

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 374 970**

51 Int. Cl.:

B01L 3/00 (2006.01)

G01N 1/28 (2006.01)

G01N 21/76 (2006.01)

G01N 35/00 (2006.01)

G01N 33/487 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06765857 .5**

96 Fecha de presentación: **26.06.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1904234**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.04.2008**

54 Título: **CARTUCHO PARA DIAGNÓSTICOS MÉDICOS AUTOMATIZADOS.**

30 Prioridad:
30.06.2005 EP 05105922

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
23.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
23.02.2012

73 Titular/es:
Biocartis SA
Quartier Innovation EPFL-G
1015 Lausanne, CH

72 Inventor/es:
DE GIER, Ronald, C.;
SCHAEFER, Danny, G., A.;
VAN DEN BIJGAART, Adrianus, W., D., M.;
VAN HAAG, Chris y
DE JONG, Michiel

74 Agente: **de Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 374 970 T3

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

DESCRIPCIÓN

Cartucho para diagnósticos médicos automatizados

La invención se refiere a un cartucho para la detección de la presencia, ausencia o la cantidad de secuencias específicas de ADN o ARN. La invención también se refiere al uso de un sistema, que opcionalmente incorpora un cartucho, para la detección de la presencia, ausencia o la cantidad de secuencias específicas de ADN o ARN.

Desde el descubrimiento del ADN, la tecnología de la detección de la presencia, ausencia o la cantidad de secuencias específicas de ADN o ARN en una muestra se ha desarrollado enormemente. En especial, la RCP, la Reacción en Cadena de Polimerasa, ha contribuido enormemente al desarrollo de ensayos de todo tipo para la detección de la presencia o ausencia de secuencias de ADN o ARN. En la actualidad es posible recoger muestras que contienen ADN de un organismo y determinar la presencia, ausencia o la cantidad en las mismas de ciertas secuencias específicas de ADN (secuencias diana). Hay disponible tecnología para realizar tales análisis para múltiples secuencias diana al mismo tiempo, la denominada detección múltiplex de secuencias diana aumentando la producción.

En la actualidad, este tipo de análisis todavía no se realiza de forma rutinaria, como puede ser para la determinación del contenido de glucosa en sangre en el caso de la diabetes. Generalmente son necesarios laboratorios bien equipados, y se han de usar protocolos cuidadosos con el fin de evitar la contaminación por cruce y asegurar que los resultados obtenidos sean fiables, esto es, minimizar lecturas falso-positivas o falso-negativas. Sin embargo, como todavía está implicada una gran cantidad de trabajo manual de personal entrenado extensivamente y supervisado, sigue habiendo necesidad de obviar las desventajas de los procedimientos actuales de análisis de ADN o ARN. Especialmente, es sabido que el análisis de ARN es muy difícil porque muy fácilmente se produce contaminación debido a la presencia de cantidades mínimas de ARN en la atmósfera y en las manos de analistas expertos. Además, los presentes procedimientos de análisis no sólo son laboriosos, sino que también exigen mucho tiempo. Típicamente, un procedimiento eficiente para un análisis de ADN o ARN requiere aproximadamente 6 horas debido, inter alia, a la manipulación entre los varios sistemas para la toma de muestras, el aislamiento de ADN o ARN de la muestra, el posterior ensayo para el análisis de la presencia, ausencia o la cantidad de la secuencia diana en la muestra, el procesamiento de cualesquier resultados obtenidos y la correspondiente presentación de los resultados.

Se han dado a conocer antes sistemas basados en un cartucho para la detección de ADN. El documento WO 03/049860 describe un dispositivo para análisis químico o bioquímico.

Por ejemplo, la patente U.S. 5.882.903 describe un sistema para la detección de ADN. El sistema comprende un primer conjunto que tiene una o varias cámaras de reacción y un segundo conjunto que comprende un número de cámaras de líquido. Cada una de las cámaras de líquido contiene líquido que se usa durante la detección de ADN. Estos líquidos comprenden líquidos de lavado, líquido para lisis y una solución de amplificación que contiene un tampón de amplificación y cebadores apropiados. Las cámaras de reacción se usan para realizar las diferentes etapas de la detección, tales como lavado, lisis y amplificación.

