

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 923 792**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6806 (2008.01)

G01N 33/48 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.03.2017** **PCT/US2017/022502**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.09.2017** **WO17160979**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.03.2017** **E 17767427 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.06.2022** **EP 3430169**

54 Título: **Métodos de procesamiento y análisis de ensayo múltiple**

30 Prioridad:

15.03.2016 US 201662308625 P

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

30.09.2022

73 Titular/es:

ABBOTT MOLECULAR INC. (100.0%)
1300 E. Touhy Avenue
Des Plaines, IL 60018, US

72 Inventor/es:

PAWLOWSKI, FRANK;
SKINNER, JOSEPH, P.;
KESSLER, JACK y
NANA, SONAL, SADARIA

74 Agente/Representante:

FERNÁNDEZ POU, Felipe

ES 2 923 792 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

Métodos de procesamiento y análisis de ensayo múltiple

5 Referencia cruzada con las solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica la prioridad de la fecha de presentación de la solicitud de patente provisional de los Estados Unidos con número de serie 62/308,625, presentada el 15 de marzo de 2016.

10 Antecedentes de la invención

Los ensayos de diagnóstico molecular, incluidos los métodos basados en la amplificación de ácido nucleico, se han convertido en un pilar de la medicina clínica y la variedad de pruebas disponibles y la demanda de dichas pruebas por parte de los médicos ha aumentado drásticamente. Esta demanda ejerce una presión cada vez mayor sobre los laboratorios clínicos para procesar, no solo un mayor volumen de muestras, sino también una mayor diversidad de pruebas en las muestras. Por lo tanto, las instalaciones de pruebas clínicas tienen la carga de realizar de manera eficiente un intervalo más amplio de diferentes pruebas basadas en la amplificación de ácido nucleico.

Los protocolos de ensayo definen todos los reactivos, etapas de procesamiento, tiempos de procesamiento, perfiles de temperatura, etc., necesarios para procesar una muestra a través de un instrumento automatizado con el fin de obtener un resultado de diagnóstico. Históricamente, se desarrollan protocolos de ensayo únicos que contienen diferentes reactivos, etapas y tiempos para cada tipo de ensayo con el fin de optimizar el rendimiento del ensayo. Para los instrumentos que procesan muestras en modo por lotes, donde solo se procesa un tipo de ensayo por ejecución, tener protocolos de ensayos únicos no afecta el rendimiento general del sistema ni la complejidad de la programación, ya que el protocolo es el mismo para todas las muestras que se ejecutan en el lote. Sin embargo, en el caso de instrumentos que procesan múltiples tipos de ensayos simultáneamente por ejecución, los protocolos de ensayo únicos tienen un impacto significativo en la complejidad de la programación y el uso eficiente de los recursos del sistema.

30 El documento de los EE. UU. 2012/329664 describe ensayos digitales multiplexados con uso combinatorio de señales.

El documento de los EE. UU. 2015/346228 describe un dispositivo, método y programa de prueba genética.

35 El documento WO 2012/142516 describe un termociclador de microfluidos en tiempo real de exploración y métodos para el termociclado sincronizado y la exploración de detección óptica.

El documento WO 2004/074847 describe un método de exploración.

40 Grissom y otros, en "Path scheduling on digital microfluidic biochips", Design Automation Conference (DAC), 2012 49th ACM/EDAC/IEEE, IEEE, 3 de junio de 2012, páginas 26-35, XP032204565, describe la programación de trayectorias en biochips microfluídicos digitales.

Resumen

45 Los aspectos de la presente descripción incluyen métodos para el procesamiento de ensayo múltiple y sistemas de procesamiento de ensayo múltiple y cuantificación de ensayo múltiple.

De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona un método para el procesamiento de ensayo múltiple llevado a cabo mediante el uso de un sistema automatizado de acuerdo con la reivindicación 1.

50 Los ejemplos en la presente descripción incluyen un método de procesamiento de ensayo múltiple que incluye: a) preparar un cartucho de unidad de procesamiento de muestra (SPU) para cada uno de dos o más ensayos diferentes de detección de ácido nucleico diana; b) cargar una muestra en cada cartucho SPU preparado; c) procesar cada cartucho SPU cargado para aislar un ácido nucleico de muestra para cada uno de los dos o más ensayos diferentes de detección de ácido nucleico diana; y d) amplificar y analizar cada ácido nucleico de muestra para un ácido nucleico diana específico para cada uno de los dos o más ensayos diferentes de detección de ácido nucleico diana, en donde el método comprende al menos una etapa de retardo dentro de o entre las etapas a) a la d) y las etapas a) a la d) se realizan cada una durante un período de tiempo que es igual para los dos o más ensayos diferentes de detección de ácido nucleico diana. En algunos ejemplos, el método incluye una etapa de retardo entre las etapas a) y b), una etapa de retardo entre las etapas b) y c) y/o una etapa de retardo entre las etapas c) y d).

60 En algunos ejemplos, el método incluye la rehidratación de reactivos liofilizados para cada uno de los dos o más ensayos diferentes de detección de ácido nucleico diana antes de la preparación, en donde la rehidratación se realiza durante un período de tiempo que es igual para los dos o más ensayos diferentes de detección de ácido nucleico diana. En algunos ejemplos, el método incluye una etapa de retardo después de la rehidratación.

En algunos ejemplos, el método incluye el pretratamiento de cada cartucho SPU cargado antes del procesamiento, en donde el pretratamiento se realiza durante un período de tiempo que es igual para los dos o más ensayos diferentes de detección de ácido nucleico diana. En algunos ejemplos, el método incluye una etapa de retardo después del pretratamiento.

En algunos ejemplos, el pretratamiento comprende poner en contacto la muestra con una proteasa.

En algunos ejemplos, el procesamiento comprende transferir la muestra a una solución que comprende un tampón de lisis, en donde la transferencia se realiza durante un período de tiempo que es igual para los dos o más ensayos diferentes de detección de ácido nucleico diana. En algunos ejemplos, el método incluye una etapa de retardo después de la transferencia.

En algunos ejemplos, el procesamiento comprende eluir el ácido nucleico y transferir el ácido nucleico eluido a un recipiente de reacción para la amplificación y el análisis, en donde la elución se realiza durante un período de tiempo que es igual para los dos o más ensayos diferentes de detección de ácido nucleico diana. En algunos ejemplos, el método incluye una etapa de retardo después de la elución.

En algunos ejemplos, dos o más ensayos diferentes de detección de ácido nucleico diana incluyen un ensayo para detectar un ácido nucleico del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), un ensayo para detectar un ácido nucleico del virus de la hepatitis C (VHC), un ensayo para detectar un ácido nucleico del virus de la hepatitis B (VHB), un ensayo para detectar un ácido nucleico de Chlamydia trachomatis (CT), un ácido nucleico de Neisseria gonorrhoeae (NG) o sus combinaciones, un ensayo para detectar un ácido nucleico del virus del papiloma humano (VPH), un ensayo para detectar un ácido nucleico de citomegalovirus (CMV), un ensayo para detectar un ácido nucleico del virus de Epstein-Barr (EBV), un ensayo para detectar un ácido nucleico del virus BK, un ensayo para detectar un ácido nucleico de Staphylococcus aureus resistente a la meticilina (MRSA), un ensayo para detectar un ácido nucleico de Clostridium difficile (D. Diff.), un ensayo para detectar un ácido nucleico de Enterococcus resistente a la vancomicina (VRE), un ensayo para detectar un ácido nucleico de adenovirus, un ensayo para detectar un ácido nucleico de tuberculosis (TB), un ensayo para detectar un ácido nucleico del virus Varicella-zoster (VZV), un ensayo para detectar un ácido nucleico del virus del herpes simple (HSV), un ensayo para detectar un ácido nucleico del virus JC, un ensayo para detectar un ácido nucleico de enterovirus, un ensayo para detectar un ácido nucleico de linfogranuloma venéreo (LGV), un ensayo para detectar un ácido nucleico del panel viral respiratorio (RVP), un ensayo para detectar un ácido nucleico del virus del herpes humano 6 (HHV6), un ensayo para detectar un ácido nucleico de Trichomonas (Trich), un ácido nucleico de Mycoplasma (Myco) o sus combinaciones, y/o un ensayo para detectar un ácido nucleico de Norovirus. En algunos ejemplos, el método incluye procesar 3 o más ensayos diferentes de detección de ácido nucleico diana. En algunos ejemplos, el método incluye procesar 10 o más ensayos diferentes de detección de ácido nucleico diana.

También se describe un método de cuantificación de ensayo múltiple que incluye: a) iniciar un protocolo de amplificación de ácido nucleico en un primer par de muestras; b) explorar el primer par de muestras con un detector óptico a intervalos regulares durante el protocolo de amplificación de ácido nucleico, en donde el intervalo permite la recopilación de datos por parte del detector óptico en puntos de tiempo del protocolo de amplificación suficientes para la cuantificación de la amplificación de ácido nucleico en el primer par de muestras; c) iniciar el protocolo de amplificación de ácido nucleico en un segundo par de muestras en un momento que permita que el detector óptico explore el segundo par de muestras a intervalos regulares y que el detector óptico recopile datos en momentos del protocolo de amplificación suficientes para la cuantificación de amplificación de ácido nucleico en el segundo par de muestras.

En algunos ejemplos, el método de cuantificación de ensayo múltiple incluye iniciar el protocolo de amplificación de ácido nucleico del primer par de muestras e iniciar el protocolo de amplificación de ácido nucleico del segundo par de muestras esencialmente al mismo tiempo. En algunos ejemplos, el método de cuantificación de ensayo múltiple incluye iniciar el protocolo de amplificación de ácido nucleico del primer par de muestras e iniciar el protocolo de amplificación de ácido nucleico del segundo par de muestras en momentos diferentes. En algunos ejemplos del método de cuantificación de ensayo múltiple, la exploración se realiza tres o más veces durante el protocolo de amplificación de ácido nucleico. En algunos ejemplos del método de cuantificación de ensayo múltiple, el intervalo permite la recopilación de datos por parte del detector óptico en más puntos temporales del protocolo de amplificación que los necesarios para la cuantificación de la amplificación de ácido nucleico en el primer y segundo par de muestras.

En algunos ejemplos, el método de cuantificación de ensayo múltiple incluye iniciar el protocolo de amplificación de ácido nucleico en un tercer par de muestras en un momento que permite que el detector óptico explore el tercer par a intervalos regulares y la recopilación de datos por parte del detector óptico en puntos de tiempo del protocolo de amplificación suficientes para la cuantificación de la amplificación de ácido nucleico en el tercer par de muestras. En algunos ejemplos, el método de cuantificación de ensayo múltiple incluye iniciar el protocolo de amplificación de ácido nucleico de los pares de muestras primero, segundo y tercero esencialmente al mismo tiempo. En algunos ejemplos, el método de cuantificación de ensayo múltiple incluye el inicio del protocolo de amplificación de ácido nucleico del primer, segundo y tercer par de muestras en momentos diferentes.

En algunos ejemplos, el método de cuantificación de ensayo múltiple incluye iniciar el protocolo de amplificación de ácido nucleico en un cuarto par de muestras a la vez que permite que el cuarto par sea explorado por el detector óptico a intervalos regulares y la recopilación de datos por el detector óptico en puntos de tiempo del protocolo de amplificación suficientes para la cuantificación de la amplificación de ácido nucleico en el cuarto par de muestras. En algunos ejemplos, el método de cuantificación de ensayo múltiple incluye iniciar el protocolo de amplificación de ácido nucleico de los pares de muestras primero, segundo, tercero y cuarto esencialmente al mismo tiempo. En algunos ejemplos, el método de cuantificación de ensayo múltiple incluye el inicio del protocolo de amplificación de ácido nucleico del primer, segundo, tercer y cuarto pares de muestras en momentos diferentes.

En algunos ejemplos, el método de cuantificación de ensayo múltiple incluye iniciar el protocolo de amplificación de ácido nucleico en un quinto par de muestras a la vez que permite que el detector óptico explore el quinto par a intervalos regulares y la recopilación de datos por parte del detector óptico en puntos de tiempo del protocolo de amplificación suficientes para la cuantificación de la amplificación de ácido nucleico en el quinto par de muestras. En algunos ejemplos, el método de cuantificación de ensayo múltiple incluye iniciar el protocolo de amplificación de ácido nucleico de los pares de muestras primero, segundo, tercero, cuarto y quinto esencialmente al mismo tiempo. En algunos ejemplos, el método de cuantificación de ensayo múltiple incluye el inicio del protocolo de amplificación de ácido nucleico del primer, segundo, tercer, cuarto y quinto par de muestras en momentos diferentes.

En algunos ejemplos, el método de cuantificación de ensayo múltiple incluye iniciar el protocolo de amplificación de ácido nucleico en un sexto par de muestras a la vez que permite que el sexto par sea explorado por el detector óptico a intervalos regulares y la recopilación de datos por el detector óptico en puntos de tiempo del protocolo de amplificación suficientes para la cuantificación de la amplificación de ácido nucleico en el sexto par de muestras. En algunos ejemplos, el método de cuantificación de ensayo múltiple incluye el inicio del protocolo de amplificación de ácido nucleico de los pares de muestras primero, segundo, tercero, cuarto, quinto y sexto esencialmente al mismo tiempo. En algunos ejemplos, el método de cuantificación de ensayo múltiple incluye el inicio del protocolo de amplificación de ácido nucleico del primer, segundo, tercer, cuarto, quinto y sexto par de muestras en momentos diferentes.

Otros ejemplos de la presente descripción incluyen un sistema de procesamiento de ensayo múltiple que incluye: a) un módulo de preparación de cartuchos de unidad de procesamiento de muestras (SPU); b) un módulo de carga de muestras; c) un módulo de procesamiento de SPU; d) un módulo de amplificación y análisis de ácido nucleico; y e) circuitos de control configurados para realizar un método como en la presente descripción se describen.

