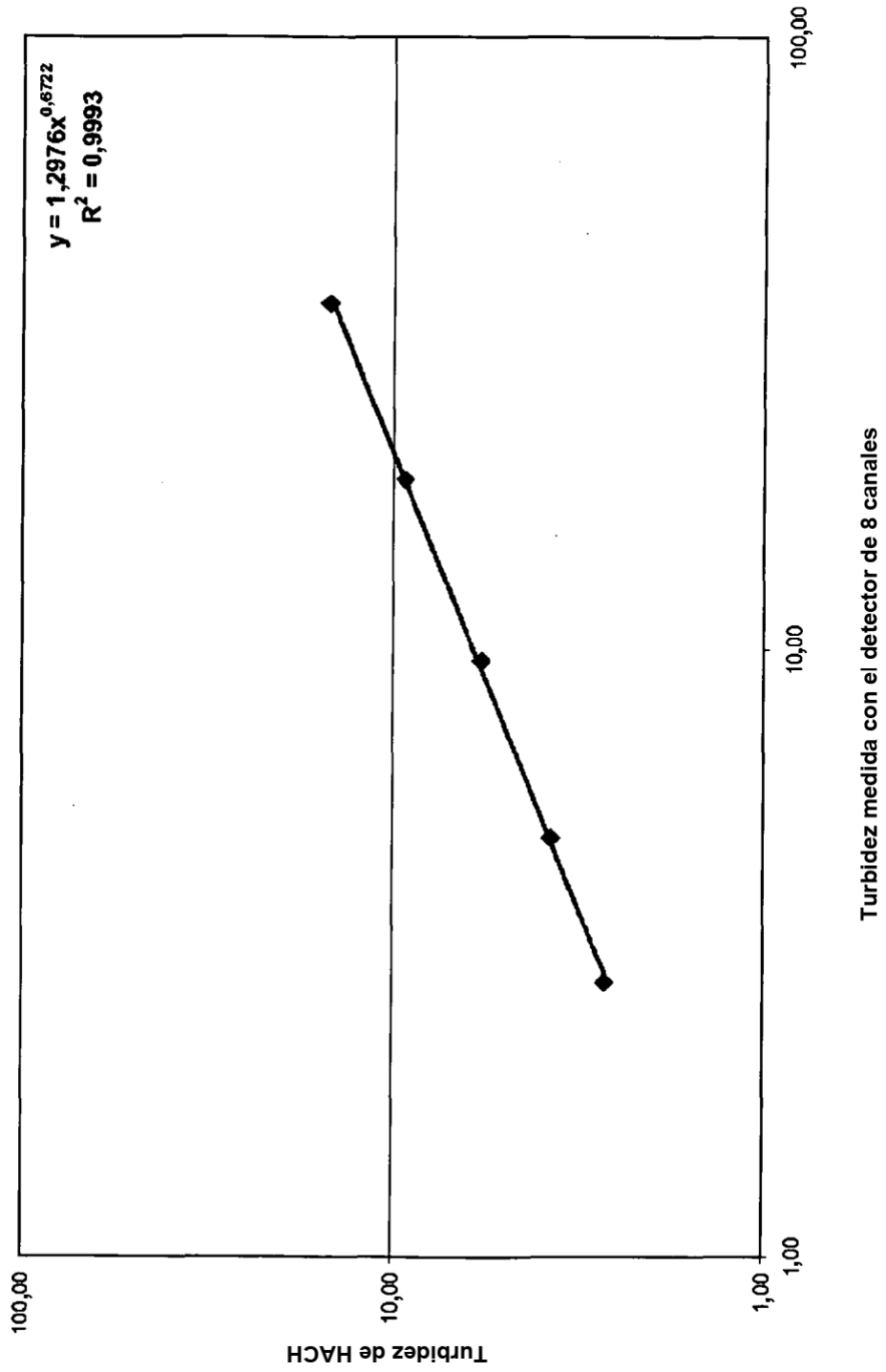


Fig. 30
 Turbidez de células de sedimentación: Muestras clínicas de PC: QNS para HC2



Correlación de las mediciones de turbidez entre el medidor de Hach y el detector de 8 canales
Patrones de turbidez
(n=5; R^2=0,9993)