El primer conjunto del cartucho conocido es un componente en forma de disco, y el segundo conjunto es un componente en forma de anillo, que se puede colocar exteriormente al componente en forma de disco. El componente en forma de disco comprende en su circunferencia una superficie de cierre cilíndrica que se coloca frente a una superficie de cierre exterior del componente en forma de anillo. En las superficies de cierre hay aberturas para líquido con el fin de que las cámaras de líquido estén en comunicación de líquido con las cámaras de reacción de manera que se puedan intercambiar entre ellas los diferentes líquidos.

Un inconveniente del cartucho conocido es que los conjuntos primero y segundo se han de hacer con mucha precisión con el fin de que haya un cierre apropiado entre las superficies de cierre primera y segunda. Por ello es importante que los conjuntos primero y segundo se hagan mutuamente móviles con el fin de que sea posible que se puedan poner en comunicación diferentes aberturas de líquidos del primer conjunto y el segundo conjunto pero, al mismo tiempo, se debe obtener un cierre apropiado cuando una abertura de líquido del primer conjunto se ponga en comunicación de líquido con una abertura para líquidos del segundo conjunto. Debido a estos requerimientos de precisión de las aberturas para líquido de los conjuntos primero y segundo, el cartucho es susceptible de un cierre no apropiado y consecuentemente una contaminación entre los conjuntos primero y segundo.

El objetivo de la presente invención es proporcionar un cartucho que no tenga los problemas antes mencionados.

Este objetivo se alcanza con un cartucho para la detección de la presencia, la ausencia y/o la cantidad de una secuencia diana de nucleótidos en una muestra que comprende una o varias secuencias de ácido nucleico, cartucho que comprenda un primer componente y un segundo componente, siendo conectables entre sí tales componentes, comprendiendo el primer componente al menos una primera abertura para líquido y una primera superficie de cierre, y comprendiendo el segundo conjunto al menos una segunda abertura para líquido y una segunda superficie de cierre, en el que, después de conectar el primer componente y el segundo componente, las aberturas primera y segunda de líquido se pueden poner en comunicación de líquido y las superficies de cierre primera y segunda se pueden poner enfrentadas entre sí para cerrar la comunicación de líquido entre las aberturas de líquido primera y segunda, cartucho caracterizado

porque comprende medios de accionamiento para orientar la segunda superficie de cierre en la dirección de la primera superficie de cierre, en el que el segundo componente tiene forma de disco y comprende un cuerpo principal en forma de anillo y un número de partes flexibles similares a dedos, estando conectado un extremo de cada parte flexible al cuerpo principal y estando libre el extremo opuesto de la parte flexible, comprendiendo el extremo opuesto la segunda abertura de líquido y la segunda superficie de cierre. Orientando la segunda superficie de cierre en la dirección de la primera superficie de cierre es posible obtener un mejor ajuste de estas superficies de cierre, lo que da por resultado un mejor cierre. Los medios de accionamiento para orientar pueden comprender, por ejemplo, elementos de tipo muelle que pueden forzar, al menos parte del segundo componente, en la dirección mencionada.

Los medios de accionamiento para orientar pueden estar situados en uno de los componentes primero o segundo, o en ambos, pero también se pueden proporcionar como una parte separada.

En una realización, el segundo componente comprende una parte flexible que es flexible en al menos una dirección perpendicular a la segunda superficie de cierre. Proporcionando una parte flexible que es al menos flexible en la dirección perpendicular a la segunda superficie flexible, la segunda superficie flexible se puede poner más fácilmente enfrentada a la primera superficie de cierre. De esta forma, en tal realización no es necesario que el segundo componente entero esté dispuesto en la dirección de la primera superficie de cierre.