En algunos ejemplos, el sistema incluye un módulo para rehidratar reactivos liofilizados. En algunos ejemplos, el sistema incluye un módulo de procesamiento de SPU configurado para pretratar cada muestra antes de procesar la muestra. En algunos ejemplos, el sistema incluye un módulo de transferencia de reacción. En algunos ejemplos, el sistema incluye un solo recurso de pipeta robótica que funciona en el módulo de preparación de cartuchos SPU. En algunos ejemplos del sistema, el recurso de pipeta robótica única también funciona en el módulo de carga de muestras, el módulo para rehidratar reactivos liofilizados y/o el módulo de transferencia de reacción. En algunos ejemplos, el sistema incluye uno o más robots de llenado a granel. En algunos ejemplos, el sistema incluye un solo robot de llenado a granel. En algunos ejemplos, el sistema incluye uno o más robots de desecho. En algunos ejemplos, el sistema incluye un único robot de desecho. En algunos ejemplos, el sistema incluye uno o más robots de manipulación de cartuchos SPU. En algunos ejemplos, el sistema incluye un solo robot de manipulación de cartuchos SPU.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 representa un protocolo simultáneo idealizado usado para armonizar el procesamiento de muestras para ensayos de ácido nucleico diferentes relacionados con protocolos de diagnóstico de VIH, VHC, CT/NG y VHB. La Figura 2 demuestra cómo pueden procesarse cuatro tipos de ensayos diferentes (VIH, VHC, CT/NG y VHB), mediante el uso de un protocolo simultáneo de temporización de ensayo común, en tres ejecuciones dado un sistema idealizado con recursos esencialmente ilimitados. Se indica contención de recursos.

La Figura 3 demuestra una secuencia con intervalos de temporización colocados apropiadamente (es decir, retrasos) que dan como resultado una cadencia fija de entrada de muestra que permite un único protocolo simultáneo de temporización en un sistema con recursos finitos.

La Figura 4 demuestra cómo pueden configurarse tres ensayos diferentes, cada uno con cuatro muestras, durante la amplificación y detección para mediciones coordinadas de acuerdo con una modalidad de la descripción.

La Figura 5 representa un diagrama de flujo para un protocolo de procesamiento de muestras convencional realizado en un sistema automatizado sujeto a contención de recursos.

La Figura 6 representa un diagrama de flujo para una modalidad de los presentes métodos que emplean un protocolo simultáneo con retrasos programados entre las etapas del proceso.

Definiciones

El término "analito", como se usa en la presente descripción, se refiere a una molécula diana que se detectará en una muestra en donde la detección del analito puede ser indicativa de un estado biológico del organismo del que se deriva la muestra. Por ejemplo, cuando un analito es un analito de ácido nucleico, la detección del analito de ácido nucleico

puede ser indicativo de un estado biológico de los organismos de los que se derivó la muestra, incluido, por ejemplo, cuando la detección de ácido nucleico viral puede indicar infección con un patógeno particular, etc.

El término "recipiente de reacción", como se usa en la presente descripción, generalmente se refiere a un contenedor dentro del cual se realiza una reacción de amplificación. Tales recipientes de reacción pueden obtenerse de fuentes comerciales, por ejemplo, como componentes listos para usar, o pueden fabricarse a medida. Los recipientes de reacción útiles en reacciones de amplificación de ácido nucleico generalmente serán capaces de transferir calor rápidamente a través del recipiente, por ejemplo, mediante el uso de materiales altamente conductores (por ejemplo, plásticos conductores térmicos) o modificaciones físicas del recipiente (por ejemplo, paredes delgadas). Los recipientes de reacción comunes incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, tubos, viales, placas de pocillos múltiples y similares. Los recipientes de reacción pueden construirse de una variedad de materiales que incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, materiales poliméricos.

El término "evaluar" incluye cualquier forma de medición e incluye determinar si un elemento está presente o no. Los términos "determinar", "medir", "valorar", "evaluar" y "ensayar" se usan indistintamente e incluyen determinaciones cuantitativas y cualitativas. Puede evaluarse de forma relativa o absoluta. "Evaluar la identidad de" incluye determinar la identidad más probable de un compuesto, formulación o sustancia particular, y/o determinar si un compuesto, formulación o sustancia prevista está presente o ausente. "Evaluar la calidad de" incluye hacer una evaluación cualitativa o cuantitativa de la calidad, por ejemplo, a través de la comparación de un valor determinado con una referencia o estándar de calidad conocido.

El término "fluido corporal" como se usa en la presente se refiere generalmente a fluidos derivados de una "muestra biológica" que abarca una variedad de tipos de muestras que se obtienen de un individuo o una población de individuos y puede usarse en un ensayo de diagnóstico, de monitoreo o de cribado. La definición abarca la sangre y otras muestras líquidas de origen biológico. La definición también incluye muestras que se manipulan de cualquier forma después de su obtención, tal como por mezcla o agrupación de muestras individuales, tratamiento con reactivos, solubilización o enriquecimiento de ciertos componentes, tales como las células nucleadas, células no nucleadas, patógenos, etc.

El término "muestra biológica" abarca una muestra clínica y también incluye células en cultivo, sobrenadantes de células, lisados de células, suero, plasma, fluido biológico y muestras de tejido. El término "muestra biológica" incluye orina, saliva, fluido cefalorraquídeo, fluido intersticial, fluido ocular, fluido sinovial, fracciones de sangre tales como plasma y suero, y similares.

Los términos "control", "ensayo de control", "muestra de control" y similares, se refieren a una muestra, prueba u otra porción de un procedimiento experimental o procedimiento de diagnóstico o diseño experimental para los que se conoce un resultado esperado con gran certeza, por ejemplo, con el fin de indicar si los resultados obtenidos de las muestras experimentales asociadas son fiables, indicar con qué grado de confianza los resultados experimentales asociados indican un resultado verdadero y/o para permitir la calibración de los resultados experimentales. Por ejemplo, en algunos casos, un control puede ser un ensayo de "control negativo" de manera que se excluya un componente esencial del ensayo de manera que un experimentador pueda tener una gran certeza de que el ensayo de control negativo no producirá un resultado positivo. En algunos casos, un control puede ser un "control positivo" de manera que todos los componentes de un ensayo particular se caractericen y se conozcan, cuando se combinen, para producir un resultado particular en el ensayo que se realiza, de manera que un experimentador pueda tener una gran certeza de que el ensayo de control positivo no producirá un resultado positivo. Los controles también pueden incluir muestras "en blanco", muestras "estándar" (por ejemplo, muestras "estándar de oro"), muestras validadas, etc.

Por "circuitos de control" o "unidad de procesamiento de datos", como se usa en la presente descripción, se entiende cualquier combinación de equipo informático y/o programas informáticos que realizará las funciones que se requieren de ella. Por ejemplo, cualquier unidad de procesamiento de datos en la presente descripción puede ser un microprocesador digital programable tal como el disponible en forma de controlador electrónico, ordenador central, servidor u ordenador personal (de escritorio o portátil). Donde la unidad de procesamiento de datos es programable, la programación adecuada puede comunicarse desde una ubicación remota a la unidad de procesamiento de datos, o guardada previamente en un producto de programa de ordenador (tal como un medio de almacenamiento legible por ordenador portátil o fijo, ya sea basado en un dispositivo magnético, óptico o de estado sólido). En algunos casos, los circuitos de control o una unidad de procesamiento de datos de la presente descripción pueden programarse específicamente para realizar las funciones requeridas y, por lo tanto, pueden denominarse ordenador de propósito especial.

Por "simultáneo" o "protocolo simultáneo" se entiende un protocolo en el que las etapas del protocolo se siguen entre sí lo más cerca posible. En algunos casos, descritos en la presente descripción se puede determinar un protocolo simultáneo en base a las etapas correspondientes de diferentes protocolos donde dichos protocolos se realizarán en paralelo o concomitantemente. Por lo tanto, un protocolo simultáneo no necesita consistir únicamente en las etapas más cortas sucesivas de un protocolo particular, sino que puede incluir uno o más etapas más largas de varios protocolos que se van a realizar en paralelo.

Por "cadencia" se entiende lote por unidad de tiempo y, en lo que se refiere a un protocolo simultáneo, una cadencia puede relacionarse con un punto o tiempo regular o fijo de entrada de muestra o inicio de procesamiento de muestra. En consecuencia, una cadencia regular puede referirse al inicio de un lote a intervalos de tiempo regulares.

Por "disputa de recursos", como se usa en la presente descripción, se entiende un conflicto sobre el acceso a un recurso compartido de un sistema integrado. La disputa de recursos puede aplicarse a los componentes físicos de un sistema cuando dichos componentes limitan la progresión de un proceso. Por ejemplo, cuando dos módulos de un sistema utilizan un recurso compartido, dicho recurso puede estar en disputa si ambos módulos requieren el recurso simultáneamente.

Por "lote", tal como se usa en la presente descripción, se entiende una agrupación de muestras comunes o ensayos procesados en paralelo de acuerdo con un único protocolo que tiene un tiempo de inicio común. Las muestras o los ensayos dentro de los lotes de la presente descripción pueden o no procesarse exactamente de la misma manera, pero generalmente se iniciarán y terminarán juntos. Por ejemplo, las muestras y los ensayos del lote pueden procesarse exactamente de la misma manera a lo largo de todo el protocolo, lo que incluye, por ejemplo, cuando la preparación, el procesamiento y la amplificación/análisis de la muestra son idénticos para todas las muestras o ensayos del lote. En otros casos, es posible que las muestras y los ensayos del lote no se procesen exactamente de la misma manera a lo largo de todo el protocolo, lo que incluye, por ejemplo, cuando una o más de las muestras de preparación, procesamiento y/o amplificación/análisis no son idénticas para todas las muestras o ensayos del lote.

Descripción detallada de la invención

La presente descripción proporciona métodos de procesamiento de ensayo múltiple y análisis de ensayo múltiple. Tal procesamiento y análisis de ensayo múltiple pertenecen a la detección automatizada de ácidos nucleicos diana, por ejemplo, como se realiza en el entorno clínico con fines de diagnóstico. También se proporcionan protocolos de temporización de ensayos comunes derivados de una variedad de protocolos de análisis y amplificación de ácido nucleico individuales y modificados para evitar la disputa de recursos. La presente descripción también describe sistemas y dispositivos para practicar los métodos como se describe en la presente descripción.

Antes de que se describa la presente invención con mayor detalle, debe entenderse que esta invención no se limita a las modalidades particulares descritas. También debe entenderse que la terminología usada en la presente descripción es solo para el propósito de describir las modalidades particulares, y no pretende limitarse, dado que el alcance de la presente invención se limitará solo mediante las reivindicaciones adjuntas.

Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, a la décima parte de la unidad del límite inferior, a menos que el contexto lo indique de cualquier otra manera, entre el límite superior e inferior de ese intervalo, y cualquier otro valor establecido o intermedio en ese intervalo establecido, está incluido. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños pueden incluirse independientemente en los intervalos más pequeños y también están incluidos, sujetos a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo establecido. Cuando el intervalo establecido incluye uno o ambos límites, también se incluyen los intervalos que excluyen uno o ambos límites incluidos.

Ciertos intervalos se presentan en la presente descripción con valores numéricos precedidos por el término "aproximadamente". El término "aproximadamente" se usa en la presente descripción para proporcionar soporte literal para el número exacto que precede, así como también un número que está cerca de o aproximadamente al número que el término precede. Para determinar si un número está cerca de o aproximadamente a un número específicamente citado, el número que está cerca o aproximadamente no citado puede ser un número que, en el contexto en donde se presenta, proporciona el equivalente sustancial del número específicamente citado.

A menos que se especifique de cualquier otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente descripción tienen el mismo significado que el que se conoce comúnmente por los expertos en la técnica a la que pertenece esta invención. La mención de cualquier publicación es por su descripción anterior a la fecha de presentación y no deben considerarse una admisión de que la presente invención no tiene derecho a anteceder tal publicación en virtud de la invención anterior. Adicionalmente, las fechas de publicación proporcionadas pueden ser diferentes de las fechas de publicación reales, por lo que es posible que deban confirmarse independientemente.

Se hace notar que, como se usa en la presente y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una", y "el" incluyen los referentes plurales a menos que el contexto lo dicte claramente de cualquier otra manera. Se hace notar además que las reivindicaciones pueden redactarse para excluir cualquier elemento opcional. Como tal, esta declaración se pretende para servir como base de antecedente para el uso de tal terminología exclusiva como "únicamente", "solamente" y similares en relación con la recitación de los elementos de acuerdo con la reivindicación, o el uso de una limitación "negativa".

Como serán evidentes para aquellos expertos en la técnica con la lectura de esta descripción, cada una de las modalidades individuales que se describen e ilustran en la presente descripción tiene componentes y características distintas que fácilmente pueden separarse de, o combinarse con las características de cualquiera de otras muchas

modalidades. Cualquier método citado puede realizarse para los eventos citados o en cualquier otro orden lo cual es lógicamente posible.

Métodos

La presente descripción proporciona métodos de procesamiento de ensayo múltiple de manera que "ensayo múltiple" se entienda múltiples, dos o más ensayos diferentes. El procesamiento y/o análisis de ensayo múltiple puede ser realizado por un solo dispositivo de análisis moleculares, incluidos aquellos dispositivos de análisis molecular que tienen recursos físicos limitados. En muchas modalidades, los métodos instantáneos pertenecen al procesamiento de ensayo múltiple de amplificación de ácido nucleico y análisis de ensayos que incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, aquellos que involucran métodos de PCR, incluidos, por ejemplo, métodos de PCR en tiempo real.

El proceso de PCR es un método de amplificación de ácido nucleico mediante el cual una secuencia de ácido nucleico se amplifica por un factor de 2^n mediante repetición de (1) una temperatura de desnaturalización (por ejemplo, de 95 °C) que sirve para desnaturalizar las dos hebras de un molde de ácido nucleico de doble hebra; (2) una temperatura de hibridación (por ejemplo, del orden de 55 °C a 65 °C) que sirve para hibridar uno o más ácidos nucleicos complementarios a una sola hebra del ácido nucleico desnaturalizado; y (3) una temperatura de extensión que proporciona la temperatura permisiva para que una polimerasa de ácido nucleico extienda el ácido nucleico complementario de acuerdo con la secuencia de la plantilla, alternativamente n veces (denominado "ciclo térmico").

En la PCR en tiempo real, la cantidad de ácido nucleico se mide en una pluralidad de puntos de tiempo durante la reacción de amplificación para determinar la cantidad real o relativa del analito de ácido nucleico diana inicialmente presente en la muestra. La PCR en tiempo real puede ser cuantitativa, semicuantitativa o cualitativa. La PCR en tiempo real generalmente se lleva a cabo en un termociclador con la capacidad de iluminar cada muestra de amplificación con un haz de luz de al menos una longitud de onda específica y detectar la fluorescencia emitida por un fluoróforo excitado que se incorpora al amplicón o no se apaga durante amplificación. Pueden usarse fluorocromos no específicos (por ejemplo, colorantes de unión a ADN como, por ejemplo, SYBR Green) o sondas de hibridación fluorescentes específicas. Mediante el uso de etiquetas de diferentes colores, las sondas fluorescentes pueden usarse en ensayos multiplex para monitorear varias secuencias diana en el mismo tubo.