Fig. 31



Correlación de las mediciones de turbidez entre el medidor de Hach y el detector de 8 canales
Muestras clínicas
(n=235; R²=0,83)

Fig. 32

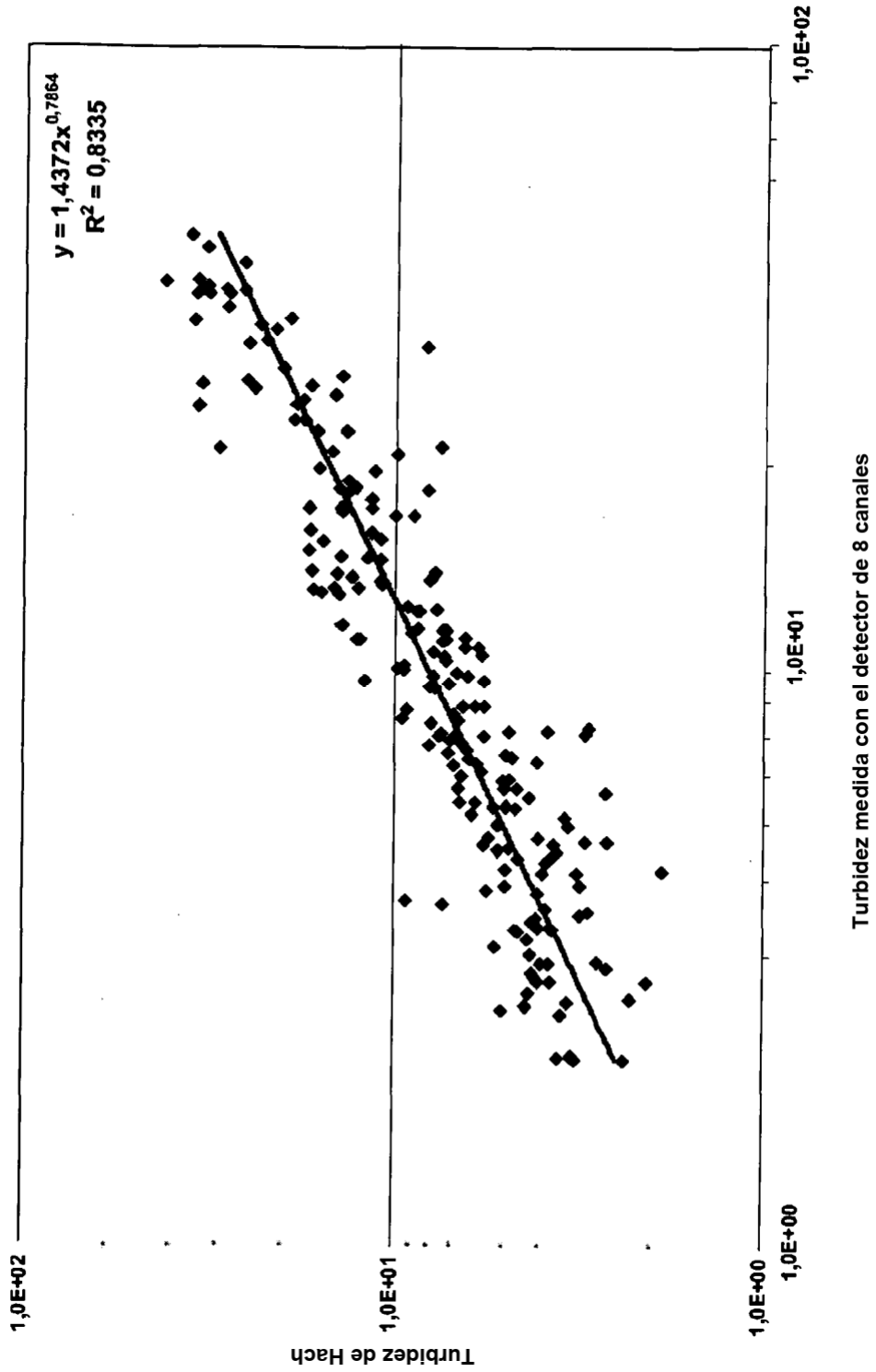


Fig. 33 Distribución de las mediciones de turbidez de las muestras de blanco