En una realización, el segundo componente comprende dos o más partes flexibles, teniendo cada una de ellas una segunda abertura de líquido y una segunda superficie de cierre asociada, siendo cada una flexible en al menos una dirección perpendicular a la respectiva segunda superficie de cierre. Proporcionando una parte flexible diferente para diferentes aberturas de líquido y superficies de cierre asociadas, es más fácil obtener un cierre apropiado para los componentes primero y segundo, puesto que, para cada combinación de aberturas de líquido, las superficies de cierre primera y segunda se pueden poner enfrentadas entre sí independientemente de las otras aberturas de líquido y las superficies de cierre asociadas de los componentes primero y segundo.

En una realización, cada uno de los mencionados componentes primero y segundo comprende dos o más aberturas de líquido y las correspondiente superficies de cierre primera y segunda, siendo cada una de las superficies de cierre primera y segunda sustancialmente planas, siendo los planos de cada una de las superficies de cierre primera y segunda, respectivamente, sustancialmente paralelas entre sí. En tal realización, todas las superficies de cierre son sustancialmente paralelas entre sí, de manera que moviendo u orientando el segundo componente en una cierta dirección (generalmente en la dirección del primer componente) se mejora el cierre entre todas las superficies de cierre primera y segunda.

En una realización, el primer componente es una parte principal del cartucho y el segundo componente es un cuerpo de RCP que comprende una o varias cámaras de termociclación. En una realización preferente es posible proporcionar un número de diferentes cámaras de RCP, de las que se puede seleccionar una para conectarla a la parte principal del cartucho. Los diferentes cuerpos de RCP pueden comprender, por ejemplo, un número diferente de cámaras de reacción, diferentes tamaños de cámaras de reacción y/o diferentes series de cebadores que están diseñados especialmente para usarlos en la detección de un número específico de bacterias o similares.

Cuando se usa tal cuerpo de RCP separado que el usuario conecta a la parte principal, debe ser fácil colocarlo correctamente y ajustar el cuerpo de RCP en la parte principal. Con el fin de asegurar que se puede obtener fácilmente un cierre apropiado entre las aberturas de líquido del cuerpo de RCP y la parte principal, es ventajoso por ello usar la presente invención, ya que la superficie de cierre de una abertura de líquido del cuerpo de RCP se orienta a una superficie de cierre asociada de la parte principal del cartucho.

En una realización, el medio de orientación comprende un dispositivo de fijación para fijar el segundo componente al primer componente. Combinando el medio de orientación con un dispositivo de fijación es posible, después de conectar los componentes primero y segundo, fijar en una sola operación el segundo componente sobre el primer componente, y orientar la segunda superficie de cierre del segundo componente en la dirección de la primera superficie de cierre del primer componente. El dispositivo de fijación puede comprender cualquier medio adecuado para fijar los componentes primero y segundo, como por ejemplo un mediante una junta click-fit, una junta esférica y una junta de tornillo.

En una realización, el segundo componente después de conexión del segundo componente está respecto al primer componente entre al menos una primera posición en la que las aberturas de líquido primera y segunda están en comunicación de líquido y una segunda posición en la que la comunicación de líquido está obstruida. En ciertas realizaciones del cartucho, es deseable que la comunicación de líquido entre, por ejemplo, dos cámaras de proceso puedan estar cerradas. Con la construcción antes mencionada es posible usar la transición del primer componente al segundo componente para cerrar (temporalmente) la comunicación de líquido entre las dos aberturas de líquido. Así, puesto que no se requiere dispositivo de válvula separado alguno, se necesita menos espacio entre dos cámaras de proceso conectadas. Esto es particularmente ventajoso puesto que se necesitará menos líquido en exceso para bombear líquido desde una cámara de proceso a la otra cámara de proceso.