Un método mediante el uso de sondas marcadas con fluorescencia se basa en una sonda basada en ADN con un indicador fluorescente en un extremo y un extintor de fluorescencia en el extremo opuesto de la sonda. La proximidad del indicador al extintor impide la detección de su fluorescencia. Cuando se une a una secuencia diana, la ruptura de la sonda por la actividad de la exonucleasa 5' a 3' de la polimerasa rompe la proximidad indicador-extintor y, por lo tanto, permite la emisión de fluorescencia sin apagar, que puede detectarse después de la excitación con una longitud de onda de luz particular. Por lo tanto, un aumento en el producto diana de la sonda indicadora en cada ciclo de PCR provoca un aumento proporcional en la fluorescencia debido a la ruptura de la sonda y la liberación del indicador. Cualquier polimerasa conveniente con actividad de exonucleasa de 5' a 3' puede encontrar uso en dichos ensayos, que incluyen, pero no se limitan a, los de tipo salvaje *Taq* polimerasa y polimerasas modificadas o diseñadas, que incluyen, pero no se limitan a, las disponibles de proveedores comerciales como, por ejemplo, New England Biolabs (Ipswich, MA), Life Technologies (Carlsbad, CA), Sigma Aldrich (St. Louis, MO) y Kapa Biosystems, Inc. (Wilmington, MA) tal como, por ejemplo, KAPA2G DNA Polymerases.

Varios ensayos de PCR en tiempo real encuentran uso en el diagnóstico clínico, que incluyen la detección de un ácido nucleico diana de un agente infeccioso. Como se usa en la presente descripción, un "agente infeccioso" incluye cualquier patógeno biológico que pueda infectar a un hospedero, donde dichos patógenos tienen un componente de ácido nucleico, por ejemplo, un genoma de ácido nucleico, que puede detectarse, denominado en la presente descripción como "ácido nucleico diana" en un ensayo como se describe en la presente descripción. Como tales agentes infecciosos de la presente descripción variarán y pueden incluir, pero no se limitan a, por ejemplo, parásitos, bacterias, levaduras, hongos, virus y similares. Los presentes métodos y sistemas pueden aplicarse a cualquier agente infeccioso que tenga un componente de ácido nucleico que pueda detectarse mediante métodos de PCR, incluida la PCR en tiempo real y la PCR de transcripción inversa (RT), incluida la RT-PCR en tiempo real. Como tal, un ácido nucleico diana de un agente infeccioso puede ser ADN o ARN, que incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, ADN monocatenario, ADN bicatenario, ARN monocatenario, ARN bicatenario y similares.

Los métodos y sistemas de ensayo múltiple encuentran uso en la detección automatizada de ácidos nucleicos diana para una pluralidad de ensayos diferentes, que incluyen múltiples ensayos diferentes de detección de ácido nucleico clínicamente relevantes. En algunos casos, los métodos de ensayo múltiple pueden aplicar varios ensayos diferentes a una sola muestra biológica, por ejemplo, cuando una sola muestra se divide en alícuotas y cada alícuota se aplica a dos o más ensayos diferentes de detección de ácido nucleico. En algunos casos, los métodos de ensayo múltiple pueden aplicar múltiples ensayos diferentes a diferentes muestras biológicas, por ejemplo, donde diferentes muestras biológicas pueden derivarse de diferentes tejidos de un solo sujeto, derivarse del sujeto en diferentes momentos, derivarse de diferentes sujetos, etc.

En algunos casos, los métodos y sistemas como se describe en la presente descripción implican la detección simultánea, sincrónica o superpuesta de una pluralidad de ácidos nucleicos diana derivados de un organismo. Los

organismos de los que pueden derivarse los ácidos nucleicos diana incluyen organismos clínicamente relevantes y no clínicamente relevantes. Los organismos clínicamente no relevantes pueden incluir, por ejemplo, organismos útiles en aplicaciones de investigación, organismos útiles en aplicaciones industriales, organismos útiles en aplicaciones agrícolas, organismos de interés ambiental, etc.

5 En algunos casos, un método de procesamiento, análisis o detección de ensayo múltiple puede encontrar uso en el procesamiento, análisis o detección simultáneos o sincrónicos o superpuestos de una pluralidad de ácidos nucleicos diana clínicamente relevantes que incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, ácidos nucleicos diana derivados o que se originan de uno o más patógenos clínicamente relevantes como, por ejemplo, *Acinetobacter baumannii*,
10 *Acinetobacter lwoffii*, *Acinetobacter* spp. (incl. MDR), *Actinomycetes*, *Adenovirus*, *Aeromonas* spp., *Alcaligenes faecalis*, *Alcaligenes* spp./*Achromobacter* spp., *Alcaligenes xylosoxidans* (incluida ESBL/MRGN), *Arbovirus*, *Aspergillus* spp., *Astrovirus*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacteriodes fragilis*, *Bartonella quintana*, *Bordetella pertussis*, *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia recurrentis*, *Brevundimonas diminuta*, *Brevundimonas vesicularis*, *Brucella* spp., *Burkholderia cepacia* (incl. MDR), *Burkholderia mallei*, *Burkholderia pseudomallei*,
15 *Campylobacter jejuni/coli*, *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Chikungunya virus* (CHIKV), *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia trachomatis*, *Citrobacter* spp., *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Coronavirus* (incl. SARS- y MERS-CoV), *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Corynebacterium* spp., *Corynebacterium ulcerans*, *Coxiella burnetii*, *Coxsackievirus*, *Virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo*, *Cryptococcus neoformans*, *Cryptosporidium hominis*, *Cryptosporidium parvum*, *Cyclospora cayentanensis*, *Citomegalovirus* (CMV),
20 *Virus del dengue*, *virus del Ébola*, *Echovirus*, *Entamoeba histolytica*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae* (incl. ESBL/MRGN), *Enterococcus faecalis* (incl. VRE), *Enterococcus faecium* (incl. VRE), *Enterococcus hirae*, *Epidermophyton* spp., *Epstein-Barr* (EBV), *Escherichia coli* (incl. EHEC, EPEC, ETEC, EIEC, EAEC, ESBL/MRGN, DAEC), *Virus de la fiebre aftosa* (FMDV), *Francisella tularensis*, *Giardia lamblia*, *Haemophilus influenzae*, *Hantavirus*,
25 *Helicobacter pylori*, *helmintos* (gusanos), *virus de la hepatitis A* (VHA), *virus de la hepatitis B* (VHB), *virus de la hepatitis C* (VHC), *virus de la hepatitis D*, *virus de la hepatitis E*, *virus del herpes simple* (VHS), *Histoplasma capsulatum*, *enterovirus humano 71*, *Herpesvirus humano 6* (HHV-6), *Herpesvirus humano 7* (HHV-7), *Herpesvirus humano 8* (HHV-8), *Virus de la inmunodeficiencia humana* (VIH), *Metapneumovirus humano*, *Virus del papiloma humano*, *Virus de la influenza*, *Klebsiella granulomatis*, *Klebsiella oxytoca* (incluido ESBL/MRGN), *Klebsiella pneumoniae* MDR (incl. ESBL/MRGN), *virus Lassa*, *Leclercia adecarboxylata*, *Legionella pneumophila*, *Leishmania* spp., *Leptospira interrogans*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Listeria monocytogenes*, *virus de Marburg*, *virus del sarampión*,
30 *Micrococcus luteus*, *Microsporium* spp., *Molluscipoxvirus*, *Morganella* spp., *Virus de las paperas*, *Mycobacterium chimaera* Myco, *Mycobacterium leprae* Myco, *Mycobacterium tuberculosis* (incl. MDR), *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Norovirus*, *Orientia tsutsugamushi*, *Pantoea agglomerans*, *Virus de la parainfluenza*, *Parvovirus*, *Pediculus humanus capitis*, *Pediculus humanus corporis*,
35 *Plasmodium* spp., *Pneumocystis jiroveci*, *Poliovirus*, *Polyomavirus*, *Proteus mirabilis* (incl. ESBL/MRGN), *Proteus vulgaris*, *Providencia rettgeri*, *Providencia stuartii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas* spp., *Virus de la rabia*, *Ralstonia* spp., *Virus sincitial respiratorio* (VSR), *Rinovirus*, *Rickettsia prowazekii*, *Rickettsia typhi*, *Roseomonas gilardii*, *rotavirus*, *virus de la rubéola*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella paratyphi*, *Salmonella* spp., *Salmonella typhimurium*,
40 *Sarcoptes scabiei* (ácaro del picor), *Sapovirus*, *Serratia marcescens* (incl. ESBL/MRGN), *Shigella sonnei*, especies de *Sphingomonas*, *Staphylococcus aureus* (incl. MRSA, VRSA), *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus epidermidis* (incl. MRSE), *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* (incluido PRSP), *Streptococcus* spp., *virus TBE*, *Toxoplasma gondii*, *Treponema pallidum*, *Trichinella spiralis*, *Trichomonas vaginalis*, *Trichophyton* spp., *Trichosporon* spp., *Trypanosoma brucei gambiense*, *Trypanosoma brucei rhodesiense*,
45 *Trypanosoma cruzi*, *virus vaccinia*, *varicela virus zoster*, *virus Variola*, *Vibrio cholerae*, *virus del Nilo Occidental* (WNV), *virus de la fiebre amarilla*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *virus Zika* y similares.

50 En algunos casos, un método de procesamiento, análisis o detección de ensayo múltiple puede encontrar uso en el procesamiento, análisis o detección simultáneos, sincrónica o superpuestos de una pluralidad de ácidos nucleicos diana clínicamente relevantes que incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, ácidos nucleicos diana derivados o procedente de una o más bacterias patógenas clínicamente relevantes como, por ejemplo, *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bartonella henselae*, *Bartonella quintana*, *Bordetella pertussis*, *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia garinii*, *Borrelia afzelii*, *Borrelia recurrentis*, *Brucella abortus*, *Brucella canis*, *Brucella melitensis*, *Brucella suis*, *Campylobacter jejuni*,
55 *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia psittaci*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Francisella tularensis*, *Haemophilus influenzae*, *Helicobacter pylori*, *Legionella pneumophila*, *Leptospira interrogans*, *Leptospira santarosai*, *Leptospira weilii*, *Leptospira noguchii*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium ulcerans*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Rickettsia rickettsii*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*,
60 *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Treponema pallidum*, *Ureaplasma urealyticum*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia pestis*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, etc.

65 En algunos casos, un método de procesamiento, análisis o detección de ensayo múltiple puede encontrar uso en el procesamiento, análisis o detección simultáneos, sincrónica o superpuestos de una pluralidad de ácidos nucleicos

diana clínicamente relevantes que incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, ácidos nucleicos diana derivados o que se originan a partir de uno o más protozoos patógenos clínicamente relevantes como, por ejemplo, parásitos protozoarios que incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Babesia B. divergens*, *B. bigemina*, *B. equi*, *B. microfti*, *B. duncani*, *Balantidium coli*, *Blastocystis* spp., *Cryptosporidium* spp.,

5 *Cyclospora cayetanensis*, *Dientamoeba fragilis*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Isospora belli*, *Leishmania* spp., *Plasmodium falciparum* (80% de los casos), *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale curtisi*, *Plasmodium ovale wallikeri*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium knowlesi*, *Rhinosporidium seeberi*, *Sarcocystis bovis*, *Sarcocystis suis*, *Toxoplasma gondii*, *Trichomonas vaginalis*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, etc.

10 En algunos casos, un método de procesamiento, análisis o detección de ensayo múltiple puede encontrar uso en el procesamiento, análisis o detección simultáneos, sincrónico o superpuestos de una pluralidad de ácidos nucleicos diana clínicamente relevantes que incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, ácidos nucleicos diana derivados o que se originan a partir de uno o más gusanos patógenos clínicamente relevantes como, por ejemplo, parásitos helmintos, que incluyen, pero no se limitan a, Cestoda, *Taenia multiceps*, *Diphyllobothrium latum*, *Echinococcus granulosus*,

15 *Echinococcus multilocularis*, *E. vogeli*, *E. oligarthrus*, *Taenia saginata*, *Taenia solium*, *Bertiella mucronata*, *Bertiella studeri*, *Spirometra erinaceieuropaei*, etc.

En algunos casos, un método de procesamiento, análisis o detección de ensayo múltiple puede encontrar uso en el procesamiento, análisis o detección simultáneos, sincrónico o superpuestos de una pluralidad de ácidos nucleicos diana clínicamente relevantes que incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, ácidos nucleicos diana derivados o que se origina a partir de uno o más trematodos clínicamente relevantes que incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, *Clonorchis sinensis*; *Clonorchis viverrini*, *Dicrocoelium dendriticum*, *Metagonimus yokogawai*, *Metorchis conjunctus*, *Opisthorchis viverrini*, *Opisthorchis felinus*, *Clonorchis sinensis*, *Paragonimus westermani*; *Paragonimus africanus*; *Paragonimus caliensis*; *Paragonimus kellicotti*; *Paragonimus skrjabini*; *Paragonimus uterobilateralis*, *Schistosoma* sp.,

20 *Schistosoma mansoni* y *Schistosoma intercalatum*, *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma mekongi*, *Echinostoma echinatum*, *Trichobilharzia regenti*, *Schistosomatidae*, etc.

En algunos casos, un método de procesamiento, análisis o detección de ensayo múltiple puede encontrar uso en el procesamiento, análisis o detección simultáneos, sincrónico o superpuestos de una pluralidad de ácidos nucleicos diana clínicamente relevantes que incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, ácidos nucleicos diana derivados o que se originan de uno o más gusanos redondos clínicamente relevantes que incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, *Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus*, *Angiostrongylus costaricensis*, *Ascaris* sp. *Ascaris lumbricoides*, *Baylisascaris procyonis*, *Brugia malayi*, *Brugia timori*, *Diectophyme renale*, *Dracunculus medinensis*, *Enterobius vermicularis*, *Enterobius gregorii*, *Halicephalobus gingivalis*, *Loa* *gingivales* *filaria*, *Mansonella streptocerca*,

30 *Onchocerca volvulus*, *Strongyloides stercoralis*, *Thelazia californiensis*, *Thelazia callipaeda*, *Toxocara canis*, *Toxocara cati*, *Trichinella spiralis*, *Trichinella britovi*, *Trichinella nelsoni*, *Trichinella nativa*, *Trichuris trichiura*, *Trichuris vulpis*, *Wuchereria bancrofti*, etc.

