



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 331 725**

51 Int. Cl.:

B01L 3/02 (2006.01)

G01N 35/10 (2006.01)

G01N 35/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01991877 .0**

96 Fecha de presentación : **21.12.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1349662**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.10.2003**

54

Título: **Procedimiento para evitar contaminaciones de material de muestra negativo mediante muestras que contienen analitos durante el uso de máquinas automáticas de pipeteado.**

30

Prioridad: **21.12.2000 DE 100 64 428**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
14.01.2010

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
14.01.2010

73

Titular/es:
**Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH
Görzhäuser Hof, Emil-von-Behring-Strasse 76
35041 Marburg, DE**

72

Inventor/es: **Krupka, Udo y
Schmandt, Wolfgang**

74

Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 331 725 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).

ES 2 331 725 T3

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para evitar contaminaciones de material de muestra negativo mediante muestras que contienen analitos durante el uso de máquinas automáticas de pipeteado.

5 La invención se refiere a procedimientos para la reducción de la contaminación en vasos de reacción vacíos, o que ya están cargados con un material de muestra exento de analitos o que contiene analitos en concentraciones reducidas, en vasos de reacción dispuestos en proximidad espacial entre sí, durante el suministro con pipeta de muestras o reactivos por medio de un dispensador automático de muestras, así como a medidas que afectan al hardware dirigidas a reducir o eliminar la contaminación.

La invención se ha basado en el dispositivo BEP[®] 2000, de la Compañía Dade Behring, con el que se han llevado también a cabo los ejemplos, si bien los objetos de la presente invención no están limitados a este sistema.

15 El pipeteo automático de muestras a través de los denominados sistemas automáticos de pipeteo (también llamados dispensadores de muestras) se utiliza extensamente en laboratorios de serología humana e instalaciones de investigación en veterinaria, y se emplea en estudios diagnósticos y, más recientemente, también en cuestiones de microbiología/tecnología génica.

20 Para ello, se utilizan dispositivos comerciales, desarrollados especialmente para la dispensación por pipeteo de muestras - *stand-alone-instruments (instrumentos autónomos)* - tales como, por ejemplo, el sistema Mikrolab AT Plus[®], de la Compañía Hamilton, y el procesamiento de ensayos tiene lugar manualmente por separado o con procesadores específicamente concebidos para ellos tales como, por ejemplo, con el sistema BEP III[®] de la Compañía Dade Behring.

25 De forma alternativa, el dispensador de muestras es un componente integral o un módulo de un sistema completamente automatizado, que realiza de manera también automáticamente los subsiguientes procedimientos de ensayo de los analitos que se deben determinar.

30 Ejemplos de los denominados *front-end-instruments (instrumentos de aplicación frontal)* son:

- BN 100[®], de la Compañía Dade Behring Marburg GmbH para determinaciones inmunoquímicas de proteínas del plasma a partir de material de muestras humanas;
- ETI Lab[®], de la Compañía DiaSorin y BEP 2000[®], de la Compañía Dade Behring, para la detección de analitos en el contexto de la serología infecciosa, en base a Ensayos de Inmunoabsorción Ligados a Enzimas (ELISAs).

40 Si bien los métodos de investigación y las aplicaciones diagnósticas de los dos productos mencionados se diferencian considerablemente, la lógica fundamental de ambas instrumentaciones es idéntica. El respectivo sistema automático dispensa las muestras sin diluir o después de una pre-dilución en los vasos de reacción, en los que se lleva a cabo el procedimiento de determinación propiamente dicho también de manera completamente automática tras la adición de componentes inmunológicamente reactivos.

45 En general, como vasos de reacción pueden servir los tubos, las placas de microtitulación y cubetas, entre otros.

Tras la medición del resultado del ensayo (por fotometría, turbidometría, entre otros), mediante criterios de los programas de cálculo predeterminados del software para la validación de la totalidad del ensayo de cada muestra individual con respecto al analito estudiado, éste se clasifica como positivo, negativo o, cuando esté previsto en la definición del ensayo, como valor límite.

55 Analitos pueden ser: proteínas específicas del plasma (por ejemplo, marcadores tumorales), marcadores de fertilidad o suprarrenales (por ejemplo, FSH o Ca 15-9), anticuerpos (por ejemplo, inmunoglobulinas de clase G específicas de la rubéola), antígenos (por ejemplo, antígeno de superficie de la hepatitis B/HbsAg), y otros parámetros conocidos por el especialista.

60 En determinados parámetros resulta importante para el diagnóstico de la indicación o los controles terapéuticos calcular también la concentración cuantitativa o semicuantitativa, lo cual habitualmente también se realiza con ayuda del software. A menudo, la asignación de la expresión de los resultados orientados al paciente (ordenador del dispositivo de análisis, impresión en soporte sólido y/u ordenador central) se lleva a cabo a través de un registro del código de barras del tubo principal de la muestra correspondiente.

65 Si en el proceso de pipeteo se produce realmente la contaminación de vasos de reacción vacíos o cargados ya con un material de muestra exento de analitos, con un material que contiene analitos, estas trazas pueden inducir una falsa reactividad en muestras verdaderamente exentas de analitos. Del mismo modo, en muestras con concentraciones bajas de analitos, la contaminación puede hacer aparecer niveles más elevados de un parámetro determinado.

ES 2 331 725 T3

Las posibles consecuencias de una reacción falsamente positiva de este tipo son múltiples y conocidas, en donde estos efectos pueden manifestarse de forma especialmente impactante en el campo de la serología infecciosa:

- se podría pensar que el paciente dispone de una protección inmunológica inexistente; un resultado falso positivo en la determinación de anticuerpos contra el antígeno del virus de la hepatitis A (anti-HAV) o el antígeno del virus de la hepatitis B (anti-HBs) podría determinar que no se administre la vacunación adecuada;
- en el análisis de parámetros en los bancos de sangre, un índice elevado de resultados falsos positivos retrasaría considerablemente el desbloqueo de las donaciones, puesto que sería necesario volver a analizarlas; aun cuando, por lo general, no son previsibles daños para el receptor de la sangre, el incremento de tiempo y costes es considerable, independientemente del posible disgusto para el donante en caso que se le cite nuevamente para comprobar un falso positivo en el análisis de SIDA (anti-VIH);
- en determinaciones cuantitativas, por ejemplo, de marcadores tumorales con el sistema BN 100[®] o de anticuerpos contra el virus de la rubéola con ETILab[®], se llegaría a conclusiones equivocadas acerca de la terapia a administrar (evolución de los marcadores tumorales en pacientes bajo tratamiento), o de las medidas que se deben instaurar (aumento falso positivo de anticuerpos específicos contra la rubéola en el marco de los controles de la gestación).
- Tanto los efectos de la contaminación como sus posibles consecuencias son conocidos bajo diferentes términos y han sido contrarrestados con las más diversas medidas conocidas por los especialistas para lograr diagnósticos de laboratorio más seguros y obtener ahorros considerables de tiempo y costes para el usuario.

Por desplazamiento o “*carry-over*” se entienden en general, por ejemplo, restos de analitos que quedan adheridos a la superficie interna de puntas de pipeteo o agujas; con el uso de puntas de aguja, por ejemplo, para el uso prolongado en el proceso de pipeteo de muestras resulta posible desplazar los más pequeños restos de muestras que contienen analitos en uno o, incluso, múltiples procesos de pipeteo subsiguientes de las muestras, que o no contienen estos analitos y lo hacen en concentraciones mínimas. La consecuencia de un efecto de este tipo se reconoce porque en uno o, incluso, múltiples vasos de reacción que se hallaban durante el pipeteo situados temporal y, a menudo, también espacialmente después de la muestra que contenía analitos, se miden reactividades falso-positivas. En el caso de múltiples vasos de reacción afectados de forma consecutiva, la difusión disminuye típicamente desde un vaso de reacción hacia el siguiente de manera sistemática.

Hasta la fecha, se considera que una contramedida es eficaz experimentalmente cuando se puede detectar el desplazamiento de una millonésima parte (dilución final de la muestra que contiene analitos de 1:10⁶ en una muestra libre de analitos) en la primera de las muestras que contienen analitos en las posiciones siguientes, sin tener un efecto perjudicial sobre el procedimiento experimental utilizado.

En la actualidad, esto se puede lograr utilizando soluciones de tampones de lavado adecuadas con las que se enjuagan, por ejemplo, las puntas de pipeteo (a menudo, agujas de acero fino) después de cada proceso de pipeteo, para retirar los analitos que eventualmente hayan quedado adheridos a la superficie interna de las agujas antes de pipetear la muestra siguiente (ejemplo: Genesis RSP[®] de la Compañía Tecan).

De manera alternativa, se usan puntas desechables, en las que se eliminan las piezas llamadas también puntas intercambiables después de cada proceso de pipeteo de una muestra (ejemplo: ETILab[®] de la Compañía Sorin, y BEP[®] 2000, Dade Behring). De este modo, se consigue la ausencia completa de desplazamientos.

El material de muestra que contiene analitos que, después de su recogida, se deposita sobre la pared exterior de puntas permanentes o desechables y que, como resultado del movimiento del pipetor (unidad de pipeteo) sobre vasos de reacción vacíos o llenos, puede desprenderse a modo de gotas, genera una forma de contaminación totalmente diferente. La consecuencia son resultados falso-positivos similares a los obtenidos con el efecto “*carry-over*” anteriormente citado. Sin embargo, en este caso no se reconocen acumulaciones sistemáticas en posiciones determinadas.

Como estado de la técnica, se considera que una contramedida eficaz consiste en que ya no se detecte ópticamente un goteo experimental de este tipo en los procesos de pipeteo de soluciones pigmentadas a altas concentraciones. Típicamente, esto se logra llevando a cabo múltiples procesos de pipeteo en múltiples posiciones o, de manera ideal, sobre todos los posicionamientos posibles de los vasos de reacción (en caso de pocillos de placas de microtitulación, como vaso de reacción sobre la totalidad de la placa y afectando a todas las posiciones de la placa de microtitulación).

En la actualidad, se obtienen mejoras con un papel secante que se hace pasar sobre la punta de pipeteo para eliminar el material de muestra que se ha adherido a la superficie exterior (Mikrolab AT Plus, Compañía Hamilton), o por programación de tiempos de espera del pipetor (BEP[®] 2000, Compañía Dade Behring), y/o una regulación de la velocidad del movimiento mecánico de la unidad de pipeteo (DITI 200 AC/C, Compañía Tecan).

Por último, con ayuda de la detección de líquidos (mediante ultrasonidos o capacitiva) también es posible alcanzar una escasa profundidad de inmersión de la punta en el material de muestra. Con profundidades de inmersión de pocas

ES 2 331 725 T3

décimas de milímetro se reduce eficazmente el arrastre de restos de líquido sobre la cara exterior de las puntas (por ejemplo, sistemas Multiprobe® de la Compañía Canberra Packard).

5 A pesar de estos efectos conocidos por el especialista y las posibles contramedidas, según el estado de la técnica todavía pueden aparecer reacciones falso-positivas aisladas, generadas por un efecto completamente diferente:

Tanto en el caso de agujas de uso permanente como en el de puntas desechables, se pueden producir desbordamientos o pulverizaciones de material de muestra que contiene analitos hacia los vasos de reacción adyacentes.

10 Estos efectos denominados de “*spill-over*” (“efecto derrame”) se manifiestan de forma esporádica, cuando la geometría de los vasos de reacción y/o de las puntas desechables, como artículos de uso único, exhiben determinadas desviaciones; también puede darse el caso de que, bajo determinadas características de suministro de la unidad de pipeteo, el chorro de muestra se expulse de manera tan desfavorable que se produzca el “desbordamiento” de pequeñas gotas desde la navecilla de reacción prevista hacia los vasos de reacción adyacentes. Típicamente, este efecto se limita al entorno inmediato de la posición donde se encuentra la muestra que contienen analitos; a diferencia del efecto “*carry-over*”, las posiciones temporal/espacialmente subsiguientes no resultan afectadas, sino que en una disposición circular sólo afecta a los vasos de reacción inmediatamente adyacentes.

20 Los ensayos Enzygnost® (sistema ELISA de la Compañía Dade Behring) se deben adaptar al sistema BEP® 2000, desarrollado por la Compañía Stratec, Birkenfeld (hardware y software, incluido software de control), como sistema completamente automatizado para el procesamiento de ensayos ELISA.

25 El dispositivo BEP® 2000 representado en la Fig. 1 es un sistema completamente automatizado desarrollado por la Compañía Stratec para el procesamiento de todas las etapas individuales de un ensayo ELISA, entre otros.

30 Tal como se desprende de las Fig. 1 y 2, el brazo robótico (RA) desplazable sobre el plano y, portador de la unidad pipetor (PE) desplazable en las direcciones x y z, se incorpora en primer lugar una punta desechable (WS) de 300 µl o 1100 µl del depósito (V) previsto a tal efecto. A continuación, el RA transporta el tubo primario (P) y extrae de un tubo una parte alícuota de la muestra en un volumen determinado, en donde la superficie del líquido se reconoce mediante mediciones de capacidad y se sumerge de manera muy superficial en el material de muestra.

Para ensayos que se ejecutan con volúmenes de muestras no diluidos, la parte alícuota se pipetea directamente en las placas de microtitulación recubiertas (BMTP) usadas.

35 La Fig. 3 muestra una vista esquemática sobre la superficie de trabajo de BEP 2000 en la región de las placas de microtitulación recubiertas (desde arriba). Las placas recubiertas se encuentran en las posiciones A hasta D y la unidad de pipetor deposita sobre ellas la muestra en el orden A, B, C y D. Finalmente, se pone en funcionamiento la estación de residuos líquidos (FAS), para retirar el volumen de muestra suministrado en exceso. Este exceso, también denominado “*oversoak*” (sobreimpregnación), se necesita para pipetear el volumen de muestra efectivamente requerido para el ensayo. Tras la retirada de líquido, se pone en marcha la posición de vaciado (AP) para eliminar las puntas desechables y, mediante la incorporación de una nueva punta, pipetear nuevamente una muestra subsiguiente.