En una realización, al menos parte de los componentes primero y segundo esta provista de un elemento de cierre que comprende la primera abertura de líquido y la superficie de cierre o segunda abertura de líquido y la segunda superficie de cierre, respectivamente, estando configurado el elemento de cierre para proporcionar en la primera posición una

comunicación de líquido entre las aberturas primera y segunda, y en la segunda posición la obstrucción de la comunicación de líquido, estando configurado además el elemento de cierre para cerrar las aberturas de líquido primera y segunda del ambiente en ambas posiciones primera y segunda.

5 La presente invención proporciona un cartucho que es adecuado para la detección de la presencia, ausencia o la cantidad de ADN o ARN. La detección de la presencia, ausencia o la cantidad de ADN o ARN es indicativa, por ejemplo, de la presencia, ausencia o la cantidad de un gen, un alelo de un gen, una característica genética o trastorno, un polimorfismo, un polimorfismo individual de un nucleótido (SNP) o de la presencia de ADN o ARN exógeno en un organismo, esto es, la presencia, ausencia o la cantidad de patógenos o bacterias en organismos. Mediante la presente
10 invención se pueden desarrollar remedios adecuados para la preparación de medicamentos para el tratamiento de dolencias diagnosticadas. Por ejemplo, se puede así contribuir a la diagnosis y el tratamiento en una muestra (dígase sangre), de un organismo (dígase un ser humano) de un patógeno y el correspondiente tratamiento (dígase un antibiótico).

15 El cartucho puede ser del tipo intercambiable que se puede colocar en un aparato reutilizable. Tal cartucho puede ser desechable, reciclable o reutilizable, posiblemente después de limpiarlo. Al utilizar un cartucho intercambiable, todas las partes que pueden estar en contacto con la muestra se pueden sacar del aparato después del proceso de detección y el cartucho se puede intercambiar con otro o limpiar antes de usarlo posteriormente. En otras realizaciones, el cartucho puede ser parte integral del aparato reutilizable que se limpia después de cada uso.

20 En ciertas realizaciones, el aparato comprende una unidad de control para controlar el medio de aislamiento, el medio de amplificación y/o el medio de detección. La unidad de control posibilita el control automático del aislamiento de ADN, la amplificación de ADN y la detección del ADN amplificado.

25 El cartucho comprende una o varias cámaras en las que se tiene la muestra durante el proceso de detección. Tales cámaras pueden comprender una cámara de introducción para introducir una muestra en el cartucho, una cámara de lisis para lisis de las células de la muestra, una cámara de lavado para lavar, una o varias cámaras de termociclación para la amplificación del ADN y una cámara de detección que posibilita la detección. También es posible proporcionar una
única cámara para una o varias de las funciones descritas para las cámaras. En tales realizaciones, se pueden combinar en una sola cámara dos o más cámaras de la cámara de introducción, la cámara de lisis, la cámara de lavado, la(s) cámara(s) de termociclación y la cámara de detección.

30 Durante las diferentes etapas del proceso de detección, la muestra estará en la cámara respectiva. A este fin, la muestra se pasará de una cámara a otra cámara entre dos etapas de proceso. Para posibilitar este paso, cada cámara está conectada al menos con otra cámara mediante un canal de líquido. En al menos uno de tales canales, pero preferiblemente en cada uno de estos canales de líquido, se dispondrá un medio de válvula, válvula que preferiblemente cierra normalmente el canal de líquido pero abre el canal de líquido después de la actuación de la válvula poniendo en comunicación de líquido las correspondientes dos cámaras. El medio de válvula se puede diseñar como válvula de una vía.

35 En ciertas realizaciones, el medio de válvula se acciona mediante un dispositivo de accionamiento de válvulas. Preferiblemente, el medio de accionamiento de válvulas se coloca en el aparato reutilizable.

40 En ciertas realizaciones se disponen medios de bombeo para bombear de una cámara a otra la muestra o cualquier otro líquido usado en el proceso de detección, tal como tampón de lisis, reactivos, tampones de lisis y separación, tampones de preamplificación. Estos medios de bombeo se pueden accionar por medios de accionamiento de bombas que preferiblemente se colocan en los aparatos reutilizables.