En algunos casos, un método de procesamiento, análisis o detección de ensayo múltiple puede encontrar uso en el procesamiento, análisis o detección simultáneos, sincrónico o superpuestos de una pluralidad de ácidos nucleicos diana clínicamente relevantes que incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, ácidos nucleicos diana derivados o que se originan de uno o más parásitos relevantes, que incluyen, pero no se limitan a, *Archiacanthocephala*, *Moniliformis moniliformis*, *Linguatula serrata*, *Oestroidea*, *Calliphoridae*, *Sarcophagidae*, *Tunga penetrans*, *Dermatobia hominis*, *Acari*, *Cimicidae* *Cimex lectularius*, *Pediculus humanus*, *Pediculus humanus corporis*, *Pthirus pubis*, *Demodex folliculorum/brevis/canis*, *Sarcoptes scabiei*, *Cochliomyia hominivorax*, *Pulex irritans*, *Arachnida Ixodidae* y *Argasidae*, etc.

40 En algunos casos, un método de procesamiento, análisis o detección de ensayo múltiple de la presente descripción puede incluir cualquier combinación de ensayos que incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, cualquier combinación de ensayos para detectar un ácido nucleico diana derivado de cualquier combinación de los organismos descritos en la presente descripción.

Un método de procesamiento, análisis y/o detección de ensayo múltiple de la presente descripción puede incluir cualquier combinación de ensayos que incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, cualquier combinación de ensayos para detectar un ácido nucleico diana derivado de cualquier combinación de los organismos descritos en la presente descripción.

50 En algunos casos, un método de procesamiento, análisis y/o detección de ensayo múltiple de la presente descripción puede incluir una combinación de ensayos para detectar dos o más ácido nucleicos diana de o derivados de VIH, VHC, VHB, CT/NG (*Chlamydia trachomatis* (CT)/*Neisseria gonorrhoeae* (NG)) y VPH.

55 En algunos casos, un método de procesamiento, análisis y/o detección de ensayo múltiple de la presente descripción puede incluir una combinación de ensayos para detectar dos o más ácido nucleico diana de o derivados de CMV, EBV, virus BK, MRSA, C. Diff. (*Clostridium difficile*) y VRE.

En algunos casos, un método de procesamiento, análisis y/o detección de ensayo múltiple de la presente descripción puede incluir una combinación de ensayos para detectar dos o más ácido nucleico diana de o derivados de Adenovirus, TB, VZV (virus de la varicela-zóster), VHS, virus JC y Enterovirus.

60 En algunos casos, un método de procesamiento, análisis y/o detección de ensayo múltiple de la presente descripción puede incluir una combinación de ensayos para detectar dos o más ácido nucleico diana de o derivados de Adenovirus, TB, VZV (virus de la varicela-zóster), VHS, virus JC y Enterovirus.

65 En algunos casos, un método de procesamiento, análisis y/o detección de ensayo múltiple de la presente descripción puede incluir una combinación de ensayos para detectar dos o más ácido nucleico diana de o derivados de LGV

(linfogranuloma venéreo), uno o más virus del Panel viral respiratorio (RVP; metapneumovirus humano (hMPV), rinovirus, influenza A, influenza A subtipo H1, influenza A subtipo H3, influenza B, virus sincitial respiratorio (RSV) A, virus sincitial respiratorio (RSV) B, virus parainfluenza 1, Virus de la parainfluenza 2, virus de la parainfluenza 3, adenovirus), HHV6 (herpesvirus humano 6), Trich/Myco (Trichomonas (Trich)/Mycoplasma (Myc)) y Norovirus.

En algunos casos, un método de procesamiento, análisis y/o detección de ensayo múltiple de la presente descripción puede incluir una combinación de ensayos para detectar dos o más ácido nucleico diana de o derivados de VIH, VHC, VHB, CT/NG, VPH, CMV, EBV, BK, MRSA, C. Dif. VRE, Adenovirus, TB, VZV, HSV, JC, Enterovirus, LGV, RVP, HHV6, Trich/Myco y Norovirus.

En modalidades, de la presente descripción, un método incluye procesar múltiples ensayos de acuerdo con la etapa de procesamiento y/o análisis más larga requerida para cada ensayo en particular. Por ejemplo, un método de procesamiento de ensayo múltiple incluye preparar un cartucho de unidad de procesamiento de muestra (SPU) durante un período de tiempo correspondiente a la etapa de preparación del cartucho de SPU más larga requerida para todos los ensayos de la pluralidad. Una etapa de preparación de un cartucho de SPU como se describe en la presente descripción, puede incluir la distribución en alícuotas de los reactivos necesarios en los pocillos de procesamiento de muestras de un recipiente de múltiples pocillos en preparación para el procesamiento de muestras, por ejemplo, lisis y extracción de ácidos nucleicos. Las etapas de preparación del cartucho de SPU para ensayos diferentes variarán, por ejemplo, porque ciertos ensayos pueden requerir más o menos reactivos que otro ensayo.

El método de procesamiento de ensayo múltiple incluye una etapa de carga de muestra que se realiza durante un período de tiempo correspondiente a la etapa de carga de muestra más larga requerido para todos los ensayos de la pluralidad. Una etapa de carga de muestra, como se describen en la presente descripción, puede incluir la carga de la muestra en el cartucho SPU de un ensayo particular. Las etapas de carga de la muestra pueden variar, por ejemplo, porque un ensayo en particular puede requerir más o menos muestra que otro ensayo.

El método de procesamiento de ensayo múltiple incluye una etapa de procesamiento de la muestra (por ejemplo, realizada por un módulo SPU) que se realiza durante un período de tiempo correspondiente a la etapa de procesamiento de muestra más larga requerida para todos los ensayos de la pluralidad. Las etapas de procesamiento de muestras incluyen, pero no se limitan a, la lisis de la muestra (incluidos los componentes químicos, físicos y/o temporales de la misma), las etapas de lavado (incluidas, entre otras, uno o más etapas de lavado, incluida una etapa de lavado, dos etapas de lavado, tres etapas de lavado, etc.), elución de ácido nucleico, etc. La duración de las etapas de procesamiento de muestras para ensayos diferentes variará por numerosas razones que incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, porque puede requerirse un tiempo de lisis más largo o más corto para un organismo o célula en particular del que se va a extraer el ácido nucleico, porque más o menos se requieren etapas de lavado para limpiar suficientemente el ácido nucleico extraído antes de la amplificación y detección, porque los tiempos de elución pueden variar, etc.

El método de procesamiento de ensayo múltiple incluye una etapa de análisis y amplificación de ácido nucleico que se realiza durante un período de tiempo correspondiente a la etapa de análisis y amplificación de ácido nucleico más larga requerida para todos los ensayos de la pluralidad. Las etapas de análisis y amplificación de ácido nucleico, como se describen en la presente descripción, generalmente se referirán, pero no se limitan a, las etapas de análisis y amplificación por PCR en tiempo real. El período de tiempo necesario requerido para la amplificación y el análisis de ácido nucleico para un ensayo en particular variará por numerosas razones que incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, la cantidad inicial probable de ácido nucleico diana, la eficiencia de hibridación de los cebadores particulares del ensayo, la longitud del amplicón, la cantidad de amplificación requerida para una detección suficiente, etc.

Las diferentes etapas de un método de procesamiento de ensayo múltiple pueden representar operaciones atómicas, donde a una operación atómica en un instrumento de procesamiento de ensayo múltiple se le puede asignar una cantidad fija de tiempo en un protocolo simultáneo. La duración de la operación atómica para varias etapas en un ensayo (por ejemplo, etapas de carga de muestras, etapas de procesamiento de muestras, etapas de amplificación y análisis de ácido nucleico, etc.) puede determinarse mediante comparación del tiempo requerido para completar la etapa particular para cada uno de los diversos ensayos e identificar la que requiere la mayor cantidad de tiempo en todos los ensayos. En consecuencia, varias etapas de un protocolo simultáneo de sujeto pueden denominarse en la presente descripción, en algunos casos, como operaciones atómicas.

En algunas modalidades, la etapa de análisis de la etapa de amplificación y análisis se estandariza entre ensayos. Por ejemplo, un método de análisis de ensayo múltiple (por ejemplo, cuantificación) puede incluir explorar con un detector óptico a intervalos regulares, por ejemplo, donde el intervalo se establece y no varía ni durante la amplificación ni entre ensayos. En tales casos, el protocolo de amplificación de ácido nucleico usado puede considerarse como un único protocolo en el que las características invariables del protocolo incluyen la frecuencia de exploración y la duración total de la amplificación. Sin embargo, otros componentes del protocolo de amplificación (por ejemplo, los tiempos de hibridación, los tiempos de rampa, los tiempos de fusión, la temperatura de hibridación, la temperatura de fusión, etc.) no necesitan fijarse y pueden variar de un ensayo a otro, siempre que los puntos de tiempo de medición sean comunes y puedan alinearse lo suficiente para la cuantificación de la amplificación de ácido nucleico en cada ensayo.

Los puntos de tiempo de medición comunes pueden alinearse, por ejemplo, mediante el escalonado del inicio (por ejemplo, retrasar el inicio de un segundo ensayo después de que haya comenzado un primer ensayo) de manera que los protocolos de ensayo se alineen con el dispositivo de exploración óptico en puntos casi equivalentes en la reacción de amplificación. Por ejemplo, en algunos casos, los inicios de los ensayos pueden escalonarse de manera que, en el momento en que pasa el dispositivo de exploración óptico, cada ensayo se encuentra en un punto casi equivalente en la reacción de amplificación. El punto casi equivalente deseado variará y puede incluir, por ejemplo, el final de la etapa de hibridación, el comienzo de una etapa de rampa, etc.

En algunos casos, no es necesario escalonar el inicio de los protocolos de amplificación en recipientes de reacción espaciados. Por ejemplo, en algunos casos, la velocidad de exploración de una unidad de análisis es lo suficientemente rápida de manera que los protocolos de amplificación iniciados al mismo tiempo pero realizados en recipientes de reacción separados por cierta distancia puedan explorarse en una sucesión suficientemente rápida para producir mediciones que están esencialmente en el mismo punto de tiempo relativo en el ciclo de amplificación o al menos en puntos de tiempo lo suficientemente cercanos en el ciclo de amplificación para que sean comparables.

En algunos casos, un método de procesamiento de ensayo múltiple puede incluir una etapa de rehidratación que se realiza durante un período de tiempo correspondiente a la etapa de rehidratación más larga requerida para todos los ensayos de la pluralidad. Las etapas de rehidratación incluyen, pero no se limitan a, la rehidratación de reactivos liofilizados (que incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, tampón liofilizado, cebadores liofilizados, dNTP liofilizados, etc.). La duración de las etapas de rehidratación para ensayos diferentes variará por numerosas razones que incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, la cantidad de reactivos que se rehidratarán porque, por ejemplo, ensayos diferentes pueden incluir, por ejemplo, diferentes números o cebadores y/o pares de cebadores, etc.

En algunos casos, un método de procesamiento de ensayo múltiple puede incluir una etapa de pretratamiento que se realiza durante un período de tiempo correspondiente a la etapa de pretratamiento más larga requerida para todos los ensayos de la pluralidad. Las etapas de pretratamiento incluyen, pero no se limitan a, poner en contacto la muestra con una proteasa, por ejemplo, poner en contacto la muestra con una proteasa antes de la lisis de la muestra. La duración de las etapas de pretratamiento para ensayos diferentes variará por numerosas razones que incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, la necesidad de pretratamiento, los reactivos de pretratamiento particulares usados (por ejemplo, la proteasa o proteasas particulares usadas), etc.

En algunos casos, un método de procesamiento de ensayo múltiple puede incluir una etapa de elución que se realiza durante un período de tiempo correspondiente a la etapa de elución más larga requerida para todos los ensayos de la pluralidad. Las etapas de elución incluyen, pero no se limitan al contacto de un soporte sólido (por ejemplo, una perla, una partícula, una membrana, un filtro, etc.) adherido al ácido nucleico de la muestra lisada con una solución de tampón suficiente para disolver y eliminar el ácido nucleico del soporte sólido. La duración de las etapas de elución para ensayos diferentes variará por numerosas razones que incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, la cantidad de ácido nucleico que se espera aislar, las características físicas y/o químicas del ácido nucleico aislado que se espera de la muestra, el tampón de elución usado, etc.

En algunos casos, un método de procesamiento de ensayo múltiple puede incluir uno o más etapas de transferencia de lisis/eluido que se realizan durante períodos de tiempo correspondientes a la etapa de transferencia de lisis/eluido más larga requerida para todos los ensayos de la pluralidad. Las etapas de transferencia de lisis/eluido incluyen, pero no se limitan a, transferir la muestra lisada a un recipiente separado, transferir el eluido a un recipiente separado (por ejemplo, un recipiente de reacción) y/o cualquier etapa de movimiento físico requerido por un dispositivo para lograr tales procesos. La duración de las etapas de transferencia de lisis/eluido para ensayos diferentes variará por numerosas razones que incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, la cantidad de muestra lisada, la cantidad de eluido, etc.

Los métodos de procesamiento y análisis de ensayo múltiple como se describe en la presente descripción proporcionan una programación simplificada (por ejemplo, programación de programas informáticos) de un dispositivo automatizado de procesamiento/análisis de ensayo múltiple al limitar la complejidad de programación para las etapas de los procesos automatizados, que incluyen el procesamiento y análisis de muestras. Los métodos de ensayo múltiple permiten el procesamiento y/o análisis de múltiples ensayos diferentes simultáneamente. Como se describe en la presente descripción, a las etapas correspondientes de ensayos diferentes se les asigna la misma cantidad de tiempo, incluso en los casos en que las etapas correspondientes no requieren la misma cantidad de tiempo en la pluralidad de ensayos. A las etapas correspondientes (por ejemplo, etapa de llenado a granel, etapa de pipeteo, etapa de preparación del cartucho SPU, etapa de adición de muestras, etapa de procesamiento de muestras, etc.) de ensayos diferentes se les puede asignar una cantidad de tiempo fija (por ejemplo, donde la cantidad de tiempo fija corresponde al período de tiempo más largo requerido para la etapa particular de todos los ensayos diferentes).