45 En los ensayos que se llevan a cabo con material de muestra previamente diluido, el RA se desplaza, antes de la toma de partes alícuotas de la muestra, a través del depósito de reactivos (RV) que se representa en la Fig. 2 con el fin de absorber, en primer lugar, una cantidad definida de tampón para dilución de muestras. Ambos volúmenes se depositan tras el desplazamiento hasta la posición de predilución (WP) sobre vasos no recubiertos (placas de microtitulación o tubos) y, desde allí, se pipetea en las BMTP, seguido de secuencias seriadas como se ha descrito para el procesamiento de muestras no diluidas.

50 Cuando todas las muestras definidas a través del software han sido pipeteadas en las secuencias descritas, en las BMTP previstas para ello, en las posiciones de la Fig. 3, un transportador mecánico (ascensor) conduce las BMTP recubiertas con material de muestra hasta la primera incubación que se lleva a cabo en las cámaras de incubación previstas. Las cámaras de incubación se encuentran en un nivel de trabajo situado por debajo del plano de las muestras o pipeteo del dispositivo, y constituyen unidades de temperatura ajustable o cámaras a la temperatura del entorno (temperatura ambiente).

55 En las proximidades están dispuestos los dispositivos de lavado para retirar el exceso de muestra o del líquido reactivo de la BMTP, así como el dispositivo de medición (fotómetro, entre otros) para medir los resultados del ensayo.

60 En lo que respecta al hardware y software, el sistema BEP® 2000 presenta una estructura constructiva similar, con excepción de algunas modificaciones marginales que no afectan a los procedimientos descritos más adelante, a la de otros sistemas disponibles en el comercio bajo diferentes nombres comerciales de otros proveedores que distribuyen el sistema desarrollado por Stratec bajo nombres genéricos tales como, por ejemplo, el sistema ETIMax 3000®, de la Compañía DiaSorin.

65 Tanto los correspondientes diseños de hardware como el software de control ha sido optimizados por Stratec de acuerdo con el estado de la técnica de tal modo que no se detecta ninguna de las interferencias sistemáticas ante-

ES 2 331 725 T3

riormente descritas ni con los ensayos de pipeteo de las soluciones pigmentadas habituales ni con el procedimiento ampliado de Enzygnost®.

5 En el caso de los ensayos Enzygnost® se trata de procedimientos de ELISA para la detección específica de antígenos o anticuerpos en el formato de placas de microtitulación, en donde las bases sobre las que se apoyan los principios experimentales son múltiples y conocidas por el especialista.

10 Por ejemplo, para las actuales determinaciones de anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos específicos contra la rubéola de la clase G de las inmunoglobulinas (IgG), la superficie interior de las cavidades de las placas de microtitulación (vaso de reacción o pocillo) vienen de fábrica recubiertas por adsorción con el antígeno correspondiente (en este caso, antígeno contra el virus de la rubéola).

15 El usuario (o el sistema automático) diluye previamente las muestras a determinar en relación de 1:21 en tampón de muestra, las deposita de manera aislada en las cavidades, en donde tiene lugar una nueva dilución en relación 1:11 (dilución terminal 1:231). Cuando el material de muestra contiene anticuerpos específicos (IgG anti-virus de la rubéola), éstos se fijan al antígeno inmovilizado (formación de un inmunocomplejo: IgG anti-virus de la rubéola de la muestra/antígeno del virus de la rubéola en la fase sólida). Después de incubar durante 1 hora (37°C), la muestra diluida con exceso de anticuerpos se separa mediante múltiples etapas de lavado y el inmunocomplejo unido a la fase sólida se incuba con el denominado conjugado (1 hora a 37°C).

20 El conjugado es IgG anti-humana (obtenida por inmunización en conejos), que se acopla de forma covalente con peroxidasa de rábano picante (POD) (conjugado de IgG anti-humana/POD). Tras la fijación de este conjugado al inmunocomplejo unido a la fase sólida, se retira el exceso de conjugado por medio de múltiples ciclos de lavado y, seguidamente, se incuba con una solución de cromógeno-sustrato de tampón. En este caso, se trata de tetrametilbencidina no teñida que, con el POD con peróxido de hidrógeno (sustrato), se convierte en una solución de color azul.

La reacción se interrumpe después de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente con solución de cese de la reacción (ácido sulfúrico) y la intensidad del color (extinción) se determina por fotometría.

30 Existe una relación proporcional entre la intensidad del color y la concentración de anticuerpos específicos para el virus de la rubéola, en donde los vasos de reacción con muestras libres de analitos permanecen incoloros, o exhiben extinciones que se hallan por debajo del valor límite (valor "cut-off") calculado por medio de estudios clínicos para cada ensayo.

35 De forma análoga, se determinan anticuerpos específicos de la clase M (por ejemplo, mediante Enzygnost-anti-virus de la rubéola/IgM) con la misma fase sólida, en donde la dilución de la muestra asciende solamente a 1:42 y el conjugado específico para IgM es (conjugado de IgM anti-humana/POD). Por lo demás, la determinación se lleva a cabo de la forma descrita anteriormente.

40 De forma similar a los principios experimentales sobre los que se basa Enzygnost® anti-virus de la rubéola/IgG, para la determinación de IgG específicas para antígenos humanos, los siguientes ensayos Enzygnost®

Enzygnost® Anti-CMV/, Anti-EBV/, Anti-HSV/, Anti-VZV, virus del sarampión/ y virus de la parotiditis/IgG

45 tienen los mismos fundamentos.

En el procesamiento automatizado de estos ensayos sobre el dispositivo BEP® 2000 no se produjo ningún tipo de contaminación del material de muestra en forma de reacciones falso-positivas.

50 De todas formas, sorprendentemente, se puso de manifiesto en el procesamiento de ensayos Enzygnost® altamente sensibles con el sistema BEP® 2000 (por ejemplo, anti-VIH y HBsAg) que continúa apareciendo contaminación que afecta a los resultados.

55 La diferencia entre los ensayos Enzygnost® citados anteriormente y los ensayos Enzygnost® altamente sensibles considerados en este documento es la siguiente:

- no se efectúan diluciones de muestras, sino que se utilizan 100 µl de material de muestra humano sin diluir;
- evidentemente, los analitos a analizar se encuentran presentes en concentraciones muy elevadas en suero o plasma humano;

65 En el caso de Enzygnost® HBsAg 5.0 se trata, por ejemplo, de una detección de antígeno, en la que la placa de microtitulación está recubierta con anticuerpos específicos contra HBsAg (generados por inmunización en la oveja).

El HBsAg de la muestra se incuba simultáneamente en los vasos de reacción con el conjugado 1, que está compuesto por anticuerpos específicos contra HBsAg generados en el ratón (procedimiento de una etapa durante 60 min a 37°C/procedimiento de emparedado de anticuerpos o principio experimental de inmunometría), en donde el anticuer-

ES 2 331 725 T3

po de captura se fija en la fase sólida como complejos de HBsAg/anticuerpo anti-HBsAg, o inicialmente se deposita HBsAg libre al que, seguidamente, se adiciona conjugado 1 para unirlo en forma de inmunocomplejo a la fase sólida.

5 A diferencia de los ensayos Enzygnost anti-virus de la rubéola/IgG e IgM descritos al comienzo del documento, el marcador del conjugado no es POD, sino biotina, que es una vitamina y no una enzima. El motivo de esto es la implementación de un sistema especial de intensificación para aumentar la sensibilidad (amplificación). Según el estado de la técnica, se utiliza la afinidad extraordinariamente elevada de biotina por la proteína estreptavidina, en la que tras la eliminación por lavado del exceso de conjugado, se incubaba un conjugado 2 adicional (30 min a 37°C). Éste está compuesto por estreptavidina, a la que está unido POD de forma covalente.

10 El subsiguiente desarrollo del colorante, el cese de la reacción y la determinación fotométrica, así como la valoración de las extinciones, se llevan a cabo de manera análoga a la metodología descrita del ensayo indirecto.

15 Puesto que tanto el conjugado 1 como el conjugado 2 contienen múltiples miembros de fijación a lo largo de su estructura base de hidratos de carbono, junto con la alta intensidad de fijación entre biotina y estreptavidina, se produce un mecanismo doble de potenciación, con un límite de detección optimizado en al menos un factor 5 de HBsAg con respecto a los procedimientos actuales.

20 Enzygnost® HIV Integral constituye una detección combinada de anticuerpos específicos contra VIH (anti-VIH) y del antígeno de VIH (antígeno p24), en el que ambos analitos se determinan mediante el empleo de biotina-estreptavidina.

25 Las placas de microtitulación se recubren con proteínas inmunológicamente relevantes de VIH 1, VIH 2 y VIH O, a las que se fijan los anticuerpos (anti-VIH) contenidos en la muestra (30 min a 37°C). Después de separar el exceso de muestra (anticuerpos) mediante múltiples ciclos de lavado, tiene lugar la adición de conjugado 1, que contiene antígenos de VIH (VIH 1, 2 y O) que se encuentran unidos simultáneamente con biotina a una estructura base de hidratos de carbono (método de emparejado de antígeno o ensayo inmunométrico).

30 Además de las proteínas de VIH, la fase sólida contiene anticuerpos policlonales específicos contra VIH-p24, generados por inmunización en el conejo. Siempre que en una muestra esté presente el VIH-p24, éste se fijará en la incubación anteriormente mencionada y será detectado con el conjugado 1, que contiene, adicionalmente, dos anticuerpos monoclonales específicos contra p24 generados en ratón, y unidos a hidratos de carbono.

35 Después de 30 minutos de incubación (37°C) y de los procedimientos de lavado, se agrega el conjugado 2 que, en Enzygnost® HBsAg 5.0, está compuesto por estreptavidina y peroxidasa (ambos componentes están unidos covalentemente a una estructura base de hidratos de carbono).

40 Las etapas subsiguientes de incubación, lavado, revelado del cromógeno, cese y evaluación fotométrica tienen lugar de manera idéntica a las que se ha descrito para Enzygnost HBsAg 5.0.

También en el caso de esta determinación de anti-VIH y p24 con Enzygnost® HIV Integral fue posible demostrar, en el marco del estudio clínico, que la sensibilidad del ensayo ha sido mejorada, en relación con métodos anteriores de determinación, en un factor mayor que 4.

45 Los dos ensayos Enzygnost® fueron desarrollados y comercializados entre 1998 y 1999, con el fin de dar respuesta a las crecientes demandas de este tipo de ensayos:

50 Por una parte, la sensibilidad de la determinación de HBsAg y VIH debe ser máxima tanto en lo que se refiere a la seguridad diagnóstica como también a la del banco de sangre y, por otra parte, las interferencias provocadas por reacciones falso-positivas deben ser lo menor posible.

55 El grado de sensibilidad se define como sensibilidad por medio de ensayos de colectivos definidos de muestras (datos en %), por la determinación de muestras procedentes de estadios de infección muy precoces (datos del momento más precoz tras la infección en el que el analito específico - antígeno o anticuerpo - es detectable por primera vez), y por ensayos de diluciones seriadas de material de muestra que contiene analitos (datos de las fases de dilución que todavía han dado resultados positivos).

60 Por el contrario, la fiabilidad en muestras negativas, libres de analitos, se describe por medio de la llamada especificidad, que indica en porcentaje cuántas muestras realmente negativas han sido correctamente determinadas como negativas y si dicha determinación se ha establecido tras un único ensayo (valor inicial) o después de la repetición de las muestras inicialmente reactivas (valor de la repetición del ensayo).

65 Las determinaciones de HBsAg y anti-VIH utilizadas en la actualidad exhiben valores de sensibilidad de >99,98% y sus especificidades típicas se pueden describir con niveles de >99,3% (inicial) y >99,7% (repetición del ensayo). Estos datos son independientes del fabricante, se refieren también a otros analitos tales como anticuerpos específicos contra la hepatitis C (anti-HCV) o anticuerpos específicos contra *Treponema pallidum* (anti-*Treponema pallidum*) y, en la práctica, se deben alcanzar independientemente del tipo de instrumentación.

ES 2 331 725 T3

De forma sorprendente, la contaminación observada en el sistema BEP® 2000 en lo que se refiere al valor de especificidad de Enzygnost® HIV Integral y Enzygnost® HBsAg 5.0 de tal manera que sólo se alcanzaron valores iniciales entre 92% y 94% (véanse el Ejemplo 3, así como las Tablas 1 y 2), aunque con los métodos conocidos se podía excluir la contaminación conocida hasta el momento, especialmente también un efecto “*carry-over*” sobre las puntas desechables.

En base a sistemas de modelo desarrollados por los inventores se puso de manifiesto que las reacciones falso-positivas eran provocadas por la formación de salpicaduras mínimas, con un orden de magnitud de aproximadamente 0,1 hasta 1 nl (corresponden a una dilución de aproximadamente 1:10⁶), que se producen en el proceso de pipeteo de muestras que contienen analitos y en el desplazamiento mecánico de la unidad de pipeteo.

Adicionalmente, se estableció que ensayos menos sensibles resultan afectados también cuando el analito en cuestión puede aparecer en concentraciones extremadamente altas por motivos biológicos. Ejemplos de los mismos son las determinaciones de anticuerpos contra el antígeno del virus de la hepatitis A (anti-HAV) y contra el antígeno del virus de la hepatitis B (anti-HBs).

Además, con la ayuda de modelos se determinó que tanto en el suministro de un exceso de material de muestra como en la eliminación de puntas desechables se pueden generar salpicaduras mínimas (gotas invisibles) del orden de magnitud anteriormente citado, que pueden dar lugar a alteraciones de los ensayos de máxima sensibilidad.

En general, son múltiples parámetros los que resultan afectados por alteraciones que son previsibles, independientemente de la forma de realización concreta de un procedimiento de determinación inmunoquímica y con cualquier suministrador de muestras o módulo de suministro de muestras que actúa con un instrumento BEP® 2000 o análogo al mismo (tal como, por ejemplo, ETILab® de la Compañía DiaSorin), o cuya estructura es incluso semejante en lo que respecta a sus aspectos de hardware y software (por ejemplo, ETIMax 3000® de la Compañía DiaSorin).