45 En ciertas realizaciones, el sistema comprende medios para recogida de datos y/o para procesamiento de datos. Se dispone de estos medios para su uso en el análisis de ADN y/o para la interpretación de los resultados. En particular en ciertas realizaciones, medios de procesamiento de datos que son capaces de relacionar la presencia, ausencia o cantidad del ácido nucleico diana (o combinaciones de ellos) con una diagnosis particular. Tales medios de procesamiento de datos pueden ser, por ejemplo, un ordenador en combinación con una base de datos.

En ciertas realizaciones, el sistema puede comprender también los medios para introducción de una o varias muestras. Tales medios de introducción de muestras pueden comprender cualquier dispositivo adecuado, tal como un dispositivo de sostenimiento o acoplamiento para la introducción de una muestra de una jeringa o pipeta o similar, y pueden comprender, por ejemplo, una válvula de entrada de una vía, un diafragma, filtros y un rebosadero.

50 En ciertas realizaciones, el sistema puede comprender también un dispositivo de lisis. En el dispositivo de lisis, que puede estar controlado por una unidad de control, la muestra se trata para obtener ácidos nucleicos de la muestra en una forma que se pueda aislar de la muestra. Esta etapa de lisis típicamente incluye la lisis de las células de forma tal que las membranas celulares y/o nucleares se rompan y se liberen por tanto los ácidos nucleicos contenidos en ellas. Se pueden usar medios de manipulación física o mecánica para la etapa de lisis, pero también para la lisis de células de la muestra se pueden usar también medios químicos tales como un tampón de lisis. Se pueden proporcionar medios de
55 mezcladura para mezclar la muestra y el tampón de lisis. Los procedimientos de lisis de células son bien conocidos en la técnica, están expuestos en libros de texto, etc. Si es necesario, se pueden adaptar tales procedimientos para uso en la

presente invención. Cualquier desecho que se produce en la etapa de lisis se puede descartar, por ejemplo, en vertederos.

En ciertas realizaciones, el dispositivo de inserción de muestra y el dispositivo de lisis se pueden combinar.

5 En ciertas realizaciones, el sistema puede comprender también un dispositivo de enriquecimiento, opcionalmente bajo el control de una unidad de control. El dispositivo de enriquecimiento permite aislar ADN de la muestra lisada. A este fin, el dispositivo de enriquecimiento puede estar equipado con medios para aislamiento de ADN, tales como partículas magnéticas. En esta realización, el ADN o ARN de la presente invención es absorbido sobre partículas magnéticas. El material de ácido nucleico absorbido se puede someter a una o varias etapas de lavado, drenaje y/o purificación para eliminar cualquier material innecesario que quede del material biológico contenido en la muestra y otros componentes de la muestra que no son ADN y/o ARN. Cuando el ADN o ARN absorbido es de la pureza deseada, puede ser desorbido o eluido de las partículas magnéticas. El dispositivo de enriquecimiento también puede estar equipado con medios para manipulación física o mecánica de los líquidos para mezclar, separar y aislar el ADN o ARN.

10 En ciertas realizaciones, el sistema puede comprender también los reactivos necesarios para la etapa de enriquecimiento, esto es, el aislamiento de ADN o ARN, tales como tampones, líquidos de lavado, agua, filtros, perlas magnéticas, etc.

15 En ciertas realizaciones, los diferentes dispositivos de desecho del sistema se pueden separar para cada diferente finalidad o volumen. En ciertas realizaciones, se pueden combinar dos o más de los procedimientos de desecho descritos aquí para acomodar todo el desecho que se produce en el procedimiento de la presente invención.