En algunos casos, los métodos realizados mediante el uso de dispositivos de la presente descripción eliminarán la disputa de recursos que resulta de la limitación de recursos del dispositivo. Un dispositivo de la presente descripción puede incluir un recurso limitante que se utiliza en más de un proceso del dispositivo de manera que cuando se procesan lotes paralelos, el recurso puede ser necesario, a menos que se tomen precauciones, para dos procesos (es decir, uno en cada lote paralelo) simultáneamente. Los recursos del dispositivo para los cuales la disputa de recursos

es un problema, como se describió en la presente descripción, generalmente incluyen recursos de componentes informáticos del dispositivo como, por ejemplo, componentes robóticos (por ejemplo, robots de manipulación de líquidos (por ejemplo, llenado a granel y/o pipeteo), recipiente (por ejemplo, cartucho SPU y/o recipiente de reacción) robots de transporte, robots de procesamiento de muestras, robots de análisis (por ejemplo, captura de datos), robots de transporte de desechos, y similares). Los recursos del sistema que generalmente no serán un problema en la disputa de recursos, como se describe en la presente descripción, incluyen, por ejemplo, recursos consumibles, tal como, por ejemplo, reactivos, recipientes, etc.

Los métodos de la presente descripción eliminan dicha disputa de recursos mediante el despliegue de un protocolo simultáneo común que incluye uno o más puntos de retardo dentro de o entre las etapas del protocolo. Por ejemplo, en algunos casos, un método de la presente descripción puede incluir un protocolo simultáneo común que incluye un punto de retraso dentro de una etapa de preparación del cartucho SPU o entre una etapa de preparación del cartucho SPU y la siguiente etapa del protocolo. Tal punto de retraso puede ser apropiado cuando, por ejemplo, se utiliza un componente limitador de recursos en la etapa de preparación del cartucho SPU y/o una etapa adyacente del protocolo.

En algunos casos, un método de la presente descripción puede incluir un protocolo simultáneo común que incluye un punto de retardo dentro de una etapa de carga de muestra o entre una etapa de carga de muestra y la siguiente etapa del protocolo. Tal punto de retraso puede ser apropiado cuando, por ejemplo, se utiliza un componente limitador de recursos en la etapa de carga de la muestra y/o una etapa adyacente del protocolo.

En algunos casos, un método de la presente descripción puede incluir un protocolo simultáneo común que incluye un punto de retardo dentro de una etapa de procesamiento de muestras o entre una etapa de procesamiento de muestras y la siguiente etapa del protocolo. Tal punto de retraso puede ser apropiado cuando, por ejemplo, se utiliza un componente limitador de recursos en la etapa de procesamiento de la muestra y/o una etapa adyacente del protocolo.

En algunos casos, un método de la presente descripción puede incluir un protocolo simultáneo común que incluye un punto de retardo dentro de una etapa de amplificación/análisis de ácido nucleico o entre una etapa de amplificación/análisis de ácido nucleico y la siguiente etapa del protocolo. Tal punto de retraso puede ser apropiado cuando, por ejemplo, se utiliza un componente limitador de recursos en la etapa de amplificación/análisis y/o una etapa adyacente del protocolo.

En algunos casos, un método de la presente descripción puede incluir un protocolo simultáneo común que incluye un punto de retraso dentro de una etapa de rehidratación o entre una etapa de rehidratación y la siguiente etapa del protocolo. Tal punto de retraso puede ser apropiado cuando, por ejemplo, se utiliza un componente limitador de recursos en la etapa de rehidratación y/o una etapa adyacente del protocolo.

En algunos casos, un método de la presente descripción puede incluir un protocolo simultáneo común que incluye un punto de retardo dentro de una etapa de pretratamiento o entre una etapa de pretratamiento y la siguiente etapa del protocolo. Tal punto de retraso puede ser apropiado cuando, por ejemplo, se utiliza un componente limitador de recursos en la etapa de pretratamiento y/o una etapa adyacente del protocolo.

En algunos casos, un método de la presente descripción puede incluir un protocolo simultáneo común que incluye un punto de retardo dentro de una etapa de elución o entre una etapa de elución y la siguiente etapa del protocolo. Tal punto de retraso puede ser apropiado cuando, por ejemplo, se utiliza un componente limitador de recursos en la etapa de elución y/o una etapa adyacente del protocolo.

En algunos casos, un método de la presente descripción puede incluir un protocolo simultáneo común que incluye un punto de retardo dentro de una o más etapas de transferencia de lisis/eluido o entre una o más etapas de transferencia de lisis/eluido y una siguiente etapa del protocolo. Tal punto de retraso puede ser apropiado cuando, por ejemplo, se utiliza un componente limitador de recursos en una o más etapas de transferencia de lisis/eluido y/o una etapa adyacente del protocolo.

Un protocolo convencional de análisis/procesamiento de muestras que no emplea los métodos la presente descripción pero que usa un dispositivo automatizado que está sujeto a la disputa de recursos se representa en el árbol de decisión de la Figura 5. Como se muestra, una vez que se inicia el proceso de muestra, cada etapa de procesamiento está precedida por una decisión en la que el dispositivo debe determinar si un recurso necesario para la siguiente etapa está o no disponible. Por ejemplo, antes de iniciar una etapa de llenado a granel, el dispositivo debe determinar si el robot de llenado a granel está o no en uso. Si el robot de llenado a granel está en uso, el dispositivo debe esperar hasta que el robot de llenado a granel esté disponible antes de continuar con la etapa de llenado a granel. De manera similar, antes de realizar la etapa de llenado de la muestra, el dispositivo debe determinar si el robot de manipulación de líquidos está o no en uso. Si el robot de manipulación de líquidos está en uso, el dispositivo debe esperar hasta que el robot de manipulación de líquidos esté disponible antes de continuar con la etapa de llenado de muestras. El requisito de tales decisiones continúa en cada etapa cuando se emplea un recurso limitante. La complejidad de la programación en un sistema de este tipo se amplifica cuando se desean muchos procesos de muestras diferentes y la entrada de nuevas muestras en el sistema es impredecible (como en un laboratorio clínico).

En modalidades de los presentes métodos, los retrasos se configuran en el protocolo en posiciones predeterminadas y definidas. Por ejemplo, como se representa en la Figura 6, se insertan retrasos predeterminados en el protocolo antes o entre las etapas del proceso individual (es decir, se inserta un retraso antes del llenado a granel, se inserta un retraso entre el llenado a granel y el llenado de la muestra, se inserta un retraso entre el llenado de la muestra y el procesamiento de la muestra, etc.). Aunque se representa antes o entre las etapas del protocolo en la Figura 6, tales retrasos también pueden insertarse dentro de una etapa. Tales retrasos no son el resultado de esperar la disponibilidad de un recurso limitante, sino que están diseñados específicamente de manera que los procesos de muestra paralelos no requieran el mismo recurso limitante en un momento dado. A diferencia de esperar la disponibilidad de un recurso limitante como se muestra en la Figura 5, los retrasos de la Figura 6 no se introducen porque está en uso un recurso necesario para la siguiente etapa. En cambio, los retrasos aseguran que no ocurra la disputa de recursos y eliminan así la espera no planificada por la disponibilidad de un recurso limitante. Como tal, no se requieren decisiones de disponibilidad de recursos (es decir, "en uso"). Aunque el ejemplo representado en la Figura 6 presenta un retraso entre cada etapa, el cual no es necesariamente necesario ya que el número de retrasos presentes en un protocolo simultáneo de los presentes métodos puede, como se describe anteriormente, variar en presencia/ausencia, número, frecuencia y duración.

Los métodos simultáneos idealizados (es decir, métodos simultáneos que no toman en cuenta la disputa de recursos o métodos simultáneos realizados en dispositivos configurados sin recursos limitantes) pueden modificarse para incluir una etapa de retardo donde el método se emplea en un dispositivo con recursos limitados. Tales dispositivos incluyen aquellos que tienen uno o más componentes limitantes, incluidos los componentes descritos en la presente descripción. En algunos casos, puede emplearse un método simultáneo modificado para eliminar la disputa de recursos en un dispositivo que tiene, por ejemplo, una pipeta robótica, un robot de llenado a granel, un robot de desechos, un robot de manipulación de cartuchos o un dispositivo que tiene alguna combinación de tales recursos limitantes. Los recursos limitantes tampoco se limitan a los dispositivos que tienen solo uno de un recurso en particular y pueden incluir, por ejemplo, aquellos que tienen dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o incluso diez o más de un recurso en particular siempre que el dispositivo en particular se configura para procesar una cantidad suficiente de lotes para inducir la disputa de recursos.

En algunos casos, el método descrito puede emplearse para completar, desde el principio (es decir, la preparación/aspiración inicial de la muestra) hasta el final (es decir, la adquisición y el almacenamiento/transferencia de datos), hasta 96 operaciones o más en un período de 8 horas, incluidas pero no limitado a, por ejemplo, 108 operaciones o más, 120 operaciones o más, 132 operaciones o más, 144 operaciones o más, 156 operaciones o más, 168 operaciones o más, 180 operaciones o más, 192 operaciones o más, 204 operaciones o más, 216 operaciones o más, 228 operaciones o más, 240 operaciones o más, 252 operaciones o más, 264 operaciones o más, 276 operaciones o más, 288 operaciones o más, 300 operaciones o más, etc., donde por "operación" se entiende un método de análisis y/o detección para un analito de ácido nucleico particular ejecutado en paralelo con al menos otro método de análisis y/o detección para un analito de ácido nucleico diferente (por ejemplo, un ensayo de VIH ejecutado en paralelo con un ensayo de VHC). Tal rendimiento de operación puede lograrse al tener en cuenta la disputa de recursos, incluso, por ejemplo, cuando el dispositivo en cuestión incluye una sola pipeta robótica, un solo robot de llenado a granel, un solo robot de manipulación de desechos, un solo robot de manipulación de cartuchos SPU y cuatro unidades de amplificación/análisis (cada una con doce recipientes de reacción y un solo robot de análisis).

En algunos casos, puede lograrse un rendimiento de hasta 288 operaciones o más por período de 8 horas, al tener en cuenta la disputa de recursos, incluso, por ejemplo, cuando el dispositivo en cuestión incluye una sola pipeta robótica, un solo robot de llenado a granel, un solo robot de manipulación de desechos, un solo robot de manipulación de cartuchos SPU y cuatro unidades de amplificación/análisis (cada una con doce recipientes de reacción y un solo robot de análisis), donde una operación incluye un método de análisis y/o detección para un analito de ácido nucleico en particular ejecutado en paralelo con al menos otros dos métodos de análisis y/o detección para diferentes analitos de ácido nucleico.

Además, un experto en la materia comprenderá fácilmente que la adición de recursos limitantes particulares a un dispositivo para el que se ha diseñado un protocolo simultáneo común para eliminar la disputa de recursos puede permitir la modificación del protocolo simultáneo común, por ejemplo, para disminuir la cadencia. Por ejemplo, cuando un recurso en particular es limitante y se configura un protocolo simultáneo común para eliminar la disputa del recurso, cuando se añade un duplicado del recurso limitante al dispositivo, el protocolo simultáneo común puede modificarse, por ejemplo, mediante la eliminación de una o más etapas de retraso, para acortar la cadencia en comparación con el protocolo simultáneo común inicial. En consecuencia, la presente descripción abarca protocolos simultáneos comunes derivados de la disminución de la limitación de recursos de un dispositivo y la modificación del protocolo simultáneo común, que incluye, por ejemplo, cuando la modificación da como resultado una cadencia que se modifica, por ejemplo, disminuye.

Dispositivos y sistemas

La presente descripción proporciona dispositivos y sistemas, por ejemplo, dispositivos y sistemas automatizados de procesamiento/análisis de ensayo múltiple, que funcionan de acuerdo con los métodos como se describe en la presente descripción. Tales dispositivos y sistemas incluirán una pluralidad de módulos que están coordinados, por

uno o más controladores centralizados, para operar el sistema o dispositivo de acuerdo con los métodos como se describe en la presente descripción.

En algunos casos, un sistema de análisis/procesamiento de ensayo múltiple de la presente descripción incluirá un módulo de preparación de cartuchos de unidad de procesamiento de muestras (SPU), un módulo de carga de muestras, un módulo de procesamiento de muestras (es decir, un módulo SPU) y/o un módulo de amplificación y análisis de ácido nucleico. Tales sistemas generalmente requerirán circuitos de control que estén configurados con programación no transitoria para operar componentes del dispositivo o sistema para realizar un método como se describe en la presente descripción.

En algunos casos, los métodos como se describe en la presente descripción encuentran uso junto con un sistema SPU o un componente del mismo.

En algunos casos, un sistema de análisis/procesamiento de ensayo múltiple de la presente descripción también incluirá un módulo de pipeta (por ejemplo, una pipeta robótica) para realizar diversas funciones de pipeteo automático para uno o más módulos del dispositivo. Por ejemplo, en algunos casos puede usarse una pipeta robótica para rehidratar reactivos liofilizados, como parte de un módulo de preparación de cartuchos SPU, como parte de un módulo de carga de muestras y/o sus combinaciones. En algunos casos, pueden usarse módulos de pipetas separados para una o más funciones del método.

En algunos casos, un sistema de análisis/procesamiento de ensayo múltiple de la presente descripción también incluirá una SPU configurada para pretratar cada muestra antes de procesar la muestra, un módulo de transferencia de líquido y/o un módulo de transferencia de reacción.

Los sistemas automatizados de ensayo múltiple de la presente descripción incluyen un módulo SPU. El módulo SPU generalmente incluirá los componentes necesarios para el llenado de un cartucho SPU, donde un cartucho SPU puede ser un dispositivo de múltiples pocillos que contiene todos o casi todos los reactivos necesarios para el procesamiento de un ensayo como se describe en la presente descripción. En otros casos, un módulo de SPU puede depender de otro componente del sistema, por ejemplo, el módulo de pipetas para el llenado de cartuchos de SPU. Los módulos SPU pueden incluir además componentes para el procesamiento de muestras, que incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, componentes para el pretratamiento de muestras, componentes para la lisis química, enzimática y/o mecánica de muestras, componentes para el lavado de muestras y/o analitos de muestra, componentes para la elución de analitos de ácido nucleico, etc.

Los cartuchos de SPU pueden prepararse en una posición de preparación de cartuchos de SPU. La preparación puede incluir una o más (por ejemplo, 2 o más) posiciones de preparación de cartuchos SPU, donde los cartuchos SPU son transportados a una o más posiciones de preparación de cartuchos SPU por un manipulador robótico de cartuchos SPU. En dependencia de la configuración particular del sistema, los cartuchos SPU transportados a las posiciones de preparación pueden estar vacíos o pueden incluir muestras (por ejemplo, lo que omite la necesidad de una etapa de transferencia de muestras). En algunos casos, un cartucho SPU puede incluir la mayoría, si no todos, los reactivos necesarios para el proceso de preparación de muestras (por ejemplo, con eliminación de la necesidad de más etapas de configuración del cartucho SPU).