Este tipo de efectos interfiere especialmente con los procedimientos de ELISA descritos en aplicaciones que exigen la máxima precisión y sensibilidad tales como, por ejemplo, procedimientos de amplificación en tecnología génica, en las que, según es sabido, se puede medir incluso una contaminación mínima.

La presente invención tuvo, por lo tanto, la misión de describir sistemáticamente estas nuevas alteraciones y otros trastornos desconocidos hasta la fecha, y desarrollar procedimientos con los cuales los ensayos especialmente de muy alta sensibilidad no resulten afectados por la contaminación del material de muestra, proporcionando hallazgos falso-positivos o excesivamente positivos de carácter falso.

Sorprendentemente, se ha encontrado que mediante la definición de una serie de parámetros característicos de la unidad de pipeteo del sistema BEP® 2000 resulta posible reducir significativamente o evitar la formación de salpicaduras en el proceso de pipeteo.

Adicionalmente, se ha encontrado que es posible suprimir eficazmente las consecuencias negativas sobre la precisión de los resultados experimentales de las salpicaduras hasta ahora desconocidas, que se producen durante el suministro de un exceso de volumen de muestra, mediante la adición de un dispositivo de protección mecánica entre la estación de liberación de líquidos y la posición de las placas de microtitulación recubiertas.

Objetos de la invención son los procedimientos que se describen a continuación en detalle para una rápida visualización y optimización de los efectos, así como procedimientos que, dirigidos a través del software de control de la unidad de pipeteo, evitan la contaminación. También es objeto de la invención un complemento o una modificación del hardware de la estación de liberación de líquidos que, por ejemplo, con forma de una cubierta, puede evitar eficazmente la contaminación en forma de microsalpicaduras.

La presente invención se refiere, por tanto, a un procedimiento para la reducción de la contaminación de vasos de reacción vacíos o ya recubiertos con material de muestra libre de analitos, o que contiene analitos en concentraciones reducidas, dentro de vasos de reacción dispuestos espacialmente próximos entre sí durante el pipeteo de muestras o reactivos con un distribuidor de muestras automático, que se distingue porque mediante el empleo de un ensayo cromático de enzima/sustrato se determina, en primer lugar, el grado de contaminación por medio del Modelo A:

- a) Adición de una solución enzimática a los vasos de reacción de una parte de la citada disposición espacial, en tanto que los restantes vasos de reacción se recubren con un material que forma capas de absorción que contiene un reactivo apropiado de cromógeno/reactivo de sustrato, mediante cuyo contacto con la enzima se desencadena una reacción cromática,
- b) Determinación del número, intensidad y/o distribución de los vasos de reacción que se distinguen por un desarrollo cromático,

y, a continuación, se modifican la absorción de líquido (perfil de aspiración) y la liberación de líquido (perfil de dispensación) de tal forma que disminuye el número o la intensidad de los vasos de reacción que se distinguen por el desarrollo cromático.

ES 2 331 725 T3

La invención se refiere, adicionalmente, a un procedimiento para reducir la contaminación de vasos de reacción vacíos o ya recubiertos con material de muestra libre de analitos, o que contiene analitos en concentraciones reducidas, dentro de vasos de reacción dispuestos espacialmente próximos entre sí durante el pipeteo de muestras o reactivos con un distribuidor de muestras automático, que se distingue porque mediante el empleo de un ensayo enzimático/cromático se determina, en primer lugar, el grado de contaminación por medio del Modelo B:

- a) Adición de una solución enzimática a los vasos de reacción de una parte de la citada disposición espacial;
- b) Adición de un reactivo apropiado de cromógeno/sustrato que, en contacto con la enzima, desencadena una reacción cromática, a los vasos de reacción de la parte restante de dicha disposición espacial,
- c) Cálculo de la contaminación posible mediante la determinación del desarrollo cromático en los vasos de reacción;

y, a continuación, se modifican la absorción de líquido (perfil de aspiración) y la liberación de líquido (perfil de dispensación) de tal forma que disminuye el número o la intensidad de los vasos de reacción que se distinguen por el desarrollo cromático.

En los citados procedimientos, los vasos de reacción pueden ser las cavidades de (pocillos) de una placa de microtitulación. De manera especial, la presente invención se refiere a un procedimiento de este tipo, en el que:

- a) El distribuidor de muestras automático forma parte de un sistema BEP 2000 o de un sistema automatizado cuya estructura es esencialmente similar; y
- b) la disposición de los vasos de reacción que se hallan espacialmente próximos entre sí consiste en una disposición lineal, situada en un plano horizontal de 4 placas de microtitulación, que forman la secuencia: posición A, posición B, posición C y posición D, según la Fig. 3; y
- c) la adición de la solución enzimática se lleva a cabo en una parte de los placas de microtitulación en las posiciones A hasta D; y
- d) el cálculo de la posible contaminación incluye, especialmente, el de la contaminación procedente de la estación de liberación de líquidos (FAS).

Igualmente, se incluye una variante del procedimiento anteriormente descrito, en la que la estación de liberación de líquidos (FAS) está recubierta por una cubierta superior y una abertura de las menores dimensiones posibles, de modo que, por una parte, se ofrece una protección óptima contra salpicaduras procedentes de la estación de liberación de líquidos (FAS), aunque, por otra parte, la salida del exceso del volumen de muestra a través de esta abertura hacia el interior de la estación de liberación de líquidos (FAS) se puede reproducir de tal modo que se evita que ningún líquido entre en contacto por error con el borde de la abertura.

Resulta conveniente, además, que la estación de liberación de líquidos (FAS) esté separada por la aplicación de un dispositivo protector situado entre la estación de liberación de líquidos y las posiciones de las placas de microtitulación recubiertas con lo que se impide la contaminación.

La presente invención se refiere también a una estación de liberación de líquidos apropiada para su uso de un procedimiento según la invención, como el que se ha descrito anteriormente, que esté recubierta con una cubierta superior, en la que la abertura que se encuentra en la misma muestra las menores dimensiones posibles, de modo que, por una parte, se proporcione una protección óptima contra las salpicaduras procedentes de la estación de liberación de líquidos, aunque, por otra parte, la salida del exceso del volumen de muestra a través de esta abertura hacia el interior de la estación de liberación de líquidos se puede reproducir de tal modo que se evita que ningún líquido entre en contacto por error con el borde de la abertura. La estación de liberación de líquidos puede exhibir también, convenientemente, una configuración desde un principio en la que las paredes superiores de los vasos se correspondan con la cubierta, de manera que es posible prescindir de una cubierta separada, pero conservando su funcionalidad.

Cada uno de los procedimientos según la invención, descritos anteriormente, así como cada estación de liberación de líquidos recubierta, según la invención, contribuye por sí mismo a evitar la contaminación. De manera ideal, se utilizan múltiples o todos los procedimientos según la invención, a ser posible combinados con una estación recubierta de liberación de líquidos, sin que, no obstante, la presente invención se limite al uso combinado.

De acuerdo con el estado de la técnica, el software del distribuidor de muestras ha sido concebido de tal modo que permite la programación de parámetros importantes tales como, por ejemplo, la velocidad de incorporación y liberación de líquidos. Esto se considera incluso irrenunciable, ya que estas características deben ser adaptadas al conjunto de investigaciones en cuanto a sus propiedades (tales como, por ejemplo, viscosidad) (A. Frittrang; *Laborpraxis*, Diciembre 1996). En general, y de forma similar a las optimizaciones de las puntas de precisión (los llamados dilutores), o también el diámetro de las agujas, estas adaptaciones se llevan a cabo sólo en relación con la optimización de la precisión y exactitud del volumen de pipeteo. La propia programación se puede efectuar a través de módulos del

ES 2 331 725 T3

hardware o software de control del sistema general, siendo accesible como componente del software de activación o, incluso, del usuario.

5 Como ejemplos bibliográficos adicionales cabe mencionar las indicaciones de la Compañía Tecan acerca del tema de la manipulación de líquidos: Liquid Handling Manual for DITI 200 AC/C (Docu. No. 390548); Option DITI 200 AC/C (Docu. No. 390542); Gemini-Softwarehandbuch No. 39 1354 V3.10, de Sept. 1999 Manual No. 391354, V.3.10). En estos manuales, así como en los correspondientes libros de texto tales como, por ejemplo, W.Wagner: “Strömungstechnik und Druckverlust-Berechnung”; Editorial Vogel, se describen modificaciones de los parámetros de incorporación y liberación en relación con la precisión y la exactitud de los procesos de pipeteo, considerando especialmente la viscosidad de un determinado material de muestra. En general, ni en las indicaciones de optimización ni en las listas correspondientes de posibles fuentes de error (las llamadas “guías para resolución de problemas”, “trouble-shooting guides”) se encuentran indicaciones específicas para la detección o la evitación de la contaminación mediante volúmenes de muestra mínimos.

15 La única indicación que figura en el “Liquid Handling Manual for DITI 200 AC/C” (véase antes) se refiere a la formación de gotas extendida y visualmente reconocible a la salida de las puntas y describe, por lo tanto, más bien una alteración técnica o una función programada erróneamente que una medida dirigida a evitar las salpicaduras más pequeñas (“microsalpicaduras”) del orden de nanolitros.

20 Al igual que en la mayoría de los sistemas automáticos de pipeteo, también en el sistema BEP 2000 es posible modificar los ajustes de software para el llamado “System Setup” (“Organización del Sistema”), para modificar los parámetros físicos característicos de la incorporación y liberación de muestras.

25 Ejemplos de este tipo de ajustes para la incorporación de muestras (“*aspirate profile*”, véase la Figura 5) son los que han sido modificados de forma dirigida en el sentido de la presente invención:

- “*Start velocity*”: describe la velocidad inicial de la incorporación de muestras;
- “*Top velocity*”: describe la velocidad máxima alcanzada en la incorporación de muestras;
- “*Dive out velocity*”: describe la velocidad a la que desplaza la punta desde el líquido tras la incorporación de la muestra.

35 Ejemplos de este tipo de ajustes para la liberación de muestras (“*dispense profile*”, véase la Figura 5) son los que han sido modificados de forma dirigida en el sentido de la presente invención:

- “*Start velocity*”: describe la velocidad inicial de la liberación de muestras;
- “*Top velocity*”: describe la velocidad máxima alcanzada en la liberación de muestras;
- “*Acceleration*”: describe la aceleración de la liberación de muestras;
- “*Cutoff velocity*”: describe la velocidad de aceleración al finalizar la liberación de muestras (velocidad de retirada tras interrumpir el proceso);
- “*Dive out velocity*”: describe la velocidad a la que se retira la punta desde la posición sobre los vasos de reacción después de la liberación de la muestra.

50 Todos los parámetros citados anteriormente fueron optimizados por la Compañía Stratec, tomando en consideración los efectos de la contaminación mencionados al comienzo, según el estado de la técnica, de manera que se satisficieron los correspondientes criterios. La disposición definitiva establecida por Stratec sobre esta base corresponde a los ajustes representados en la Figura 5.

55 Estos ajustes de perfil de la Figura 5 se analizaron en el procesamiento automático de, por ejemplo, los sistemas de ensayo Enzygnost® Anti-HBc monoclonal, Enzygnost® Anti-HBc/IgM, Enzygnost® Anti-HAV/IgM, Enzygnost® HBsAg monoclonal, Enzygnost® Anti-CVMV IgG+IgM, Enzygnost® Anti-CMV/IgG, Enzygnost® Anti-virus de la rubéola/IgG, Enzygnost® Anti-virus de la rubéola/IgM, Enzygnost® Anti-HSV/IgG, Enzygnost® Anti-HSV/IgM, Enzygnost® Toxoplasmosis/IgG, Enzygnost® Toxoplasmosis/IgM, Enzygnost® Borreliosis/IgG y Enzygnost® Borreliosis/IgM, alcanzándose una coincidencia excelente para todas las muestras humanas que fueron negativas o positivas según el estado inmunológico.

65 Para la comprobación, se cargaron simultáneamente en una placa de microtitulación 16 muestras reactivas (A1 hasta H2, véase también la Figura 4) y más de 30 muestras humanas que fueron negativas con respecto a los correspondientes analitos, y se analizaron con los ensayos anteriormente mencionados.

Los resultados de las mediciones (unidades de extinción) que se muestran a modo de ejemplo en las Tablas 3, 4 y 5 para toxoplasmosis IgG, rubéola IgG y HSV IgG ponen claramente de manifiesto que en estos procedimientos no es posible detectar absolutamente ninguna contaminación, en cualquier forma que se hubiera podido presentar, incluso

ES 2 331 725 T3

cuando las muestras se aplicaron mezcladas: se cargaron en la misma placa de ensayos, por una parte, muestras que contienen los analitos a analizar en concentraciones extremadamente altas y, por otra parte, muestras exentas de analitos.

5 Sin embargo, y de forma sorprendente, con el perfil del pipetor de la Figura 5 (según el estado de la técnica) se detectó una interferencia significativa, causada por contaminación cruzada del material de muestra, cuando se llevó a cabo el pipeteo mixto de muestras que contuvieron analitos y muestras libres de analito con el empleo de Enzygnost® HBsAg 5.0 y Enzygnost® HIV Integral. El procesamiento se realizó en la posición A de las localizaciones primarias de las placas de microtitulación recubiertas (véase también, en este contexto, la Figura 3).

10 Tal como lo demuestran claramente los resultados de medición (de la determinación de Anti-HIV y HBsAg) representados en las tablas 1 y 2, en promedio se encuentran 4 a 6 resultados individuales falso-positivos por placa de ensayo (por ejemplo, en las posiciones de las placas de microtitulación A1, F5, F7 y A8 de la Tabla 1). En relación con el número total de aprox. 60 muestras libres de analitos, este efecto da como resultado unos datos de especificidad entre 92 y 94%, en tanto que la aplicación manual de muestras, llevada a cabo de forma paralela, con el subsiguiente procesamiento con el sistema BEP III® (procesador automático de ELISA de la Compañía Dade Behring) no generó ningún resultado falso-positivo.