20 En ciertas realizaciones, el sistema comprende además un dispositivo de preamplificación, opcionalmente bajo control de una unidad de control. El dispositivo de preamplificación se puede usar, por ejemplo, para aumentar la cantidad total de ADN o ARN a analizar. Sometiendo el ADN o ARN obtenido en la etapa de aislamiento a una etapa de preamplificación se puede aumentar la cantidad de ADN. Esto es ventajoso, especialmente en el caso de análisis múltiplex, en el que se realizan múltiples ensayos con el ADN aislado, por ejemplo para detectar simultáneamente la presencia, ausencia o cantidad de múltiples patógenos en una muestra. Hay disponible en la técnica la tecnología adecuada para aumentar la cantidad de ADN y generalmente es conocida como Amplificación del Genoma Entero.

25 En el dispositivo de preamplificación, el ADN o ARN aislado y purificado se puede pretratar con, Inter alia, un tampón de preamplificación y, en el caso de amplificación del genoma entero, con enzimas y DNTP. El dispositivo de preamplificación se puede conectar a un dispositivo de desecho para el desecho de materiales.

30 En ciertas realizaciones, el dispositivo de preamplificación se puede usar también para realizar ciertos ensayos de detección de ácidos nucleicos específicos. Son ejemplos de los mismos tecnologías del tipo de OLA-RCP tales como las proporcionadas por Applera (SNPplex), Keygene (SNPWave) y MRC-Holland (MPLA).

35 En ciertas realizaciones, el sistema comprende un dispositivo de amplificación. El dispositivo de amplificación puede estar bajo control de una unidad de control. El ADN aislado, opcionalmente pretratado como se ha descrito aquí en otro lugar, se somete en el dispositivo de amplificación a un tratamiento de amplificación. El tratamiento de amplificación comprende poner en contacto el ADN aislado con una serie de cebadores de RCP que son específicos para el ácido nucleico diana, enzimas de RCP tales como una o varias polimerasas y dNTP.

40 En ciertas realizaciones, el dispositivo de amplificación tiene una pluralidad de cámaras. La pluralidad de cámaras permite dividir el ADN o ARN preamplificado en porciones y distribuirlo entre las cámaras. En cada cámara se puede realizar una etapa de amplificación usando una serie diferente de cebadores. De esta manera se realizan múltiples análisis en tanto que se puede analizar una muestra en cuanto a la presencia, ausencia o cantidad de diferentes ácidos nucleicos diana. En el caso de análisis múltiplex, la serie de cebadores para cada ácido nucleico diana se puede equipar con un marcador detectable diferente, esto es, con un espectro fluorescente diferente.

45 En ciertas realizaciones, el sistema puede comprender también reactivos para la amplificación de ADN aislado, tales como enzimas, DNTP, etc.

En ciertas realizaciones, el sistema puede comprender también un dispositivo de detección. El dispositivo de detección puede estar controlado por una unidad de control. El dispositivo de detección es adecuado para la detección del ADN o ARN amplificado y preferiblemente para la detección de marcadores incorporados en los productos de amplificación.

50 El dispositivo de detección puede detectar sobre la base del marcador, la longitud, la movilidad, la secuencia de nucleótidos, su masa o combinación. En ciertas realizaciones, un dispositivo de detección puede detectar sobre base óptica, electroquímica, magnética o de movilidad de (electroforesis en gel). En principio se puede usar cualquier dispositivo de detección adecuado conocido de la técnica anterior.

En ciertas realizaciones, el sistema comprende también un dispositivo de recogida de datos para recoger datos del dispositivo de detección.

55 En ciertas realizaciones, el sistema comprende también un dispositivo de procesamiento de datos para procesar los datos.

Los procedimientos para la detección de la presencia, ausencia y/o la cantidad de una secuencia de nucleótidos diana en una muestra que comprende una o varias secuencias de ácido nucleico puede comprender las etapas de:

- proporcionar una muestra de un organismo,
- realizar las etapas de aislamiento de las secuencias de ácido nucleico de la muestra,
- 5 - realizar las etapas de amplificación de (parte de) las secuencias de ácido nucleico obteniendo amplicones;
- detectar la presencia, ausencia y/o la cantidad de los amplicones que corresponden a la secuencia de nucleótidos diana entre las secuencias de ácido nucleico de la muestra.