Los módulos de carga de muestras de la presente descripción incluyen un robot de manipulación de líquidos (por ejemplo, una pipeta robótica) configurado para aspirar toda o una porción de una muestra y dispensarla en un cartucho SPU de acuerdo con las instrucciones recibidas de la programación. En consecuencia, el módulo de carga de muestras puede controlarse mediante circuitos configurados para controlar los componentes del módulo de un sistema de ensayo múltiple de acuerdo con los métodos descritos en la presente descripción.

Los módulos de procesamiento de muestras de la presente descripción incluyen dispositivos para la manipulación física de muestras requeridas para aislar el ácido nucleico de la muestra. Por ejemplo, en algunos casos, un módulo de procesamiento de muestras puede incluir un émbolo para la agitación física de la muestra para promover la lisis. Un módulo de procesamiento de muestras también puede incluir una varilla magnetizable para usar en la manipulación de perlas magnéticas u otro soporte sólido magnético para el ácido nucleico de la muestra. Por ejemplo, en algunos casos, después de la lisis en el módulo de procesamiento de muestras, pueden usarse perlas o partículas magnéticas para unir el ácido nucleico y las perlas o partículas magnéticas pueden extraerse, con el ácido nucleico, mediante el uso de una varilla magnetizable. En algunos casos, el émbolo puede servir como varilla magnetizable, por ejemplo, mediante la inserción de un imán en el émbolo. El mismo módulo de procesamiento puede incluir además mecanismos para transferir ácido nucleico entre pocillos de lavado, incluso, por ejemplo, cuando la varilla magnetizable o un émbolo magnetizable sirven para tal propósito. Además, el módulo de procesamiento de muestras puede configurarse además para permitir la elución de ácido nucleico de un soporte sólido unido, tal como perlas magnéticas.

En consecuencia, el módulo de procesamiento de muestras puede realizar una variedad de funciones de procesamiento de muestras e incluirá los componentes necesarios para cumplir dichas funciones. Como tal, las funciones individuales de la unidad de procesamiento de muestras (es decir, manipulaciones físicas, lisis, elución, etc.) pueden coordinarse en un protocolo de ensayo múltiple como se describe en la presente descripción donde, por

ejemplo, puede aumentarse la duración de cualquier etapa en particular para que un ensayo en particular coincida con el tiempo requerido para la etapa del ensayo en donde la etapa en particular lleva más tiempo. En algunos casos, solo la duración total de la etapa de procesamiento de la muestra se coordinará en un protocolo de ensayo múltiple que incluye, por ejemplo, las subetapas del procesamiento de la muestra (es decir, manipulaciones físicas, lisis, elución, etc.) pueden no estar coordinados.

Los módulos de amplificación y análisis de ácido nucleico de la presente descripción incluirán generalmente los componentes de un termociclador y un sistema de detección óptica. Cuando se emplee electricidad para controlar los ciclos térmicos, como mínimo, un termociclador útil en la amplificación de ácido nucleico que incluya un bloque térmico, un enfriador termoeléctrico y una unidad de control, tales componentes configurados juntos para regular la temperatura de un recipiente de reacción de manera controlada para hacer circular la reacción a través de múltiples rondas de calentamiento y enfriamiento a través de una serie definida de etapas de temperatura. Un dispositivo de amplificación de ácido nucleico de la presente descripción puede incluir componentes termorreguladores además del bloque térmico y el enfriador termoeléctrico, que incluye, pero no se limita a, por ejemplo, un disipador de calor, un ventilador, un conducto, un respiradero, etc. Dos o más componentes termorreguladores de un dispositivo de amplificación de ácido nucleico generalmente estarán en contacto térmico entre sí.

El componente de análisis de un módulo de amplificación y análisis de ácido nucleico generalmente incluirá dispositivos de análisis de reacciones múltiples configurados para el análisis de múltiples recipientes de reacción de amplificación durante las reacciones de amplificación. Los dispositivos de análisis de reacciones múltiples de la presente descripción permiten el seguimiento de múltiples reacciones de PCR en tiempo real. Tales dispositivos de análisis de reacciones múltiples incluyen componentes ópticos, componentes de transportadores y componentes de procesamiento/detección de señales en donde dichos componentes están configurados para el control frecuente de múltiples recipientes de reacción.

Los dispositivos de análisis de reacciones múltiples de la presente descripción incluyen componentes ópticos suficientes para el análisis óptico de las reacciones de amplificación de ácido nucleico, incluidas las reacciones de PCR en tiempo real, como se describe en la presente descripción. Tales componentes ópticos incluirán componentes de iluminación, que incluyen uno o más componentes de excitación y componentes para recibir la luz emitida desde el recipiente de reacción. En ciertas modalidades, un transportador lineal se empareja con componentes ópticos dispuestos linealmente y recipientes de reacción dispuestos linealmente para permitir la exploración de los componentes ópticos, por medio del transportador, más allá de los recipientes de reacción para mediar en el análisis. Como tal, en algunos casos, el circuito de control se configura para regular la velocidad y/o el intervalo de exploración del detector óptico para operar el sistema de acuerdo con los métodos como se describe en la presente descripción. En algunos casos, la exploración interna es invariable y el circuito de control mantiene una velocidad y/o un intervalo de exploración constantes. En otros casos, el intervalo de exploración es variante.

Los sistemas de la presente descripción pueden incluir varios componentes de manipulación robótica, que incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, un manipulador de cartuchos SPU robótico, un robot de manipulación de líquidos, un robot de llenado a granel, un robot de desechos y similares. Tales componentes robóticos pueden funcionar para distribuir cartuchos SPU a varias ubicaciones a lo largo del sistema, que incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, una estación de llenado a granel, una estación de pipeteo, una estación de llenado de muestras, una estación de procesamiento de muestras, una estación de desechos, etc., de acuerdo con instrucciones recibidas de la programación. En algunos casos, los sistemas de la presente descripción pueden incluir un robot de manipulación de líquidos donde dicho robot puede contener un sistema de pipeteo automático para dispensar y/o aspirar líquidos de acuerdo con las instrucciones recibidas de la programación. En algunos casos, un circuito de control de la presente descripción puede incluir una programación configurada para controlar los componentes de manipulación robótica de acuerdo con los métodos descritos en la presente descripción. En algunos casos, un módulo de transferencia de líquidos puede incluir un robot de manipulación de líquidos configurado para dispensar y/o aspirar líquidos de acuerdo con las instrucciones recibidas de la programación.

Los manipuladores robóticos de la presente descripción no se limitan a aquellos configurados para reubicar cartuchos y líquidos de SPU y también pueden incluir, por ejemplo, un módulo de transferencia de reacción configurado para transferir un recipiente de reacción a otra ubicación, por ejemplo, para transferir desde una ubicación de preparación y/o procesamiento de muestras a una ubicación de amplificación/detección, de acuerdo con las instrucciones recibidas de la programación. En algunos casos, los componentes de un robot de manipulación de líquidos pueden servir para manipular componentes no líquidos, que incluyen, pero no se limitan a, servir como módulo de transferencia de recipientes de reacción.

Como se describe en la presente descripción, los diversos componentes del sistema de análisis/procesamiento de ensayo múltiple pueden configurarse de acuerdo con un método con una pluralidad de etapas que, aunque tienen una duración diferente a medida que avanzan, tienen la misma duración en todos los ensayos e incluyen períodos de retraso dentro de y/o entre las etapas para funcionar como un protocolo simultáneo común para todos los ensayos. Tal procesamiento y análisis coordinados son posibles gracias a la programación de equipos informáticos y/o programas informáticos de los circuitos de control configurados para operar los diversos componentes del sistema de acuerdo con el protocolo unificado. Como tal, el avance de un componente a otro puede preprogramarse. Sin embargo,

en ciertos casos, las etapas y/o procesos pueden requerir entrada, ejecución u otra activación para continuar y, como tal, los componentes del sistema pueden estar en comunicación eléctrica entre sí.

En algunos casos, los componentes de los sistemas como se describió en la presente descripción pueden conectarse por una conexión de datos alámbrica. Cualquier conexión de datos alámbrica adecuada y apropiada puede resultar útil para conectar los componentes de los sistemas descritos, por ejemplo, como se describió en la presente descripción, que incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, cables disponibles comercialmente, tales como un cable USB, un cable coaxial, un cable en serie, un cable C2G o Cat2, un cable Cat5/Cat5e/Cat6/Cat6a, un cable Token Ring (Cat4), un cable VGA, un cable HDMI, un cable RCA, un cable de fibra óptica y similares. En algunos casos, por ejemplo, donde la seguridad de los datos es menos preocupante, pueden emplearse conexiones de datos inalámbricas que incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, conexiones de radiofrecuencia (por ejemplo, redes inalámbricas PAN/LAN/MAN/WAN, conexiones de radio UHF, etc.), una conexión de transmisión de datos por infrarrojos, conexiones de datos ópticas inalámbricas y similares.

En ciertos casos, la programación como se describió en la presente descripción de los sistemas de la presente descripción puede almacenarse en una "memoria" y/o en una memoria legible por ordenador. Como tal, los dispositivos y sistemas de la presente descripción pueden incluir además una memoria que sea capaz de almacenar información de manera que sea accesible y recuperable en una fecha posterior por un ordenador. Puede elegirse cualquier estructura de almacenamiento de datos conveniente, en base a los medios usados para acceder a la información almacenada. En ciertos aspectos, la información puede almacenarse en una "memoria permanente" (es decir, una memoria que no se borra por la terminación del suministro eléctrico a un ordenador o procesador) o una "memoria no permanente". El disco duro, el CD-ROM, el disquete, la unidad flash portátil y el DVD del ordenador son todos ejemplos de memoria permanente. La memoria de acceso aleatorio (RAM) es un ejemplo de memoria no permanente. Un archivo en la memoria permanente puede editarse y reescribirse.

Sustancialmente, cualquier circuito puede configurarse para un arreglo funcional dentro de los dispositivos y sistemas para realizar los métodos descritos en la presente descripción siempre que se sigan las consideraciones descritas. Sin embargo, como se describe en la presente descripción, los sistemas que emplean los presentes métodos generalmente usarán configuraciones de equipos informáticos compatibles con los protocolos de análisis y procesamiento unificado descritos.

La arquitectura de equipos informáticos de tales circuitos, incluye, por ejemplo, un ordenador configurado específicamente, bien conocido por un experto en la técnica, y puede comprender componentes de equipos informáticos que incluyen uno o más procesadores (CPU), una memoria de acceso aleatorio (RAM), una memoria de solo lectura (ROM), un medio de almacenamiento de datos interno o externo (por ejemplo, la unidad de disco duro). Tales circuitos también pueden comprender una o más tarjetas gráficas para procesar y enviar información gráfica a los medios de visualización. Los componentes anteriores pueden interconectarse adecuadamente a través de un bus dentro de los circuitos, por ejemplo, dentro de un ordenador de uso específico. Los circuitos pueden comprender además interfaces adecuadas para comunicarse con componentes externos de propósito general, tal como un monitor, teclado, mouse, red, etc. En algunas modalidades, el circuito puede ser capaz del procesamiento paralelo o puede ser parte de una red configurada para el cálculo paralelo o distributivo para aumentar la potencia de procesamiento para los presentes métodos y programas. En algunas modalidades, el código de programa leído desde el medio de almacenamiento puede escribirse en una memoria proporcionada en una placa expandida insertada en el circuito, o una unidad expandida conectada al circuito, y una CPU o similar proporcionada en la placa expandida o la unidad expandida puede realmente realizar una parte o todas las operaciones de acuerdo con las instrucciones de la programación, para lograr las funciones descritas.

Además de los componentes de los dispositivos y sistemas de la presente descripción, por ejemplo, como se describió anteriormente, los sistemas de la descripción pueden incluir un número de componentes adicionales, tales como dispositivos de salida de datos, por ejemplo, monitores y/o altavoces, dispositivos de entrada de datos, por ejemplo, puertos de interfaz, teclados, etc., componentes accionables, fuentes de energía, etc.

Medio legible por ordenador

La presente descripción incluye un medio legible por ordenador, que incluye un medio legible por ordenador no transitorio, que almacena instrucciones para los métodos descritos en la presente descripción. Los aspectos de la presente descripción incluyen un medio legible por ordenador que almacena instrucciones que, cuando se ejecutan mediante un dispositivo informático, hacen que el dispositivo informático realice una o más de las etapas de un método como se describió en la presente descripción.

En ciertas modalidades, las instrucciones de acuerdo con los métodos descritos en la presente descripción pueden codificarse en un medio legible por ordenador en forma de "programación," donde el término "medio legible por ordenador" como se usa en la presente se refiere a cualquier medio de almacenamiento o transmisión que participa en el suministro de instrucciones y/o datos a un ordenador para su ejecución y/o procesamiento. Ejemplos de medios de almacenamiento incluyen un disquete, disco duro, disco óptico, disco magneto-óptico, CD-ROM, CD-R, cinta magnética, tarjeta de memoria no volátil, ROM, DVD-ROM, disco Blue-ray, disco de estado sólido, y almacenamiento

conectado en red (NAS), ya sea que dichos dispositivos sean internos o externos al ordenador. Un archivo que contiene información puede "almacenarse" en un medio legible por ordenador, donde "almacenar" significa grabar la información de manera que sea accesible y recuperable en una fecha posterior por un ordenador.

El método implementado por ordenador descrito en la presente descripción puede ejecutarse mediante el uso de la programación que puede escribirse en uno o más de cualquier número de lenguajes de programación informáticos. Tales lenguajes incluyen, por ejemplo, Java (Sun Microsystems, Inc., Santa Clara, California), Visual Basic (Microsoft Corp., Redmond, Washington) y C++ (AT&T Corp., Bedminster, Nueva Jersey), así como también muchos otros.

Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración y no por medio de limitación.

Ejemplos

Ejemplo 1: Generación de un protocolo simultáneo común de procesamiento de muestras

El presente ejemplo describe la creación de un único protocolo simultáneo de tiempo de ensayo que armoniza el procesamiento para cada tipo de ensayo en un protocolo de tiempo de ensayo común donde todos los ensayos dan como resultado el mismo tiempo y rendimiento, independientemente del ensayo o combinación de ensayos que estén ejecutándose en el dispositivo automatizado.