20 Para la optimización de los datos de ajuste de liberación del pipetor BEP® 2000 se desarrolló el Modelo A descrito en el Ejemplo 1. Se trata, en este caso, de un ensayo enzimático/cromático extremadamente sensible, en el que se aplican 100 μ l de una solución enzimática altamente concentrada (0,25 mg de peroxidasa/ml) a partir del pipetor en las filas 5 hasta 8 de una placa de microtitulación vacía y exenta de recubrimiento (véase, además, la Figura 4). Las filas correspondientes 1 hasta 4 y 9 hasta 12 se cubrieron con papel filtro (con el refuerzo de un soporte sólido de plástico), que se empapó con una solución de cromógeno/sustrato de tampón. La preparación de la solución de trabajo se efectuó de acuerdo con las instrucciones del prospecto de envase, y se describe en el Ejemplo 1.

30 Con el fin de mejorar la comparabilidad de la matriz (por ejemplo, en lo que se refiere a la aplicabilidad de los resultados con respecto a las propiedades de viscosidad), se seleccionó suero de donantes sanos como medio de dilución.

Sorprendentemente, mediante este sencillo modelo se observó que se produce una gran cantidad de salpicaduras de diferentes tamaños (Fig. 6).

35 La cuantificación de los límites de detección fiables de esta metodología indicó un valor de aproximadamente 0,25 ng de POD/ml, que corresponde a una dilución de aproximadamente mayor que 1:10⁵, o a una formación de gotas en el orden de magnitud de 1,0 nl. Por lo tanto, este procedimiento se puede usar para visualizar una contaminación que se halla más allá de los límites reconocibles visualmente como gotas y que, no obstante, interfieren con procedimientos de detección altamente sensibles.

40 Las mejoras emprendidas con este modelo (modelo A) condujeron al establecimiento del perfil de dispensación que se resume en la Figura 7, y a las mejoras detectadas representadas en la Figura 8.

45 Así mismo, fue posible representar la disminución de la contaminación con Enzygnost HBsAg 5.0 gracias a estas medidas, si bien no se pudo eliminarla del todo.

50 Con la suposición de que los aerosoles que se producen durante el proceso de pipeteo constituyen una causa, aunque existen otros factores de influencia, se desarrolló un sistema adicional, el Modelo B (véase el Ejemplo 2), cuya finalidad es la de permitir atribuir más claramente las salpicaduras más pequeñas a su punto de origen.

55 Para ello, se aplicaron con el dispositivo BEP® 2000 100 μ l de la solución concentrada de POD en las filas 1 a 4 en la posición C de una placa de microtitulación (véanse también, en este contexto, las Figuras 3 y 4), y en las filas 5 a 12 la solución de cromógeno/sustrato de tampón. Las placas en posición B y A se recubrieron en todas sus filas exclusivamente con la solución de cromógeno/sustrato de tampón, la reacción se interrumpió después de 30 min y se determinaron por fotometría las extinciones en todas las posiciones.

60 La cuantificación de los límites de detección seguros de esta metodología dio un valor de 15 pg de POD/ml, que corresponde a una dilución de aproximadamente 1:10⁷, o a una formación de gotas de un orden de magnitud de 0,01 nl.

65 Por lo tanto, el modelo B demuestra ser sustancialmente más sensible que el modelo A y permite la detección altamente sensible de la contaminación, más allá de los límites de sensibilidad conocidos del estado de la técnica (véase el Ejemplo 2).

El sorprendente resultado obtenido con el ajuste estándar del perfil (según el estado de la técnica) fue que no sólo la posición C de la placa resultó fuertemente afectada por la contaminación, sino que también lo fueron las placas en la posición B y las placas en la posición A (Tablas 6, 7 y 8). Mientras que en el caso de la posición C con el modelo A se puede explicar como “aerosoles” causados por el proceso de desvío, para la contaminación de las placas en B y A

ES 2 331 725 T3

se deben considerar otros factores de influencia, puesto que no se puede suponer que las salpicaduras se desplacen a tales distancias.

5 Todas las variables de las funciones de aspiración (*aspirate*) y liberación (*dispense*) se variaron experimentalmente de manera individual y se comprobaron las consecuencias en el modelo A o en el modelo B (o en ambos). Se utilizó un procedimiento iterativo, en el que se optimizó sistemáticamente cada una de las variables descritas en las páginas 31 y 33 en relación con sus efectos sobre la contaminación. Se verificaron los resultados positivos de los modelos a través del procesamiento automático de los ensayos Enzygnost® descritos con el sistema BEP® 2000.

10 El uso del modelo B con ajustes optimizados del perfil de la función de dispensación (Figura 7) confirmó esta suposición: una clara reducción de la contaminación en C, pero, como sucedió anteriormente, contaminación cruzada en A y B (Tablas 9, 10 y 11).

15 La posibilidad de que el humedecimiento exterior de las puntas y el desprendimiento de gotas de líquido causado por esto durante el desplazamiento del pipetor sobre las placas de microtitulación pareció improbable, dado que las puntas desechables detectan la superficie del líquido a través de un sistema de medición capacitivo y, por lo tanto, para la toma de muestras se sumergen sólo ligeramente en el líquido.

20 En el caso del modelo B resultó completamente inesperado el efecto de pérdida de volúmenes muy reducidos de muestras (órdenes de magnitud entre 0,01 y 0,5 nl) en el proceso de transporte de la unidad de pipeteo BEP® 2000; esto se puede evitar eficazmente mediante el uso de perfiles apropiados en la fase de aspiración (perfiles de aspiración de la Figura 9), tal como ponen de manifiesto los efectos de contaminación reducidos en el modelo B sobre la posición de placa B en la Tabla 12.

25 Los perfiles de aspiración optimizados, junto con los perfiles de dispensación optimizados (Figuras 7 y 9), en el modelo B, determinan las típicas mejoras de los efectos de la contaminación que se muestran en las Tablas 13 hasta 15. Sin embargo, de estas tablas se deduce también que en la posición A de la placa se continúa produciendo contaminación, que se acumula en las filas inferiores (Tabla 13).

30 Con el intento de cubrir la estación de residuos líquidos (posición FAS en la Figura 3), utilizando perfiles optimizados de aspiración y dispensación, se obtuvo el resultado sorprendente de que las placas en las posiciones A, B y C estuvieron absolutamente limpias.

35 De esta forma, se demuestra que pueden producirse salpicaduras adicionales con la liberación en la estación de residuos de volúmenes de muestras que han sido aspirados en exceso (empapamiento), en donde estas salpicaduras dan origen a las coloraciones observadas. Dado que el empapamiento es imprescindible para un pipeteo fiable y preciso de muestras en los vasos de reacción, se desarrolló una cubierta como la que se representa en la Figura 10.

40 La contaminación observada en la posición A de la placa con los ajustes estándares de los perfiles y Enzygnost® HBsAg, que se ha descrito inicialmente, se puede atribuir, de acuerdo con las descripciones del modelo B, a tres fuentes de salpicaduras diferentes, cuyas localizaciones y causas se pueden describir y remediar de manera separada entre sí (medidas entre paréntesis):

- 45 • Salpicaduras causadas por el proceso de pipeteo de muestras (optimización del perfil de dispensación);
- Salpicaduras causadas por los efectos de residuo/goteo (optimización del perfil de aspiración); y
- 50 • Salpicaduras causadas por la liberación de un exceso de volumen de muestra (protección mecánica de la estación de residuos líquidos, por ejemplo, por medio de una cubierta).

55 Es posible demostrar que cada medida contribuye individualmente a mejorar los efectos de la contaminación. Sin embargo, se logra una completa reducción de los efectos implementando todas las medidas, con la imagen resultante del modelo A que se indica en la Figura 11.

La eficacia de las medidas descritas es verificable también con los resultados correspondientes al uso de Enzygnost® HBsAg 5.0 (Tabla 16) y Enzygnost® HIV Integral (Tabla 17), en los que las placas de las tablas se analizaron en posición A.

60 Las coloraciones observadas en la banda 4 (Tabla 18) de las placas de microtitulación son expresión de los efectos de “*spill-over*” (derrame) descritos al comienzo, que pueden aparecer muy raramente. Al utilizar el modelo B sobre el procedimiento de ELISA con el dispositivo RSP 150® de la Compañía Tecan, que se describe en el Ejemplo 3 (y posterior procesamiento automático de Enzygnost® HBsAg 5.0 con el dispositivo BEP® III, de la Compañía Dade Behring), fue posible demostrar que este dispensador de muestras puede generar el mismo efecto que el BEP® 2000, antes de implementar las observaciones realizadas de manera sorprendente (Tabla 19).

Adicionalmente, tal como se muestra en la Tabla 20, los resultados obtenidos con Enzygnost® HBsAg 5.0 bajo las mismas condiciones ponen de manifiesto que este dispositivo automático de pipeteo mide las interferencias de la

ES 2 331 725 T3

contaminación producida de la forma habitual, lo que no sucede con el dispositivo BEP® 2000 tras la introducción del procedimiento según la invención.

De este modo, se pudo demostrar también de manera inesperada que la sensibilidad de los procedimientos diagnósticos individuales ha aumentado tanto en los últimos tiempos que los efectos de la contaminación derivados de los sistemas automáticos de pipeteo o módulos de dispensación de muestras, que previamente se consideraban tolerables, con los procedimientos de detección de alta sensibilidad actuales pueden dar lugar a interpretaciones erróneas confusas, si no directamente incorrectas.

Más allá de los dos ensayos Enzygnost®, se ha detectado también contaminación con métodos de determinación menos sensibles, en los que, sin embargo, tanto la frecuencia como la intensidad fueron menos detectables: Enzygnost® Anti-HBs, Enzygnost® Anti-HAV (Ig total) y Enzygnost® Anti-HBe (Tablas 21, 22 y 23). Dado que, en este caso, se trata de parámetros en los que el experto sabe que se pueden producir, de forma natural, concentraciones de analitos muy elevadas, cabe deducir que los límites establecidos por el estado de la técnica ya no son suficientes para lograr una determinación fiable y libre de contaminación. Para estos ensayos se puede demostrar también que los efectos son controlables con la totalidad de las medidas descritas.

Por último, se ha identificado una causa de contaminación en la estación de residuos de líquidos (FAS) que no se había descrito hasta la fecha, capaz de actuar como una fuente adicional de resultados erróneos. Sin embargo, es posible prevenirlos de forma rápida y fiable por medios mecánicos mediante la instalación, por ejemplo, de una cubierta apropiada provista de una abertura para insertar volúmenes de muestra excesivos (residuos líquidos).

En consecuencia, la invención comprende un procedimiento en el que la estación de residuos líquidos (FAS) está recubierta con una cubierta superior, que presenta una abertura de dimensiones lo más pequeñas posible, de manera que, por una parte, se ejerza una óptima protección contra las salpicaduras procedentes de la estación de residuos líquidos (FAS), mientras que, por otra parte, sea posible el aporte reproducible de volúmenes excesivos de muestra a través de esta abertura hacia la estación de residuos líquidos (FAS) de tal manera que ningún líquido entre en contacto de forma inadvertida con el borde de la abertura.

Alternativamente, la estación de residuos líquidos (FAS) puede estar diseñada desde el principio de tal modo que las paredes superiores de los vasos se correspondan con la cubierta mencionada anteriormente, de manera que sea posible prescindir de una cubierta separada, manteniendo sin embargo la funcionalidad.

En lugar de, o además de la cubierta descrita o la correspondiente configuración de la estación de residuos líquidos sin cubierta, se puede instalar una pared de separación entre la estación de residuos líquidos y el entorno de los vasos de reacción (por ejemplo, placas de microtitulación).

Las medidas según la invención de perfiles optimizados, así como el complemento mecánico del hardware, derivan de hecho de una forma de realización especial de una estación de distribución de muestras y, por lo tanto, se pueden transferir directa e inmediatamente a aparatos de estructura similar.

El experto puede beneficiarse de estos procedimientos en dispositivos análogos, aun cuando la programación necesaria deba llevarse a cabo de manera diferente. Así, cabe esperar que existan otras denominaciones de los valores característicos, los ajustes se definan con otras unidades de medida, y/o que la programación deba o pueda realizarse en otras jerarquías de software (por ejemplo, firmware, software de control o, incluso, directamente en los sistemas operativos del software en PCs dedicados y/o estructuras de software exclusivas del sistema). En todos los casos, el procedimiento según la invención conserva su aplicabilidad y se puede utilizar en adaptaciones análogas de un sistema determinado, que resultan evidentes para el experto.

De manera particular, el experto puede utilizar en su totalidad los procedimientos que, como los modelos A y B permiten realizar rápidamente un inventario y, sobre todo, la optimización de la contaminación existente, también en pipetores de 4 u 8 canales tanto de agujas de acero fino como con puntas desechables para conversiones o transformaciones apropiadas.

La cubierta que se ha descrito como tapa de la estación de residuos líquidos se puede modificar, por ejemplo, mediante su diseño y construcción como una solución integral de la estación de residuos líquidos (a modo de componente) o diseñándola de forma completamente diferente en cuanto a su geometría/estado físico, o realizarla en el contexto del procedimiento según la invención, de manera totalmente diferente, por ejemplo, mediante la instalación de una pared de separación entre la estación de residuos líquidos y la BMTP, u otras formas de construcción para proteger y evitar así la contaminación.

Del mismo modo, sabiendo ahora que campos que hasta la fecha no han sido suficientemente considerados (por ejemplo, la estación de residuos líquidos) pueden estar asociados con un considerable potencial de interferencia, es posible extraer conclusiones sobre potenciales fuentes adicionales de interferencia (tales como, por ejemplo, la estación de descarga de pipetas).

A continuación, la presente invención se explicará más detalladamente en base a los ejemplos y reivindicaciones, sin limitarla, no obstante, a las formas de realización concretas mencionadas.