Tales procedimientos se pueden realizar en un cartucho conforme a lo definido en la presente solicitud.

10 La secuencia de nucleótido diana se puede seleccionar entre el grupo constituido por ADN, ADN genómico, ARNm, ADNc, ADN transgénico, etc. El organismo puede ser un ser humano, un animal no humano, un microorganismo o una planta.

La muestra puede ser tejido, fluidos corporales tales como esputo, semen, sangre, orina y/o heces.

La secuencia de nucleótidos diana puede ser una secuencia exógena.

La secuencia de nucleótidos diana puede ser un patógeno.

15 La muestra que comprende las secuencias de ácido nucleico puede someterse a lisis para liberar las secuencias de ácido nucleico contenidas. La muestra lisada se puede someter a una secuencia de lavado y etapas de recogida tal como son conocidas en sí en la técnica y se describen en libros de texto estándar que consideran el aislamiento de los ácidos nucleicos de la muestra. Estas etapas se pueden realizar en una sola etapa o sucesivamente en etapas múltiples. Después de aislar los ácidos nucleicos de la muestra, los ácidos nucleicos se pueden someter a una reacción de
20 amplificación usando cebadores que son selectivos para la detección del ácido nucleico diana.

Los procedimientos de amplificación usualmente emplean dos cebadores, dNTP, y una (ADN)polimerasa. Un procedimiento de amplificación preferido es la RCP. "RCP" o "Reacción en Cadena de Polimerasa" es un procedimiento rápido para amplificación enzimática in vitro de un segmento de ADN específico. El ADN a amplificar se desnaturaliza por calentamiento de la muestra. En presencia de ADN polimerasa y un exceso de trifosfatos de desoxinucleótido, los
25 oligonucleótidos que se hibridan específicamente con la secuencia diana ceban la síntesis de ADN nuevo. Una tanda de síntesis da por resultado nuevas cadenas de determinada longitud que, como las cadenas madre, se pueden hibridar con los cebadores después de desnaturalización e hibridación. El segundo ciclo de desnaturalización, hibridación y síntesis produce dos productos de cadena simple que juntos componen un producto de doble cadena discreto, exactamente la longitud entre los extremos del cebador. El producto discreto se acumula exponencialmente con cada tanda de
30 amplificación sucesiva. En el transcurso de aproximadamente 20 a 30 ciclos, se puede alcanzar una amplificación de muchos millones de veces de los fragmentos discretos. Los protocolos de RCP son bien conocidos en la técnica y se describen en libros de texto de laboratorio estándar, por ejemplo, Ausubel y otros, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc. (1995). Se pueden aplicar otros procedimientos de amplificación multiplex y/o isotérmica, por ejemplo, LCR, replicación de secuencias autosostenida (3SR), amplificación de ARN mediada por Q-β-replicasa, amplificación por círculo rodante (RCA) o amplificación por desplazamiento de cadena (SDA).
35

La detección de los amplicones marcados se realiza con un detector dando por resultado datos de detección. Obviamente, el detector depende del sistema general con el que se realiza la discriminación entre los amplicones y las secuencias diana, pero depende también del marcador que está presente en el cebador, tal como un marcador fluorescente o fosforescente. Para discriminar entre diferentes secuencias diana en la muestra, preferiblemente se usa una diferencia en el espectro de fluorescencia de los correspondientes amplicones respectivos. En ciertas realizaciones, al menos uno de los cebadores comprende un marcador, preferiblemente el cebador directo comprende un marcador. El marcador se puede seleccionar entre un grupo grande que entre otros comprende restos fluorescentes y/o fosforescentes tales como colorantes, cromóforos o enzimas, antígenos, metales pesados, sondas magnéticas, restos fosforescentes, marcadores radiactivos, restos quimioluminiscentes, o restos detectores electroquímicos. En ciertas realizaciones el
45 marcador es un colorante fluorescente o fosforescente. Son ejemplos de tales colorantes FAM, HEX, TET, JOE, NED y (ET-)ROX. Colorantes tales como FITC, Cy2, Texas Red, TAMRA, Alexa fluor 488TM, BodipyFL, Rhoamine 123, R6G, Bodipy 530, AlexafluorTM532.