La etapa de pipeteo, la etapa de configuración del cartucho SPU, la etapa de adición de muestra, la etapa de pretratamiento, la etapa de transferencia de digestión, la etapa de procesamiento de SPU, la etapa de transferencia de eluato y la etapa de amplificación/detección se determinaron para varios ensayos, incluidos VIH, VHC, CT/NG y VHB. La más larga de cada etapa (es decir, la etapa de pipeteo más larga, la etapa de configuración del cartucho de SPU más larga, la etapa de adición de muestra más larga, la etapa de pretratamiento más larga, la etapa de transferencia de digestión más larga, la etapa de procesamiento de SPU más larga, la etapa de transferencia de eluato más larga y la etapa más larga de amplificación/detección) para cada ensayo se compilaron en un solo protocolo simultáneo idealizado común. La Figura 1 proporciona un ejemplo de cómo se derivó un protocolo simultáneo idealizado de tiempo de ensayo común a partir de varios ensayos (por ejemplo, VIH, VHC, CT/NG y VHB) que tienen etapas y tiempos de procesamiento únicos.

El protocolo simultáneo idealizado de temporización proporcionado en la Figura 1 no tiene en cuenta los recursos limitados de un dispositivo real (por ejemplo, un dispositivo configurado para tener una sola pipeta robótica, un solo robot de llenado a granel, un solo robot de manipulación de desechos, un solo robot de manipulación de cartucho SPU, etc.). Para generar secuencias que permitan la operación en una cantidad de lotes dentro de un sistema simultáneamente mediante el uso de recursos limitados, se usó el protocolo simultáneo idealizado de la Figura 1 como punto de partida y se modificó para eliminar la disputa de recursos. Por ejemplo, la Figura 2 ilustra cómo se procesarían cuatro tipos de ensayos diferentes (VIH, VHC, CT/NG y VHB), mediante el uso de un protocolo simultáneo de tiempo de ensayo común idealizado en un sistema idealizado sin tener en cuenta la disputa de recursos (es decir, si un recurso destinado para todas las etapas de procesamiento enumeradas en la tabla de la figura estaban presentes para cada lote). Sin embargo, si la configuración de la SPU y la adición de muestras usaran el mismo recurso (por ejemplo, una sola pipeta robótica) y/o el procesamiento y pretratamiento de muestras usaran el mismo recurso de muestra (por ejemplo, una sola pipeta robótica), se produciría una disputa de recursos (como se indica en la Figura 2 como flechas verticales) y se requeriría un escalonamiento mucho mayor de las etapas de procesamiento.

En lugar de simplemente restringir el procesamiento por lotes a un protocolo en serie donde la disputa de recursos se alivia al impedir el inicio de un nuevo lote hasta que se complete un lote anterior, el protocolo simultáneo se modificó para incluir una secuencia de demoras insertadas entre y/o dentro de las etapas para generar un protocolo simultáneo común modificado que tiene una cadencia optimizada (es decir, lote por unidad de tiempo) que tiene en cuenta todos los ensayos potenciales que se van a ejecutar en el dispositivo.

Por ejemplo, como se representa en la Figura 3, cuando los recursos son ilimitados ("Caso de recursos ilimitados"), un protocolo simultáneo puede procesar simultáneamente lotes iniciados sucesivamente sin preocuparse por la disputa de recursos. Sin embargo, cuando los recursos son limitantes ("Recursos limitados con disputa de recursos"), por ejemplo, cuando solo hay tres recursos disponibles que realizan la "etapa 2", la disputa de recursos (como se indica con subrayado) ocurre entre, por ejemplo, el tercer y cuarto lote en el inicio de la "etapa dos" del cuarto lote porque el primer lote aún tiene que completar la "etapa 2" y los tres recursos disponibles están ocupados. En el ejemplo "Recursos limitados con disputa de recursos", se observa una mayor disputa de recursos (también indicada en la Figura 3 subrayada) cuando se supone que solo hay un recurso disponible que realiza cada una de las "etapas 1", "etapa 3" y "etapa 5".

Estas disputas de recursos se eliminaron (como se muestra en el panel "Disputas eliminadas" de la Figura 3) mediante el modelado del procesamiento real de un dispositivo con recursos limitados para identificar las disputas de recursos y determinar dónde la adición de puntos de retraso ("Retraso") evitaría dichas disputas de recursos y produciría una cadencia optimizada.

Este protocolo simultáneo común con puntos de retraso añadidos permite el procesamiento/análisis concurrente (simultáneo y/o superpuesto) de ensayos diferentes sin afectar el rendimiento y elimina la disputa de recursos. Además, el protocolo simultáneo permite el inicio de un ensayo diferente adicional o un nuevo lote de un ensayo que ya está en ejecución durante el procesamiento de un ensayo iniciado anteriormente sin afectar el procesamiento de ninguno de los ensayos.

El protocolo simultáneo simplifica aún más la programación de dispositivos automatizados (por ejemplo, programas informáticos) y la operación. Sin embargo, el equipo informático que funcionaba en un dispositivo automatizado que operaba bajo un protocolo simultáneo requería consideraciones de diseño adicionales.

En una modalidad probada, el equipo informático permitió ejecutar 12 ensayos diferentes (cada uno en lotes de 4 muestras cada uno) en cualquier momento en un solo dispositivo sin disputa de recursos, incluso cuando los recursos son limitados (por ejemplo, cuando el dispositivo tiene una sola pipeta robótica, un único robot de llenado a granel, un único robot de manipulación de desechos y un único robot de manipulación de cartuchos SPU). Los tamaños de lote de 4 muestras permiten diferentes atributos de ensayo por grupo de 4 muestras, siempre que el tiempo de procesamiento general sea el mismo para todos los lotes (es decir, todos los lotes se ajustan a la longitud general del protocolo simultáneo común). Por ejemplo, en la preparación de muestras, cada grupo de 4 muestras puede tener un control de temperatura diferente, pero esto no afectará el tiempo total de procesamiento.

El ejemplo descrito de un protocolo simultáneo de temporización de ensayos simplificó la complejidad de programación de la programación informática para un instrumento automatizado que procesa múltiples ensayos diferentes simultáneamente (es decir, en paralelo) ya que a cada etapa de procesamiento/recurso en el sistema (es decir, pipeteo, configuración del cartucho SPU, adición de muestras, etc.) se le asignó una cantidad fija que incluía el tiempo necesario para completar la etapa en el ensayo que requiere más recursos y un retraso añadido adicional para alinear la etapa en una cadencia optimizada que elimina la disputa por recursos compartidos.

Además, para el subsistema de amplificación y detección de esta modalidad, se proporcionó un control térmico independiente para cada conjunto de dos muestras. El sistema usó este control avanzado para retrasar el inicio del protocolo para cada par de muestras subsiguientes con el fin de leer todas las muestras en puntos de tiempo de medición comunes (por ejemplo, lo más cerca posible del mismo tiempo relativo en cada protocolo).

Los protocolos se estructuraron de manera que la amplificación y la detección de cada ensayo se ajustan dentro de un protocolo óptico común (es decir, el protocolo de exploración) de manera que la etapa de exploración pueda llegar a cada ensayo en el momento correcto para realizar una medición. En el ejemplo descrito, la etapa de exploración explora continuamente todos los ensayos (con la opción de pausas o etapas de calibración entre exploraciones) y se capturaron datos particulares para cada ensayo cuando fue relevante. La Figura 4 proporciona un ejemplo de exploración coordinada de este tipo en tres ensayos diferentes (cada uno con un par de recipientes de reacción). Las flechas y las etapas indican cuándo cada ensayo requiere que se realice una exploración. Como puede verse, los tres ensayos no siempre se alinean y solo los datos relevantes para cada ensayo deben escribirse en el archivo de salida y/o usarse en mediciones y análisis posteriores.

La operación simultánea común simplificó significativamente la complejidad de programación del programa informático para el instrumento probado en general. Al tener un protocolo simultáneo común, la programación informática siguió un modelo determinista de cuándo debían ocurrir diferentes actividades para diferentes recursos. En el caso de que una etapa se complete antes de tiempo, el sistema está programado para esperar hasta que finalice el período para continuar con esa etapa. Esta programación estructurada aseguró que no haya disputas por los recursos.

REIVINDICACIONES

1. Un método para el procesamiento de ensayo múltiple llevado a cabo mediante el uso de un sistema automatizado que se configura para llevar a cabo las etapas de:
 - a) preparar un cartucho de unidad de procesamiento de muestra (SPU) para una pluralidad de ensayos diferentes de detección de ácido nucleico diana;
 - b) cargar una muestra en cada cartucho SPU preparado;
 - c) procesar cada cartucho SPU cargado para aislar un ácido nucleico de muestra para cada uno de la pluralidad de ensayos, en donde el método incluye un protocolo simultáneo común que incluye una etapa de retardo dentro de una etapa de procesamiento de muestras o entre una etapa de procesamiento de muestras y la siguiente etapa del protocolo; y
 - d) amplificar y analizar cada ácido nucleico de muestra para un ácido nucleico diana específico para cada uno de la pluralidad de diferentes ensayos de detección del ácido nucleico diana, en donde el método incluye un protocolo simultáneo común que incluye una etapa de retardo dentro de una etapa de amplificación/análisis de ácido nucleico o entre una etapa de amplificación/análisis de ácido nucleico y la siguiente etapa del protocolo; y las etapas a) a la d) se realizan cada una durante un período de tiempo que es igual para la pluralidad de diferentes ensayos de detección de ácido nucleico diana.
- en donde el método comprende determinar, antes del inicio de las etapas a) a la d), las etapas de retardo que se introducirán entre las etapas de ensayo de los protocolos, y en donde la amplificación de cada ácido nucleico de muestra se inicia esencialmente al mismo tiempo; de manera que las etapas de retardo eliminan la disputa de recursos.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el método comprende además la rehidratación de reactivos liofilizados para cada uno de la pluralidad de diferentes ensayos de detección de ácido nucleico diana antes de la preparación, en donde la rehidratación se realiza durante un período de tiempo que es igual para la pluralidad de diferentes ensayos de detección de ácido nucleico diana.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el método comprende una etapa de retardo después de la rehidratación.
4. El método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde el método comprende además el pretratamiento de cada cartucho SPU cargado antes del procesamiento, en donde el pretratamiento se realiza durante un período de tiempo que es igual para la pluralidad de diferentes ensayos de detección de ácido nucleico diana.
5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el método comprende una etapa de retardo después al pretratamiento.
6. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el pretratamiento comprende poner en contacto la muestra con una proteasa.
7. El método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde el procesamiento comprende transferir la muestra a una solución que comprende un tampón de lisis, en donde la transferencia se realiza durante un período de tiempo que es igual para la pluralidad de diferentes ensayos de detección de ácido nucleico diana.
8. El método de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el método comprende una etapa de retardo después a la transferencia.
9. El método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde el procesamiento comprende eluir el ácido nucleico y transferir el ácido nucleico eluido a un recipiente de reacción para amplificarlo y analizarlo, en donde la elución se realiza durante un período de tiempo que es igual para la pluralidad de diferentes ensayos de detección de ácido nucleico diana.
10. El método de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el método comprende una etapa de retardo después de la elución.
11. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde la pluralidad de diferentes ensayos de detección de ácido nucleico diana comprende un ensayo para detectar:
 - a) un ácido nucleico del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH);
 - b) un ácido nucleico del virus de la hepatitis C (VHC);
 - c) un ácido nucleico del virus de la hepatitis B (VHB);
 - d) un ácido nucleico de Chlamydia trachomatis (CT), un ácido nucleico de Neisseria gonorrhoeae (NG) o sus combinaciones;

- e) un ácido nucleico del virus del papiloma humano (HPV);
 - f) un ácido nucleico de citomegalovirus (CMV);
 - g) un ácido nucleico del virus de Epstein-Barr (EBV);
 - h) un ácido nucleico del virus BK;
 - 5 i) un ácido nucleico de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA);
 - j) un ácido nucleico de *Clostridium difficile* (C. Diff.);
 - k) un ácido nucleico de *Enterococcus* resistente a la vancomicina (VRE);
 - l) un ácido nucleico de adenovirus;
 - m) un ácido nucleico de tuberculosis (TB);
 - 10 n) un ácido nucleico del virus de la varicela-zoster (VZV);
 - o) un ácido nucleico del virus del herpes simple (HSV);
 - p) un ácido nucleico del virus JC;
 - q) un ácido nucleico de Enterovirus;
 - r) un ácido nucleico de linfogranuloma venéreo (LGV);
 - 15 s) un ácido nucleico del panel viral respiratorio (RVP);
 - t) un ácido nucleico del virus del herpes humano 6 (HHV6);
 - u) un ácido nucleico de *Trichomonas* (Trich), un ácido nucleico de *Mycoplasma* (Myco) o una de sus combinaciones;
 - v) un ácido nucleico de norovirus; o
 - 20 w) una combinación de cualquiera de a) a v).
12. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde el método procesa 3 o más ensayos diferentes de detección de ácido nucleico diana.
- 25 13. El método de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el método procesa 10 o más ensayos diferentes de detección de ácido nucleico diana.