ES 2 331 725 T3

Ejemplo 1

Modelo A para la detección de contaminación de los dispensadores de muestras

5 *Solución madre de POD*

La peroxidasa de rábano picante (POD) se disuelve en una concentración de 0,25 mg/ml en suero normal de un donante de sangre sano, para generar una matriz de pipeteo que es comparable con el material de muestras natural en lo que respecta a viscosidad y otras propiedades físico-químicas.

10

Solución de cromógeno-tampón sustrato

En este caso, se trata de un producto comercializado por la Compañía Dade Behring:

15

“Reactivos Suplementarios para Enzygnost®/TMP”, (Código nº OUVF G17).

Solución 1 Cromógeno TMB:

5 g de tetrametilbencidina/l de agua

20

Solución 2 Tampón/Sustrato TMB:

aprox. 0,1 g de peróxido de hidrógeno/l de tampón de acetato sódico

25

Se mezcla 1 ml de Cromógeno TMB con 10 ml de Tampón/Sustrato TMB en una botella de material sintético disponible en el kit de ensayo.

Esta solución de trabajo se puede utilizar durante un plazo de hasta 5 días, almacenándola protegida de la luz a +2 hasta +8°C.

30

Puntas

Puntas desechables conductoras de 300 μ l y 1100 μ l (Compañía Eppendorff).

35

Realización del Modelo A

A partir de una lámina de plástico (en este caso, láminas adhesivas para placas de microtitulación, del kit de ensayo anteriormente mencionado) se cortan secciones de un tamaño de aprox. 5 x 8 cm y sobre ellas se deposita papel absorbente (por ejemplo, Schleicher & Schüll) de las mismas dimensiones. Finalmente, el papel absorbente se empapa con aprox. 2 ml de la solución de trabajo de cromógeno-tampón sustrato.

40

En cada caso se utilizan 2 papeles preparados de esta forma, sobre soportes de plástico, para recubrir las bandas 1 hasta 4 ó 9 hasta 12 (véase también la Figura 4) de una placa de microtitulación sin recubrimiento.

45

En las bandas abiertas 5 hasta 8 se pipetea, entonces, 100 μ l de la solución madre de POD mediante el dispositivo automático de pipeteo BEP® 2000, y el resultado se documenta mediante fotografías de los papeles después de 10 min.

50

La contaminación existente se expresa como manchas puntiformes de color azul, cuyo diámetro e intensidad cromática son directamente proporcionales al grado de contaminación.

55

Por medio de diluciones seriadas de la solución madre de POD y de la aplicación de volúmenes definidos de las etapas de dilución sobre los papeles absorbentes empapados con cromógeno-tampón sustrato, se pudo calcular con la incubación de 10 min un límite de detección menor que 2,5 ng de POD/ml, correspondiente a una dilución de 1:10⁵ (y mayor).

Ejemplo 2

60

Modelo B para la detección de contaminación

Materiales

65

Las soluciones y puntas utilizadas son, sin ninguna excepción, las que se han descrito en el Ejemplo 1, en tanto que al objeto de incrementar la sensibilidad de detección, el tiempo de revelado del cromógeno aplicado fue de 30 min. Adicionalmente, se utiliza la solución de cese de reacción (ácido sulfúrico 0,5 N), con la que se interrumpe la formación de tinción después de 30 min de incubación, para cuantificar la intensidad cromática con un fotómetro

ES 2 331 725 T3

(medición en el plazo de una hora después del cese de reacción, con una longitud de onda de medición de 450 nm y una longitud de onda de referencia de 650 nm).

Realización del Modelo B

5

Se disponen 3 placas de microtitulación sin recubrimiento en las posiciones A, B y C definidas en la Figura 3. En primer lugar, todos los pocillos de las placas en las posiciones A y B se rellenan por completo con 100 μ l de la solución de trabajo de cromógeno-tampón sustrato, al igual que las bandas 5 hasta 12 de la placa en posición C (véase en este contexto la Figura 3).

10

A continuación, el dispositivo automático de pipeteo pipetea 100 μ l de la solución de POD concentrada solamente en las bandas 1 hasta 4 de la placa en la posición A, y todas las placas se llevan a las cámaras a temperatura ambiente del sistema BEP[®] 2000.

15

Después de 30 min, la reacción se detiene mediante la adición de 100 μ l de la solución de cese de la reacción, y se determina por fotometría la extinción en cada vaso de reacción (pocillo) de cada placa.

20

La contaminación existente se manifiesta como una coloración amarilla en cavidades aisladas de las placas de microtitulación afectadas, cuya intensidad cromática es directamente proporcional a la importancia de la contaminación. En las tablas 6, 7 y 8 se representan resultados a modo de ejemplo.

El límite de detección del método se calculó mediante el pipeteo de sendos 10 μ l de diluciones seriadas definidas de la solución madre de POD en 100 μ l de la solución de cromógeno-tampón sustrato.

25

Las extinciones de las concentraciones individuales, determinadas por fotometría después del cese de la reacción, aparecen resumidas en comparación con los valores estándares en la Tabla siguiente, y dan origen a una sensibilidad límite menor que 25 pg de POD/ml, correspondiente a una dilución de 1:10⁷.

30

TABLA 24

Extinciones de diversas concentraciones de POD en el Modelo B

35

Concentración: ng POD/ml	Extinción 450 nm (D.O.)	Corresponde a una dilución de la solución madre:
2,5	Rebosamiento	10 ⁵
0,25	1,780	10 ⁶
0,025	0,180	10 ⁷
0,0025	0,080	10 ⁸
Base (valor medio a partir de n=20 mediciones individuales)	0,020	Negativo

50

Variaciones del Modelo B

55

En este caso, no son 3 las placas posicionadas, sino una sólo en posición A, cuyo esquema de carga/pipeteo corresponde al de la placa C en el modelo B. El procesamiento corresponde, en general, a la descripción anterior.

En función del problema, es posible analizar también 4 placas en todas las posiciones de placa, variando muy ampliamente los puntos de aplicación de la solución enzimática.

60

Ejemplo 3

Aplicación del Modelo B a Ensayos Enzygnost[®]

65

En este caso, se cargan aprox. 20-30 sueros que contienen elevadas concentraciones de los analitos que se deben estudiar en las tres primeras bandas, así como aprox. 70 sueros libres de analitos en los pocillos restantes de las placas de microtitulación de los ensayos Enzygnost[®].

ES 2 331 725 T3

La placa se coloca en posición A (variación del modelo B) o en posición C cuando se utilizan adicionalmente placas de microtitulación cargadas exclusivamente con sueros libres de analitos en las posiciones A y B.

El resto del procesamiento de las placas se lleva a cabo, en función del ensayo, de forma completamente automática en el dispositivo BEP[®] 2000, de acuerdo con los procedimientos descritos en las instrucciones de los ensayos Enzygnost[®].

Además, se realizan ensayos comparativos, utilizando cargas idénticas de placas, en los que las muestras se pipeteen manualmente y, paralelamente, se efectúa el ELISA con el sistema BEP III[®]. De este modo, se pueden identificar muestras que, de manera natural (regulada por la matriz) generan valores de D.O. más altos, que no se pueden atribuir a la contaminación.

Los ejemplos de resultados obtenidos por el uso del esquema de aplicación sobre los ensayos Enzygnost[®] aparecen resumidos, para HBsAg, en la Tabla 1 (antes de la aplicación del procedimiento según la invención), y en la Tabla 16 (tras la implementación de la invención).

TABLA 1

Enzygnost HIV Integral

Ensayo de 30 muestras positivas en posiciones E1-B5, 58 muestras negativas en posición C5-D12 Controles negativos en posición A1-C1, controles positivos en posición D1 y E12-H12 Corte = 500 mE (0,5 D.O.)													
		Banda:											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Fila:	A	751	3000	3000	3000	3000	28	130	3000	31	29	62	26
	B	49	3000	3000	3000	3000	46	33	39	41	25	40	27
	C	269	3000	3000	3000	47	40	42	32	33	37	33	28
	D	1485	3000	3000	3000	46	36	29	31	31	28	25	44
	E	3000	3000	3000	3000	33	60	41	41	48	185	25	1045
	F	3000	3000	3000	3000	1366	222	1164	34	32	38	27	988
	G	3000	3000	3000	3000	33	103	157	40	37	33	30	1078
	H	3000	3000	3000	3000	37	36	93	31	30	59	40	993

Los valores representan las extinciones en mE, tal como han sido medidas con una longitud de onda de medición de 450

TABLA 2

Enzygnost HBsAg 5.0

Ensayo de 20 muestras positivas en posiciones E1-H3, 71 muestras negativas en posición A4-G12 Controles negativos en posición A1-C1, controles positivos en posición D1 y H12 Corte = 85 mE correspondientes = 0,085 D.O.													
		Banda:											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Fila:	A	33	3000	3000	20	24	24	16	19	19	26	23	24
	B	34	3000	3000	15	20	15	51	21	17	22	26	26
	C	38	3000	3000	77	22	14	16	13	17	17	3000	26
	D	1802	3000	3000	20	21	17	15	21	15	44	24	40
	E	3000	3000	3000	18	17	24	16	24	268	21	22	58
	F	3000	3000	3000	21	18	21	18	20	19	18	21	41
	G	3000	3000	3000	50	16	720	21	17	27	25	21	26
	H	3000	3000	3000	13	17	17	21	258	207	3000	20	1565

Los valores representan las extinciones en mE, tal como han sido medidas con una longitud de onda de medición de 450

ES 2 331 725 T3

TABLA 3

Enzygnost Toxoplasmosis IgG

5

10

15

20

25

Ensayo de 21 muestras positivas en posiciones D1-H3, 71 muestras negativas en posición A4-G12 Controles negativos en posición A1-B1, controles positivos en posición C1 y H12 Corte = 100 mE correspondiente = 0,1 D.O.													
Banda:													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Fila:	A	20	1515	2225	70	27	67	35	57	29	67	41	25
	B	27	1977	1393	23	35	54	44	28	51	44	35	53
	C	1603	1719	2514	31	43	27	36	31	30	39	29	33
	D	2119	2389	1925	50	69	31	42	65	49	59	28	47
	E	1629	2292	1865	27	29	49	51	26	53	29	52	38
	F	1266	2112	1896	35	46	45	43	46	57	36	48	62
	G	1957	2367	1476	28	58	28	54	39	32	33	43	28
	H	2091	2115	1993	40	53	25	56	70	29	41	41	1753
Los valores representan las extinciones en mE, tal como han sido medidas con una longitud de onda de medición de 450													

TABLA 4

Enzygnost Anti-Virus de la Rubéola/IgG

30

35

40

45

50

55

Ensayo de 15 muestras positivas en posiciones B1-H4, 31 muestras negativas en posición A5-G12 Controles negativos en posición A1/A2 y H11/H12 Corte = 100 mE correspondiente = 0,1 D.O.													
Banda:													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Fila:	A		1355		1440		4		2		1		5
	B		2629		1129		2		4		9		12
	C		2322		2189		5		11		5		9
	D		1910		1426		2		3		7		4
	E		1470		1443		10		2		8		10
	F		1197		2032		5		1		5		3
	G		953		1743		6		5		4		2
	H		646		1977		5		4		3		1223
Los valores representan las extinciones diferenciales en mE entre la señal específica (recubrimiento antigénico de las filas 1, 3, 5, 7, 9 y 11) y la señal inespecífica (antígeno de control de las filas 2, 4, 6, 8, 10 y 12)													

ES 2 331 725 T3

TABLA 5

Enzygnost Anti-HSV/IgG

5

10

15

20

25

Ensayo de 15 muestras positivas en posiciones B1-H4, 31 muestras negativas en posición A5-G12 Controles negativos en posición A1/A2 y H11/H12 Corte = 100 mE correspondiente = 0,1 D.O.													
Banda:													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Fila:	A		1541		1440		50		24		32		32
	B		2239		1359		45		11		33		19
	C		1833		782		40		26		26		23
	D		1791		1921		46		33		27		31
	E		1089		1533		49		41		33		36
	F		1204		1171		33		39		19		29
	G		1089		1714		29		35		28		35
	H		1791		1519		42		28		17		1405
Los valores representan las extinciones diferenciales en mE entre la señal específica (recubrimiento antigénico de las filas 1, 3, 5, 7, 9 y 11) y la señal inespecífica (antígeno de control de las filas 2, 4, 6, 8, 10 y 12)													

TABLA 6

Modelo B según el Ejemplo 2

30

35

40

45

50

55

60

65

La placa estuvo en posición C de la Fig. 3													
Banda:													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Fila:	A	96	96	93	96	10	10	10	10	10	10	10	11
	B	97	96	96	98	10	10	10	9	10	10	10	10
	C	98	98	96	97	10	10	10	10	10	10	10	10
	D	94	97	94	109	10	10	10	11	10	10	10	10
	E	93	93	103	93	9	37	17	12	10	10	10	10
	F	95	98	98	97	10	266	19	10	10	10	9	9
	G	98	95	99	98	10	309	11	10	10	10	10	10
	H	94	99	95	97	1389	2039	11	11	10	11	11	11
Los valores representan las extinciones en mE, medidas a una longitud de onda de medición de 450													

ES 2 331 725 T3

TABLA 7

Modelo B según el Ejemplo 2

5

10

15

20

La placa estuvo en posición B de la Fig. 3												
Banda:												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Fila: A	15	15	2886	15	14	1005	14	15	15	17	15	15
B	15	15	15	15	1179	15	18	2763	14	14	14	15
C	15	15	15	17	14	1782	15	15	15	3000	15	15
D	15	14	14	15	14	14	14	14	15	14	14	13
E	14	14	14	15	18	14	14	13	18	14	14	16
F	15	14	15	14	21	15	14	14	17	16	16	16
G	15	15	14	14	3000	15	15	18	17	17	14	17
H	16	15	15	15	20	15	15	14	17	18	14	17

Los valores representan las extinciones en mE, medidas a una longitud de onda de medición de 450

25

TABLA 8

Modelo B según el Ejemplo 2

30

35

40

45

50

La placa estuvo en posición A de la Fig. 3												
Banda:												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Fila: A	14	13	14	14	14	13	15	15	14	13	13	14
B	15	14	15	14	15	15	13	15	14	14	14	34
C	15	14	14	14	14	14	13	14	14	14	14	14
D	13	13	14	15	14	28	13	13	30	13	12	36
E	13	14	14	13	14	14	19	14	14	17	125	14
F	14	13	13	13	13	33	33	23	18	18	535	19
G	14	14	14	13	13	22	13	30	18	17	547	23
H	15	14	19	14	13	14	27	38	37	35	343	21

Los valores representan las extinciones en mE, medidas a una longitud de onda de medición de 450

55

60

65

ES 2 331 725 T3

TABLA 9

Modelo B según el Ejemplo 2, bajo los perfiles de dispensación optimizados de la Figura 7

5

10

15

20

25

La placa estuvo en posición C de la Fig. 3													
Banda:													
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12													
Fila:	A	98	97	98	98	11	12	12	11	11	11	12	12
	B	99	99	99	99	11	11	12	12	12	11	11	11
	C	101	97	97	104	11	11	11	11	11	11	11	11
	D	107	99	99	99	11	11	11	11	11	11	11	11
	E	99	98	98	98	11	10	11	11	10	11	11	11
	F	97	98	98	97	11	11	11	11	12	11	11	11
	G	98	98	98	97	11	11	11	11	11	11	11	11
	H	98	98	98	98	11	12	12	12	12	12	12	12

Los valores representan las extinciones en mE, medidas a una longitud de onda de medición de 450

30

TABLA 10

Modelo B según el Ejemplo 2, bajo los perfiles de dispensación optimizados de la Figura 7

35

40

45

50

55

60

65

La placa estuvo en posición B de la Fig. 3													
Banda:													
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12													
Fila:	A	16	17	16	16	16	16	17	17	17	16	16	16
	B	17	17	18	16	16	17	17	17	17	17	17	17
	C	15	17	17	16	16	16	16	15	17	17	16	16
	D	16	16	16	15	16	16	16	16	16	16	15	16
	E	16	15	15	14	15	16	16	18	17	16	15	15
	F	12	12	12	12	14	12	12	12	15	12	12	12
	G	16	15	16	15	15	16	16	16	19	17	16	16
	H	17	17	16	16	16	16	16	16	20	958	17	16

Los valores representan las extinciones en mE, medidas a una longitud de onda de medición de 450

ES 2 331 725 T3

TABLA 11

Modelo B según el Ejemplo 2, bajo los perfiles de dispensación optimizados de la Figura 7

5

10

15

20

La placa estuvo en posición A de la Fig. 3																				
Banda:																				
Fila:	A	B	C	D	E	F	G	H	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	A	17	18	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	16	16	17	16
	B	17	17	17	17	17	16	16	18	17	16	17	16	16	18	17	16	16	17	16
	C	16	16	16	16	17	16	16	15	16	16	16	16	16	15	16	16	16	16	16
	D	16	16	16	16	17	16	16	16	16	16	16	17	16	16	16	3000	18	17	17
	E	16	15	16	16	15	15	83	16	15	15	15	15	15	16	15	15	15	15	18
	F	15	15	16	15	15	16	48	16	3000	16	19	14	14	16	16	3000	16	19	14
	G	16	15	16	15	15	15	29	15	65	423	21	14	14	15	15	65	423	21	14
	H	16	16	15	1443	16	16	31	2220	1015	14	20	16	16	31	2220	1015	14	20	16

25

Los valores representan las extinciones en mE, medidas a una longitud de onda de medición de 450

TABLA 12

Modelo B según el Ejemplo 2 (tras la optimización de los perfiles de aspirado y dispensación)

30

35

40

45

50

La placa estuvo en posición B de la Fig. 3																				
Banda:																				
Fila:	A	B	C	D	E	F	G	H	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	A	36	37	37	36	35	35	35	35	35	35	37	35	35	35	35	35	35	37	35
	B	35	35	34	35	35	34	35	49	35	35	34	35	34	35	49	35	35	34	35
	C	36	34	36	36	35	35	35	35	34	35	36	35	35	35	34	35	35	36	35
	D	34	35	36	34	35	34	35	34	36	34	34	35	34	35	34	36	34	34	34
	E	33	34	35	35	34	34	35	34	34	35	33	34	34	35	34	32	34	33	34
	F	32	34	34	35	33	33	36	34	33	53	35	34	33	36	34	33	53	35	34
	G	33	33	34	34	34	34	36	35	35	34	33	34	34	36	35	35	34	33	35
	H	33	35	35	34	34	34	37	33	34	34	35	34	34	37	33	34	34	35	35

55

60

65

Los valores representan las extinciones en mE, medidas a una longitud de onda de medición de 450

ES 2 331 725 T3

TABLA 13
Modelo B según el Ejemplo 2

5

10

15

20

La placa estuvo en posición A de la Fig. 3													
Banda:													
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12													
Fila:	A	8	7	7	7	4	4	8	6	7	7	7	599
	B	7	8	7	8	8	7	8	11	9	7	8	7
	C	7	7	7	7	7	7	8	7	7	7	1052	7
	D	8	8	7	7	7	7	8	8	8	7	1074	7
	E	8	7	9	7	7	32	180	7	8	118	49	7
	F	7	7	20	7	7	93	185	6	7	122	104	8
	G	9	8	32	7	7	165	77	8	7	54	151	8
	H	0	6	55	7	5	142	72	687	6	596	297	8

Los valores representan las extinciones en mE, medidas a una longitud de onda de medición de 450

TABLA 14
Modelo B según el Ejemplo 2

35

40

45

50

La placa estuvo en posición B de la Fig. 3													
Banda:													
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12													
Fila:	A	8	9	8	8	7	8	9	8	7	7	7	8
	B	8	7	9	8	9	8	11	8	8	10	9	8
	C	8	8	8	8	8	8	8	8	77	8	7	7
	D	9	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	E	8	8	8	8	8	7	7	8	8	8	8	8
	F	8	8	8	8	8	8	7	8	8	8	8	8
	G	13	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	7
	H	6	8	8	8	7	8	8	8	8	8	8	8

Los valores representan las extinciones en mE, medidas a una longitud de onda de medición de 450

ES 2 331 725 T3

TABLA 15

Modelo B según el Ejemplo 2

La placa estuvo en posición C de la Fig. 3

		Banda:											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Fila:	A	101	103	103	102	7	7	8	7	6	7	7	8
	B	104	102	102	105	8	7	7	8	7	8	8	8
	C	103	103	102	103	7	6	7	7	7	7	7	7
	D	102	104	104	103	7	7	6	7	7	7	7	7
	E	102	102	103	103	7	6	7	7	6	7	15	22
	F	102	102	102	104	6	6	5	6	6	6	41	30
	G	102	103	102	103	7	7	7	7	7	7	33	22
	H	101	104	103	103	7	6	6	7	7	7	29	18

Los valores representan las extinciones en mE, medidas a una longitud de onda de medición de 450

TABLA 16

Enzygnost HBsAg 5.0 (Placa en posición A bajo perfiles del pipetor optimizados, así como recubrimiento de la FAS)

Ensayo de 20 muestras positivas en posiciones E1-H3, 71 muestras negativas en posición A4-G12
 Controles negativos en posición A1-C1, controles positivos en posición D1 y H12
 Corte = 87 mE correspondientes = 0,087 D.O.

		Banda:											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Fila:	A	57	1111	1120	21	25	29	23	34	25	20	29	38
	B	57	2826	959	29	24	34	22	36	32	28	30	35
	C	55	2630	2968	24	29	24	31	24	17	25	27	39
	D	1398	3000	3000	27	27	22	48	26	27	22	31	58
	E	3000	3000	3000	28	21	24	23	33	23	17	31	28
	F	3000	3000	3000	23	24	28	47	33	29	23	38	29
	G	3000	3000	3000	22	25	31	24	43	22	57	40	30
	H	2800	2012	3000	22	29	28	29	29	31	19	26	1063

Los valores representan las extinciones en mE, tal como han sido medidas con una longitud de onda de medición de 450

ES 2 331 725 T3

TABLA 17

Enzygnost HIV Integral (Placa en posición A bajo perfiles de pipetor optimizados, así como recubrimiento de la FAS)

5

10

15

20

25

Ensayo de 30 muestras pos. en posiciones E1-H3 y E6-F7, 61 muestras neg. en posición A4-D6 y G7-G12 Controles negativos en posición A1-C1, controles positivos en posición D1 y H12 Corte = 510 mE correspondientes = 0,5 D.O.													
Banda:													
Fila:	A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	A	60	2857	2863	34	31	38	2906	34	38	33	33	38
	B	62	2945	2958	47	38	36	2983	39	33	36	39	33
	C	60	3000	3000	36	34	53	3000	38	43	29	49	39
	D	1877	3000	3000	458	34	50	3000	30	28	33	44	31
	E	3000	3000	3000	44	37	3000	3000	32	41	37	28	36
	F	3000	3000	3000	37	30	3000	3000	29	44	27	27	30
	G	3000	3000	3000	41	38	3000	41	30	79	32	30	29
	H	3000	3000	3000	32	49	3000	27	33	34	27	30	1091

Los valores representan las extinciones en mE, tal como han sido medidas con una longitud de onda de medición de 450

TABLA 18

Enzygnost HBsAg 5.0 (Posición A)

30

35

40

45

50

55

60

65

Ensayo de 20 muestras positivas en posiciones E1-H3, 71 muestras negativas en posición A4-G12 Controles negativos en posición A1-C1, controles positivos en posición D1 y H12 Corte = 105 mE correspondientes = 0,105 D.O.													
Banda:													
Fila:	A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	A	59	2877	2855	76	68	68	69	62	62	71	64	62
	B	57	2936	2946	82	69	71	74	82	69	71	70	81
	C	49	3000	3000	77	73	69	70	67	65	77	67	67
	D	2954	3000	3000	68	70	75	69	70	67	68	77	72
	E	3000	3000	3000	74	89	68	71	68	77	73	74	73
	F	3000	3000	3000	77	74	70	78	71	72	71	70	74
	G	3000	3000	3000	127	68	68	73	70	71	75	69	78
	H	3000	3000	3000	62	60	57	57	68	69	67	66	969

Los valores representan las extinciones en mE, tal como han sido medidas con una longitud de onda de medición de 450

ES 2 331 725 T3

TABLA 19

Enzygnost HBsAg 5.0 (Distribución de muestras con RSP 150 de la compañía Tecan)

Ensayo de 18 muestras positivas en posiciones E1-H3, 71 muestras negativas en posición A4-G12 Controles negativos en posición A1-C1, controles positivos en posición D1 y H12 Corte = 96 mE correspondientes = 0,096 D.O.													
Banda:													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Fila:	A	43	vacía	2380	16	23	20	21	17	28	18	22	21
	B	33	3000	3000	40	25	33	22	21	17	18	16	19
	C	62	2367	3000	203	25	19	27	16	18	21	15	19
	D	1758	3000	3000	21	24	22	16	22	20	16	20	21
	E	3000	3000	3000	22	22	25	38	24	20	19	20	23
	F	3000	3000	3000	460	26	28	23	32	22	23	21	22
	G	3000	3000	3000	1264	24	29	22	25	25	30	26	28
	H	vacía	3000	3000	29	30	25	28	23	25	27	24	1535
Los valores representan las extinciones en mE, tal como han sido medidas con una longitud de onda de medición de 450													

TABLA 20

Enzygnost HBsAg 5.0 (Distribución de muestras con RSP 150 de la Compañía Tecan)

Ensayo de 18 muestras positivas en posiciones E1-H3, 71 muestras negativas en posición A4-G12 Controles negativos en posición A1 y C1, controles positivos en posición D1 y H12 Corte = 80 mE correspondientes = 0,080 D.O.													
Banda:													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Fila:	A	32	vacía	2387	15	25	18	20	16	24	16	25	21
	B	vacía	3000	2633	58	17	20	19	17	15	18	18	18
	C	27	2586	3000	18	25	18	24	19	16	18	15	22
	D	1693	3000	3000	19	24	22	17	24	19	15	23	21
	E	3000	3000	3000	22	21	22	43	23	20	19	22	24
	F	3000	3000	3000	28	26	25	23	33	18	24	22	25
	G	3000	3000	3000	30	24	26	250	26	23	25	26	34
	H	vacía	2943	3000	28	30	22	25	24	20	28	27	1717
Los valores representan las extinciones en mE, tal como han sido medidas con una longitud de onda de medición de 450													

ES 2 331 725 T3

TABLA 21

Enzygnost Anti-HBs II

5

10

15

20

25

Ensayo de 20 muestras positivas en posiciones F1-A4, 70 muestras negativas en posición B4-G12 Controles negativos en posición A1-D1, controles positivos en posición E1 y H12 Corte = 136 mE correspondientes = 0,136 D.O.													
Banda:													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Fila:	A	58	3000	3000	3000	74	53	77	45	76	67	50	68
	B	57	3000	3000	58	53	56	64	67	64	86	98	100
	C	52	3000	3000	62	57	87	99	92	55	79	62	85
	D	62	3000	3000	81	89	63	72	81	61	51	73	71
	E	1346	3000	3000	56	87	50	100	49	99	66	68	57
	F	3000	3000	3000	72	69	91	68	56	49	73	59	66
	G	3000	3000	3000	90	91	57	59	64	66	48	51	63
	H	3000	3000	3000	81	61	53	97	71	58	66	67	1173

Los valores representan las extinciones en mE, tal como han sido medidas con una longitud de onda de medición de 450

TABLA 22

Enzygnost Anti-HAV (Principio experimental: Competición)