Figura 1

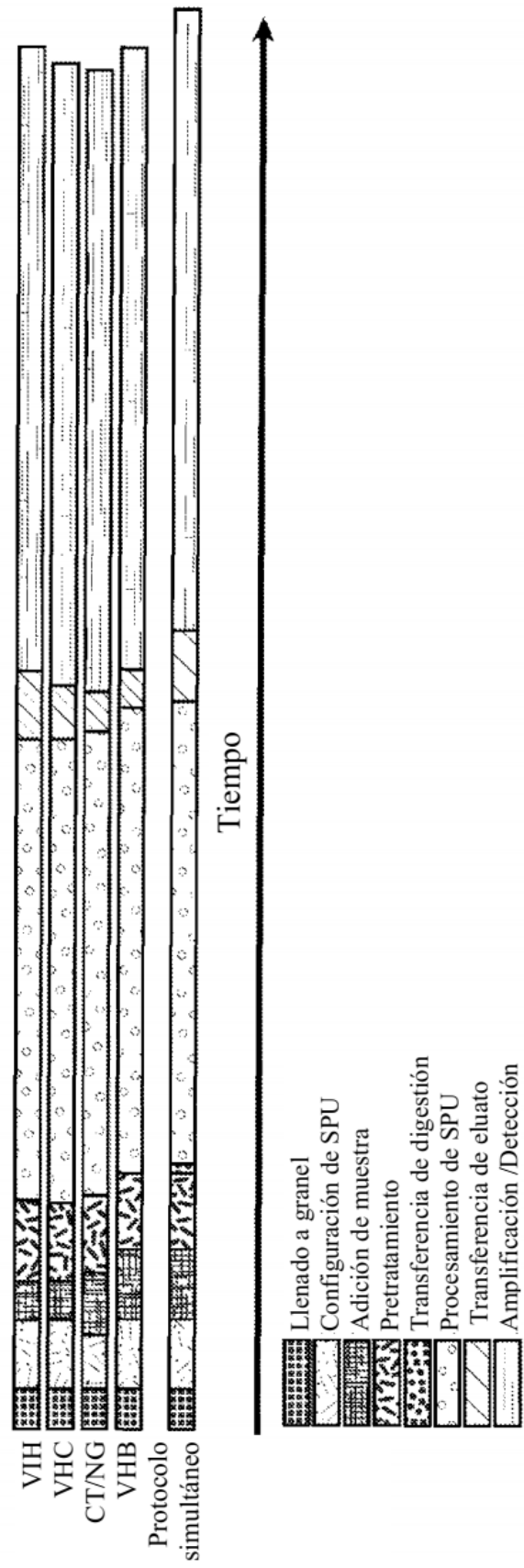


Figura 2

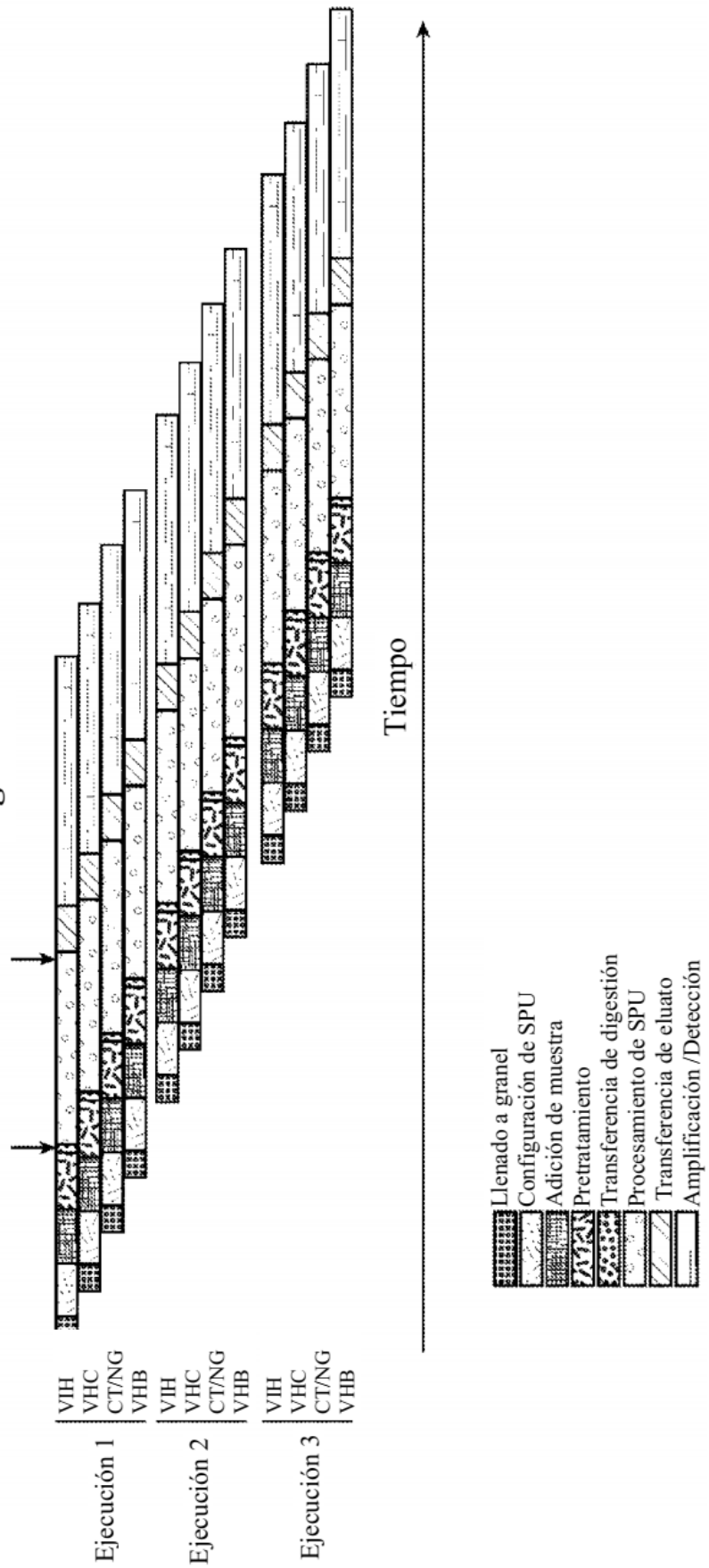
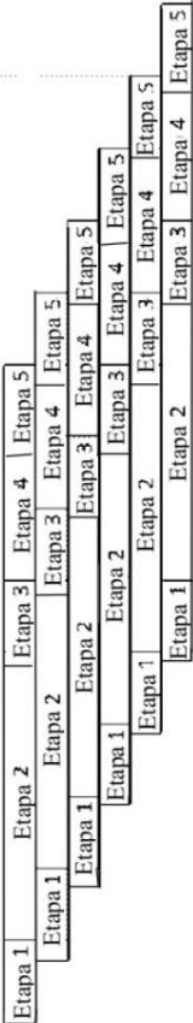


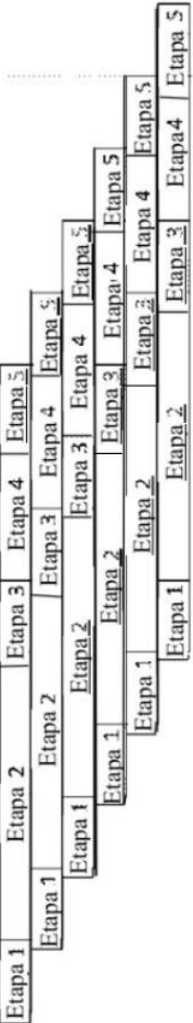
Figura 3

Etapa 1, 3, 5 usan recurso 1
Etapa 2 y 4 usan recurso 2 y 4 respectivamente

Caso de recursos ilimitado



Recursos limitados con disputa de recurso



Disputas eliminadas

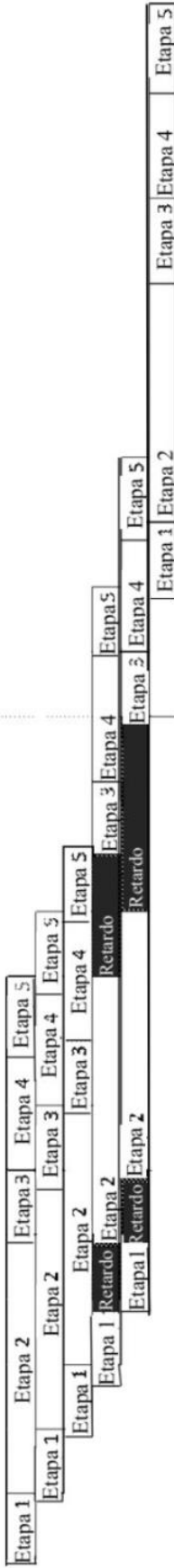


Figura 4

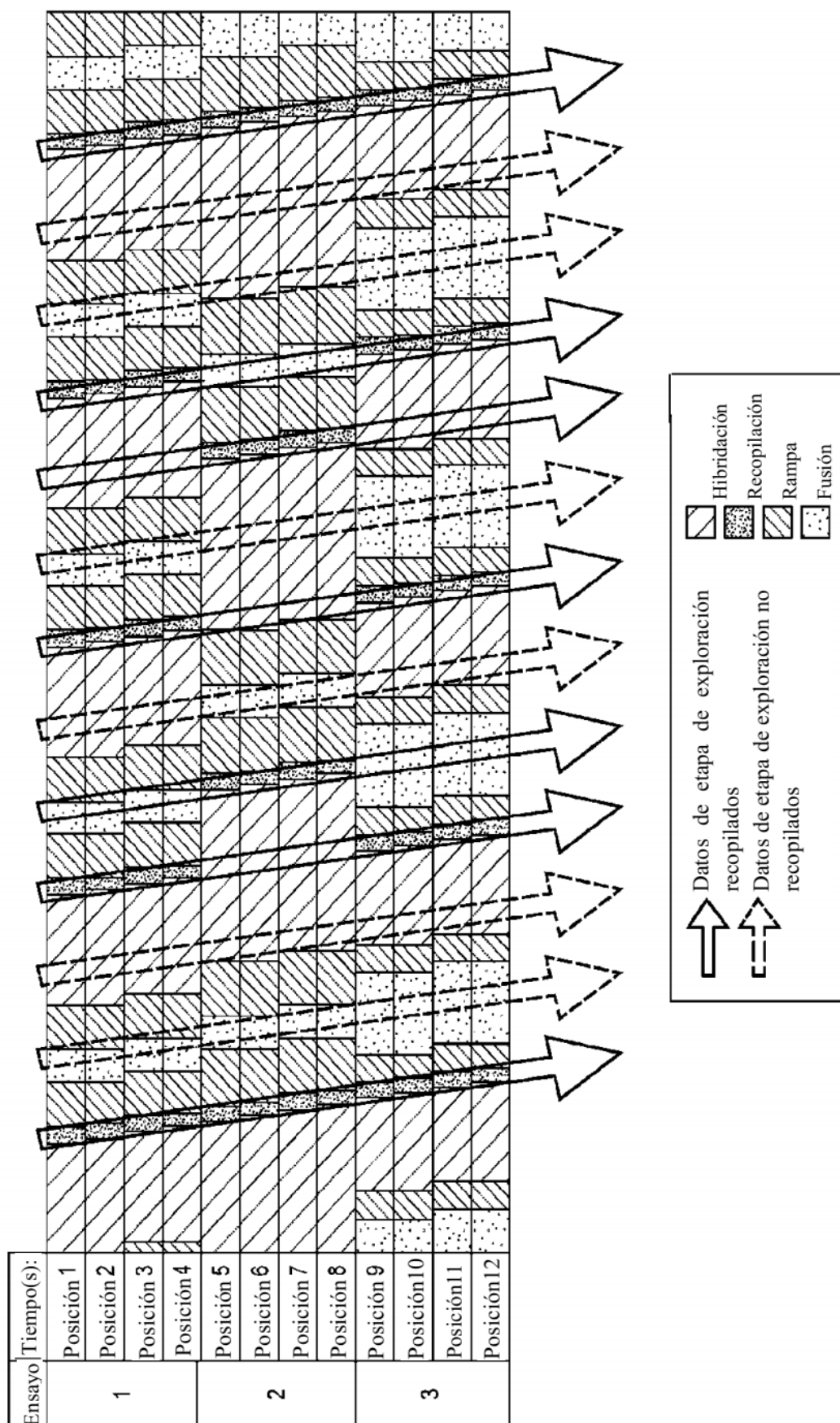


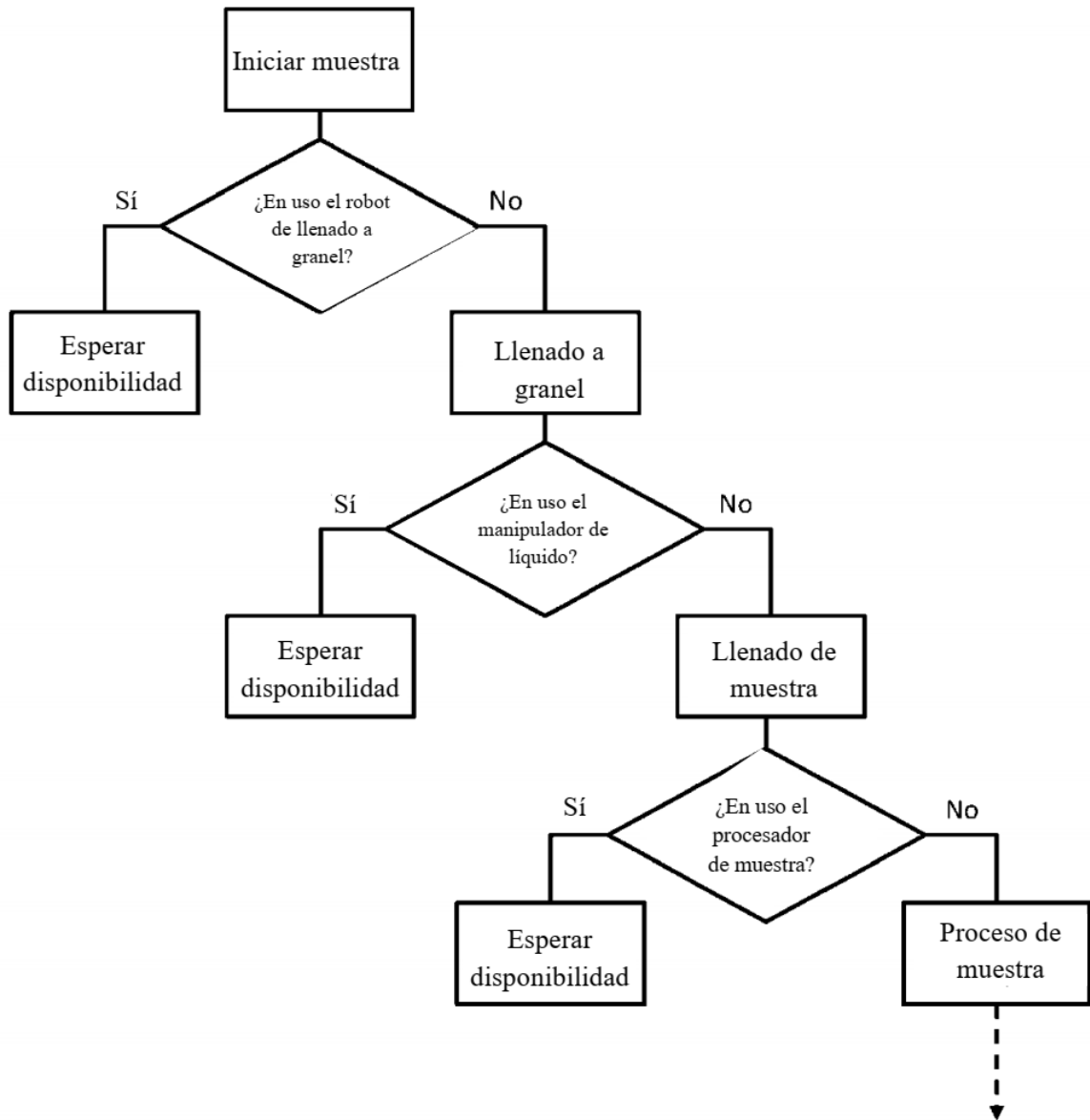
Figura 5

Figura 6