30

35

40

45

50

55

Ensayo de 20 muestras positivas en posiciones F1-A4, 70 muestras negativas en posición B4-G12 Controles negativos en posición A1-D1, controles positivos en posición E1 y H12 Corte = 672 mE correspondientes = 0,672 D.O.													
Banda:													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Fila:	A	1481	34	50	31	1252	1514	1422	1340	1256	1465	1424	1387
	B	1243	31	27	1476	1468	1355	1387	1388	1434	1422	1228	1439
	C	1304	47	157	1501	1384	1333	1452	1245	1366	1345	1615	1313
	D	1354	29	99	1210	1131	1185	1374	1392	1472	1266	1532	1298
	E	177	27	128	1439	1423	1381	1123	1102	1368	1421	1557	1401
	F	40	27	53	1435	1355	1395	1513	1327	1525	1555	1477	1523
	G	34	47	28	1454	1135	1253	1405	1268	1398	1199	1456	1333
	H	98	25	29	1414	1293	1361	1360	1250	1436	1367	1399	159

Los valores representan las extinciones en mE, tal como han sido medidas con una longitud de onda de medición de 450

ES 2 331 725 T3

TABLA 23

Enzygnost HBe monoclonal (Principio experimental: Competición)

5

10

15

20

25

Ensayo de 26 muestras positivas en posiciones F1-G4, 64 muestras negativas en posición H4-G12 Controles negativos se encuentran en posición A1-D1, controles positivos en posición E1 y H12 Corte = 902 mE correspondientes = 0,902 D.O.												
Banda:												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Fila: A	1867	13	17	15	1672	1670	1689	1651	1626	1605	1606	1628
B	1851	13	15	13	1628	1701	1717	1649	1634	1632	1568	1666
C	1713	12	14	14	1701	1649	1633	1653	1601	1619	1650	1687
D	1792	14	21	408	1688	1770	1700	1657	1564	1618	1639	1671
E	17	17	14	14	1655	1650	1740	1570	1679	1521	1567	1639
F	14	23	15	15	1622	1615	1648	1666	1555	1685	1608	1694
G	22	22	21	17	1317	1715	1607	1645	1538	1544	1592	1616
H	18	15	16	1639	1684	1691	1674	1533	1578	1667	1710	18

30

35

40

45

50

55

60

65

Los valores representan las extinciones en mE, tal como han sido medidas con una longitud de onda de medición de 450

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para reducir la contaminación de vasos de reacción vacíos o que ya están cargados con un material de muestra libre de analitos o que los contiene en concentraciones reducidas, en vasos de reacción dispuestos en proximidad espacial entre sí, durante el suministro con pipeta de muestras o reactivos a través de un dispensador automático de muestras, **caracterizado** porque se determina, en primer lugar, el grado de contaminación utilizando un ensayo de enzima/sustrato-colorante, mediante el siguiente modelo A:

- c) Adición de una solución enzimática a los vasos de reacción de una parte de la citada disposición espacial, en tanto que los restantes vasos de reacción se recubren con un material que forma capas de absorción que contiene un reactivo apropiado de cromógeno/reactivo de sustrato, mediante cuyo contacto con la enzima se desencadena una reacción cromática,
- d) Determinación del número, intensidad y/o distribución de los vasos de reacción que se distinguen por el desarrollo de coloración,

y, seguidamente, se modifican la absorción de líquido (perfil de aspiración) y la dispensación de líquido (perfil de dispensación), de tal manera que se reduce el número o la intensidad de los vasos de reacción que se distinguen por el desarrollo de coloración.

2. Procedimiento para reducir la contaminación de vasos de reacción vacíos o que ya están cargados con un material de muestra libre de analitos o que los contiene en concentraciones reducidas, en vasos de reacción dispuestos en proximidad espacial entre sí, durante el suministro con pipeta de muestras o reactivos a través de un dispensador automático de muestras, **caracterizado** porque se determina, en primer lugar, el grado de contaminación utilizando un ensayo de enzima/sustrato-colorante, mediante el siguiente modelo B:

- a) Adición de una solución enzimática a los vasos de reacción de una parte de la citada disposición espacial;
- b) Adición de un reactivo apropiado de cromógeno/sustrato que, en contacto con la enzima, desencadena una reacción cromática, a los vasos de reacción de la parte restante de dicha disposición espacial,
- c) Cálculo de la contaminación posible mediante la determinación de la coloración obtenida en los vasos de reacción;

y, a continuación, se modifican la absorción de líquido (perfil de aspiración) y la liberación de líquido (perfil de dispensación), de tal manera que disminuye el número o la intensidad de los vasos de reacción que se distinguen por el desarrollo de coloración.

3. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que los vasos de reacción son las cavidades de una placa de microtitulación.

4. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que los vasos de reacción son cavidades de una placa de microtitulación.

5. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que:

- a) El dispensador automático de muestras forma parte de un sistema completamente automatizado para la realización automática de un procedimiento para la determinación de un analito; y
- b) la disposición de vasos de reacción situados en proximidad espacial entre sí, consiste en una secuencia lineal y en un plano horizontal de 4 placas de microtitulación: posición A, posición B, posición C y posición D; y
- c) muy próxima a la posición A está situada una estación de residuos líquidos (FAS), que constituye una prolongación aproximada de la línea imaginaria desde la posición D hasta la posición A; e
- d) la adición de la solución enzimática se lleva a cabo en una región parcial de la placa de microtitulación en las posiciones A hasta D; y
- e) la determinación de la contaminación posible, incluida en especial la contaminación procedente de la estación de residuos líquidos (FAS).

6. Procedimiento según la reivindicación 5, en el que la estación de residuos líquidos (FAS) se cubre con un recubrimiento superior, que incluye una abertura de las menores dimensiones posibles, de modo que, por una parte, ofrece una protección óptima contra las salpicaduras generadas en la estación de residuos líquidos (FAS), aunque, por otra parte, resulta posible la evacuación, de manera reproducible, del exceso del volumen de muestras a través de esta abertura hacia la estación de residuos líquidos (FAS), de forma que el líquido no entra en contacto inadvertidamente con los bordes de la abertura.

ES 2 331 725 T3

7. Procedimiento según la reivindicación 6, en el que la estación de residuos líquidos (FAS) está conformada desde el principio de tal manera que las paredes superiores de los vasos se corresponden con el recubrimiento, de forma que se puede prescindir de un recubrimiento separado, mientras se mantiene su funcionalidad.

5 8. Procedimiento según la reivindicación 6, en el que la estación de residuos líquidos (FAS) está separada de las placas de microtitulación recubiertas por la incorporación de un dispositivo de protección mecánico entre la estación de residuos líquidos y las posiciones de estas placas, con lo que se evita la contaminación.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Fig. 1

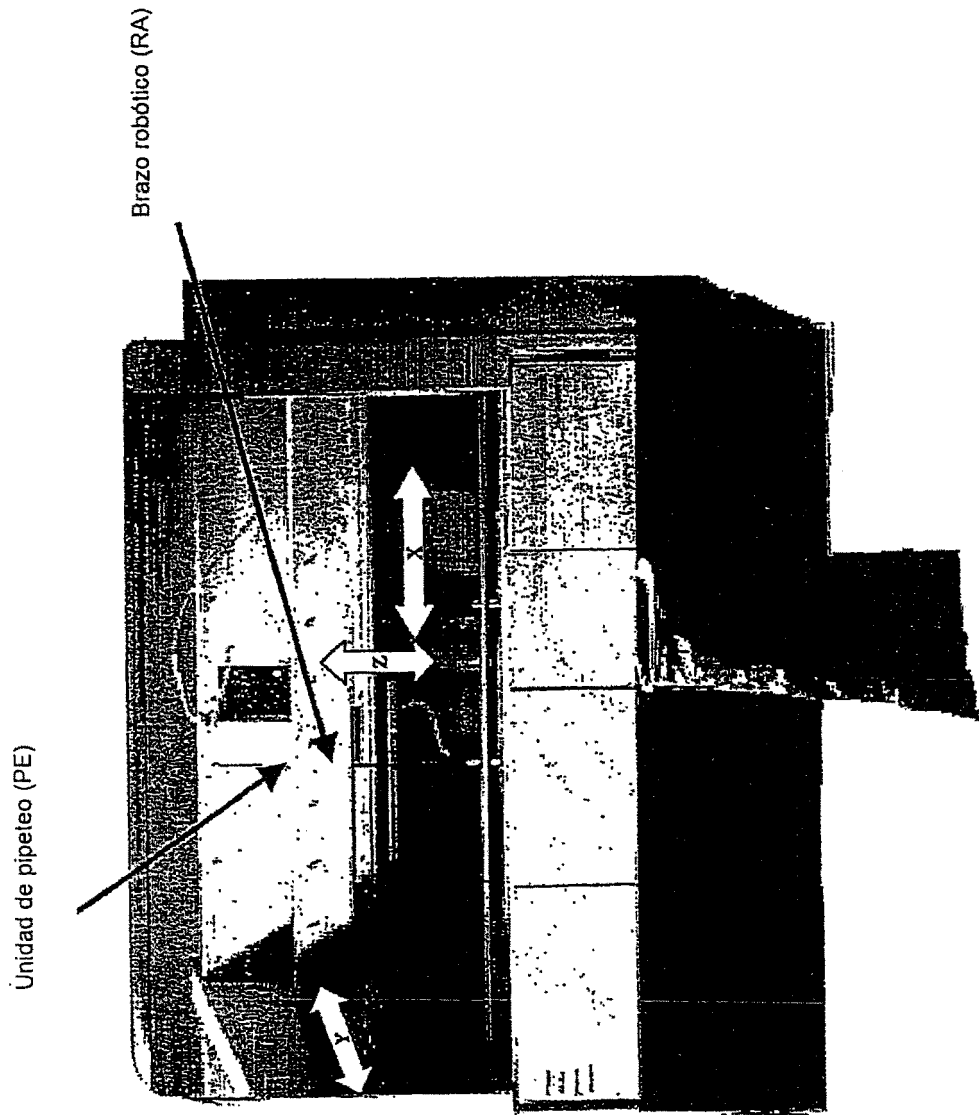


Fig. 2

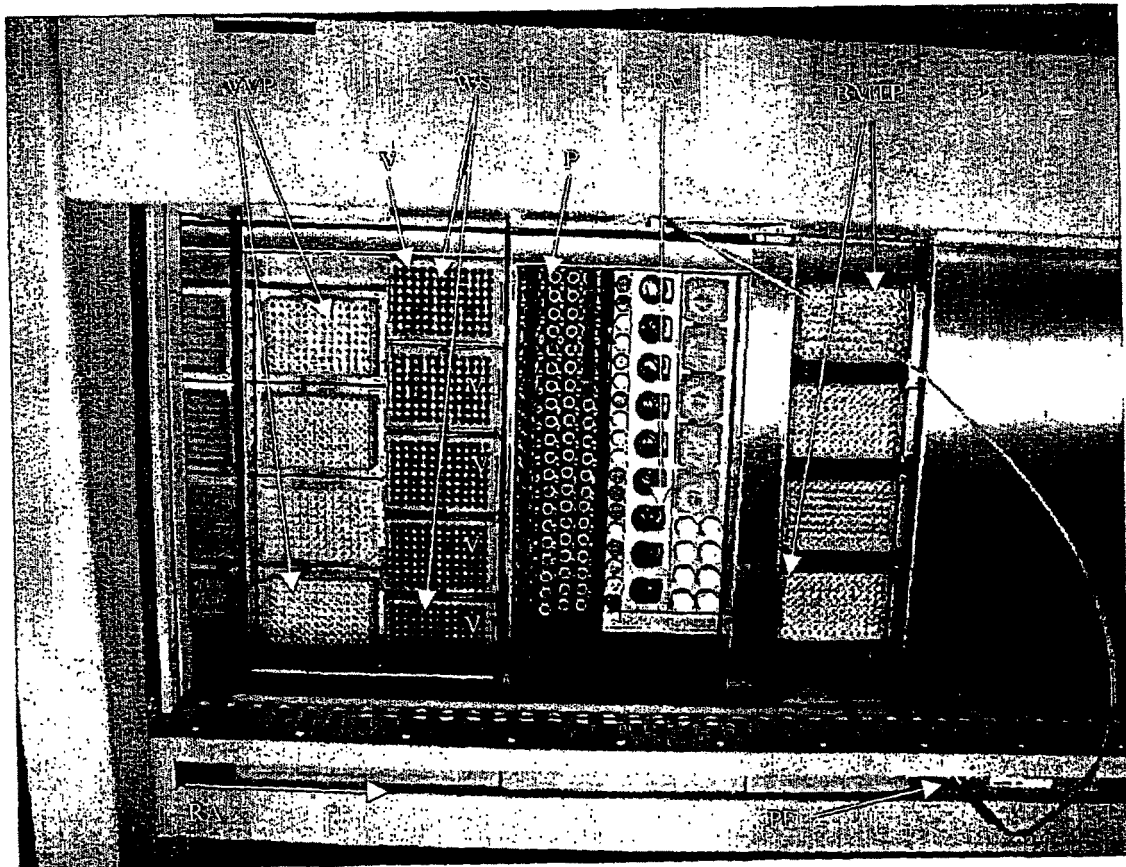


Fig. 3: Procesos de BEP-2000

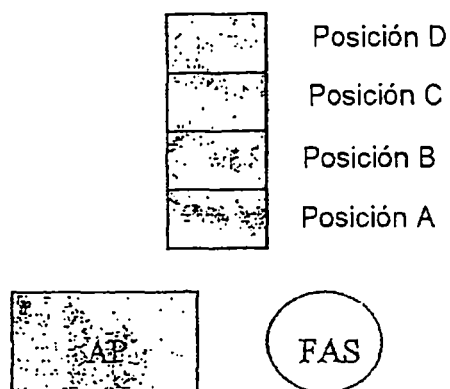


Fig. 4: Posiciones de los pocillos en la MTP (Placa de Microtitulación)

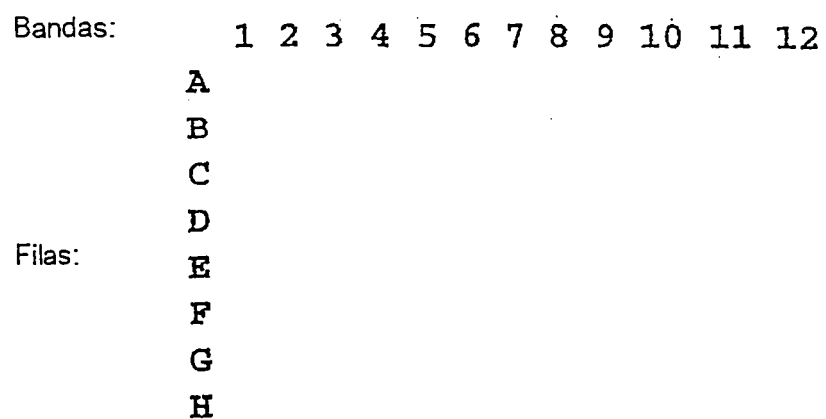


Fig. 5

Establecimiento del sistema

Sistema | Incubadores | Colorímetro | Luminómetro Pipeta | Armario de muestras | Lavadero | Transporte de placas | Notificaciones

Opciones	Placas de Dilución	Tubos de Dilución	Información
Volumen jeringa: 1000 μ l	Coordenadas: mlpd2.mpc	Vol. Máximo: 10000 μ l	Versión Programa fijo ?
<input checked="" type="checkbox"/> Puntas desechables	Volumen Máximo: 450 μ l	Vol. Mínimo: 100 μ l	Optimizar Programa fijo
<input checked="" type="checkbox"/> Permitir detección de grumos	Volumen Mínimo: 115 μ l		
<input checked="" type="checkbox"/> Permitir detección nivel de líquido			
Perfil de Aspiración		Perfil de Dispensación	
Perfil número: 0	Velocidad retirada: 10 %	Perfil número: 3	
Descripción: Multi Disp Asp	Retirada (puntas): 400 Etapas	Descripción: Med Vol 50ul-300ul	
Velocidad inicial: 500 Hz	Etapas inmersión: 0 Etapas	Velocidad inicial: 800 Hz	
Velocidad máxima: 1000 Hz	Velocidad LLD: 100 %	Velocidad máxima: 2000 Hz	
Aceleración: 2 x2.5 kHz/s	Separación Transporte: 10 μ l	Aceleración: 20 x2.5 kHz/s	
Separación aérea: 0 μ l	Retraso Aspiración: 5 x 0.1 s	Velocidad de corte: 2000 Hz	
Lavado activo		Velocidad retirada: 10 %	
Velocidad retirada: 5 %		Retirada (puntas): 500 Etapas	
Retirada (puntas): 500 Etapas		Reempapamiento: 20 μ l	
		Retraso dispensación: 2 x 0.1 s	

Fig. 6

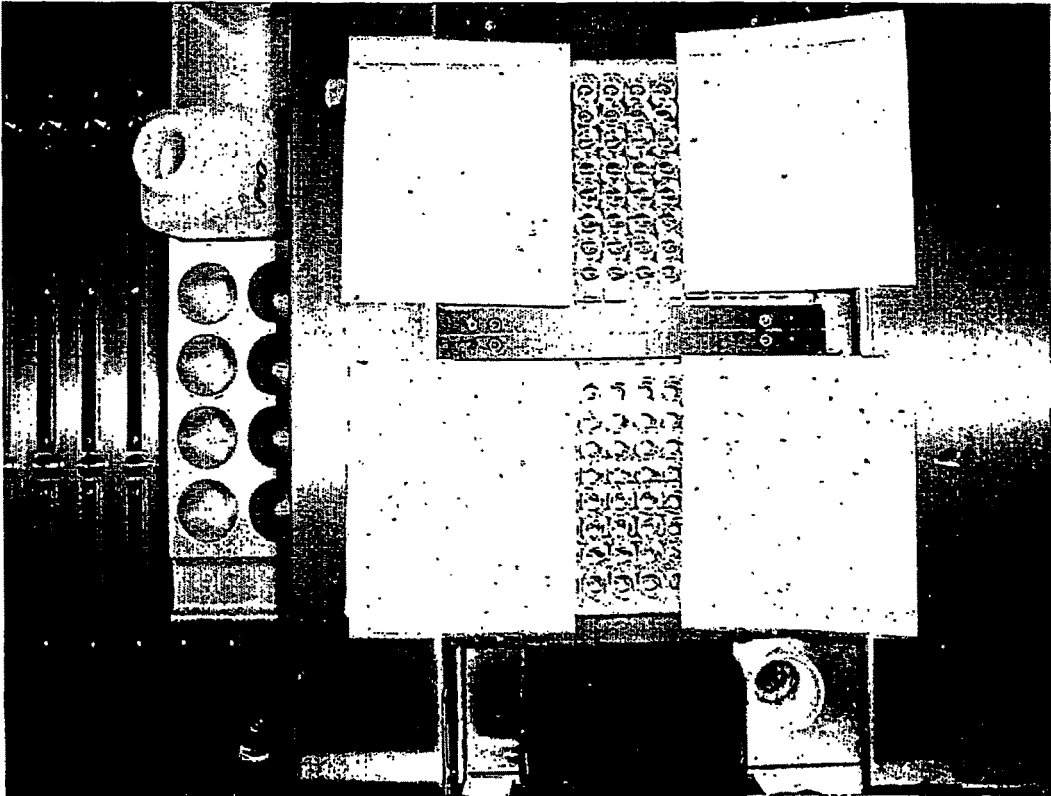


Fig. 7

x]

Sistema | Incubadores | Colorímetro | Luminómetro | Pipeta | Armario de Muestras | Lavadero | Transporte Placas | Notificaciones

Opciones	Placas de Dilución	Tubos de Dilución	Información
Volumen jeringa: 1000 µl	Coordenadas: mtpd12.mpc	Vol. Máximo: 10000 µl	Versión Programa fijo ?
<input checked="" type="checkbox"/> Puntas desechables	Volumen Máximo: 450 µl	Vol. Mínimo: 100 µl	
<input checked="" type="checkbox"/> Permitir detección grumos	Volumen Mínimo: 115 µl		Upgrade Firmware
<input checked="" type="checkbox"/> Permitir detección nivel de líquidos			
Perfil de Aspiración		Perfil de Dispensación	
Perfil número: 0	Velocidad retirada: 10 %	Perfil número: 6	
Descripción: Multi Disp Asp	Retirada (puntas): 400 Etapas	Descripción: Ensayo 4	
Velocidad inicial: 500 Hz	Etapas Inmersión: 0 Etapas	Velocidad inicial: 400 Hz	
Velocidad máxima: 1000 Hz	Velocidad L.L.D.: 100 %	Velocidad máxima: 900 Hz	
Aceleración: 2 x2.5 kHz/s	Separación Transporte: 10 µl	Aceleración: 5 x2.5 kHz/s	
Separación aérea: 0 µl	Retraso Aspiración: 5 x 0.1 s	Velocidad corte: 900 Hz	
Lavado activo		Velocidad retirada: 1 %	
Velocidad retirada: 5 %		Retirada (puntas): 500 Etapas	
Retirada (puntas): 500 Etapas		Reempapamiento: 20 µl	
		Retraso dispensación: 2 x 0.1 s	

Fig. 8

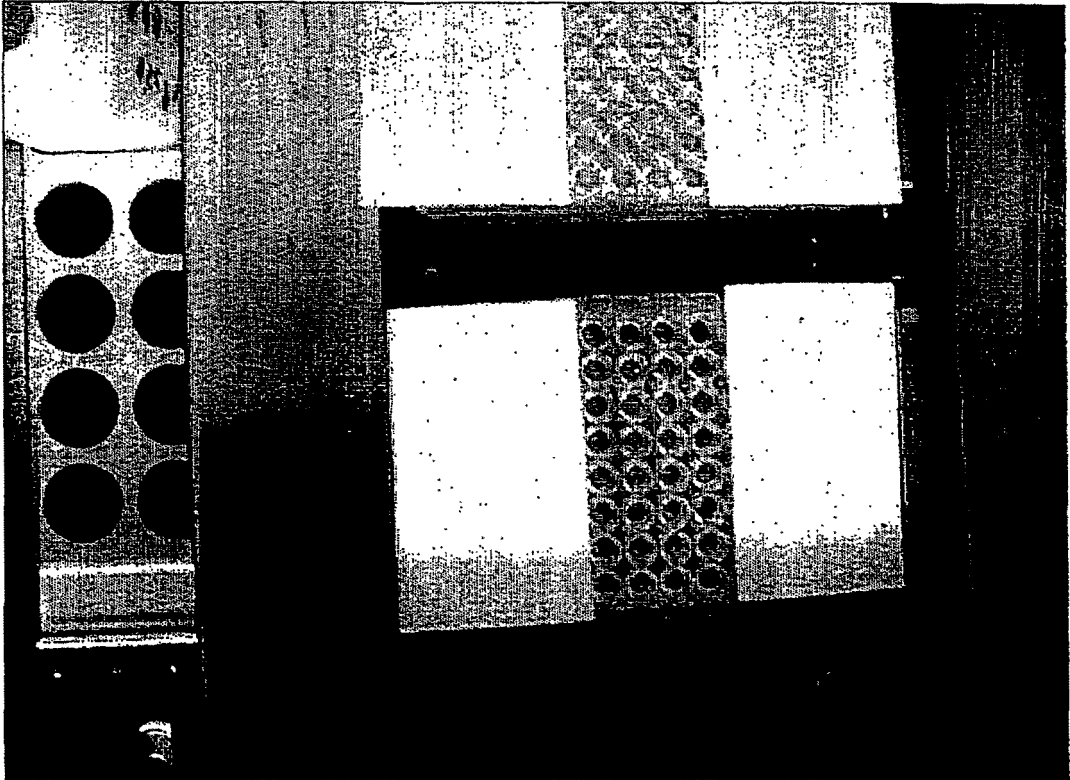


Fig. 9

✕

Sistema | Incubadores | Colorímetro | Luminómetro | Pipeta | Armario de Muestras | Lavadero | Transporte de Placas | Notificaciones

Opciones	Placas de Dilución	Tubos de Dilución	Información
Volumen jeringa: <input type="text" value="1000"/> μ	Coordenadas: <input type="text" value="mlpdr2.mpc"/>	Vol. Máximo: <input type="text" value="10000"/> μ	Versión Programa fijo ?
<input checked="" type="checkbox"/> Puntas desechables	Volumen Máximo: <input type="text" value="450"/> μ	Vol. Mínimo: <input type="text" value="100"/> μ	Optimización Programa Fijo
<input checked="" type="checkbox"/> Permitir detección grumos	Volumen Mínimo: <input type="text" value="115"/> μ		
<input checked="" type="checkbox"/> Permitir detección nivel de líquido			
Perfil de Aspiración		Perfil de Dispensación	
Perfil número: <input type="text" value="5"/>	Velocidad retirada: <input type="text" value="1"/> %	Perfil número: <input type="text" value="6"/>	
Descripción: <input type="text" value="Versuch1"/>	Retirada (puntas): <input type="text" value="400"/> Etapas	Descripción: <input type="text" value="Ensayo 2"/>	
Velocidad inicial: <input type="text" value="200"/> Hz	Etapas Inmersión: <input type="text" value="0"/> Etapas	Velocidad inicial: <input type="text" value="900"/> Hz	
Velocidad máxima: <input type="text" value="300"/> Hz	Velocidad LLD: <input type="text" value="100"/> %	Velocidad máxima: <input type="text" value="900"/> Hz	
Aceleración: <input type="text" value="2"/> x2.5 kHz/s	Separación Transporte: <input type="text" value="10"/> μ	Aceleración: <input type="text" value="5"/> x2.5 kHz/s	
Separación aérea: <input type="text" value="0"/> μ	Retraso aspiración: <input type="text" value="5"/> x 0,1 s	Velocidad corte: <input type="text" value="900"/> Hz	
Lavado activo		Velocidad retirada: <input type="text" value="1"/> %	
Velocidad retirada: <input type="text" value="5"/> %		Retirada (puntas): <input type="text" value="500"/> Etapas	
Retirada (puntas): <input type="text" value="0"/> Etapas		Reempapamiento: <input type="text" value="20"/> μ	
		Retraso dispensación: <input type="text" value="2"/> x 0,1 s	

Fig. 10: Ejemplo de un recubrimiento
Sección transversal/
Vista desde arriba

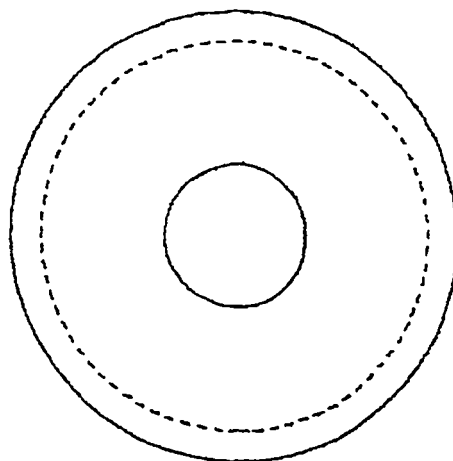
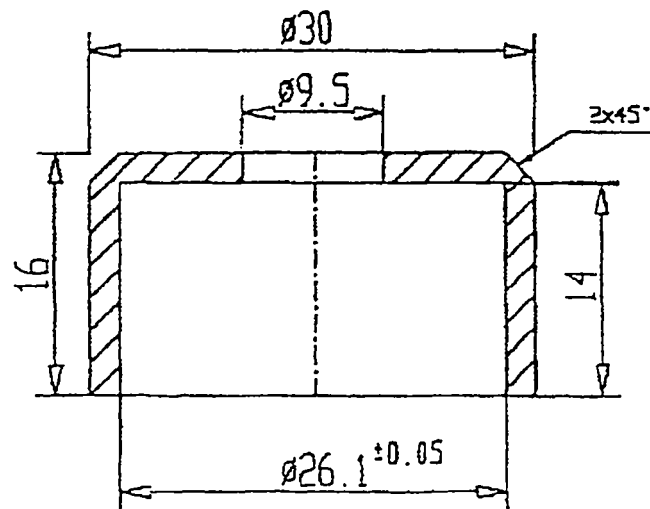


Fig. 11