Usando diferentes conjuntos de cebadores, conteniendo cada uno un marcador diferente, se puede aumentar el número de secuencias diana que se puede discriminar en una muestra y a partir de él el número de secuencias que se puede detectar usando marcadores adicionales. El número máximo de marcadores que se puede usar en una muestra en un procedimiento multiplex depende principalmente de las limitaciones en la capacidad de detección de las plataformas de detección disponibles.
50

La amplificación se puede realizar usando la RCP con al menos un cebador directo y al menos un cebador inverso que sean selectivos para la secuencia diana y no para cualquier otra secuencia de la muestra.

Al menos uno de los cebadores directo e inverso puede estar marcado.

La etapa de amplificación se puede realizar precedida o reemplazada por un ensayo de detección de ácidos nucleicos en muestras.

5 Los amplicones se pueden detectar sobre la base de su marcador, longitud, movilidad, secuencia de nucleótido, masa o combinación de los mismos.

Los amplicones se pueden detectar por detección óptica, electromagnética o magnética.

La Fig. 1 muestra una vista en perspectiva de un sistema útil en una realización de la invención.

La Fig. 2 es un diagrama esquemático de bloque de la arquitectura de una realización del sistema, útil en la invención.

10 La Fig. 3 muestra una sección transversal esquemática (B-B en la Fig. 4) de una realización de cartucho útil en la presente invención.

La Fig. 4 muestra una vista en planta desde arriba/sección transversal (A-A en la Fig. 3) de la realización de la Fig. 3.

La Fig. 5 muestra una vista en planta desde arriba más detallada de una realización posible de un disco de RCP de acuerdo con una realización de la presente invención.

La Fig. 6 muestra una sección transversal del disco de RCP de la Fig. 5.

15 La Fig. 7 muestra una vista en perspectiva detallada de un elemento de cierre de acuerdo con la invención. Y

La Fig. 8 muestra una vista en perspectiva de un disco de RCP que está conectado con un dispositivo de fijación a una parte principal del cartucho, comprendiendo el dispositivo de fijación un medio para orientar.

La materia de las Figuras 1 a 4 corresponde al estado de la técnica y no forma parte de la invención.

20 La Fig. 1 muestra una realización de un sistema para la detección de la presencia, ausencia y/o la cantidad de una secuencia de nucleótidos diana en una muestra que comprende una o varias secuencias de ácido nucleico, indicado en general con el número de referencia 1. El sistema comprende un aparato reutilizable 2 con una caja 3 (en parte eliminada).

En el aparato 2 hay un hueco 4. En el hueco 4 está colocado un cartucho 5 intercambiable de forma que se puede extraer. El cartucho 5 puede ser reutilizable, reciclable o desechable.

25 Con el fin de posibilitar la detección, el cartucho 5 comprende medios de introducción para introducir una muestra, medios de aislamiento para aislar el ADN, medios de amplificación para la amplificación de ADN y medios de detección de ADN amplificado. Los medios de introducción, aislamiento, amplificación y/o detección pueden situarse en el cartucho y/o en el aparato reutilizable. En general, están en contacto con la muestra. A lo largo del proceso de detección la muestra se mantiene en el cartucho, que actúa como cartucho.

30 En lo que sigue se describe una realización preferente de la disposición de los medios de introducción, de aislamiento, de amplificación y/o de detección. Pero también son posibles otras realizaciones.

El aparato 2 comprende una unidad de control 7 para controlar automáticamente las diferentes etapas del proceso de detección como se describirá seguidamente.

35 Además, el aparato 2 comprende uno o varios dispositivos de accionamiento para accionar diferentes elementos dispuestos en el cartucho. Estos dispositivos de accionamiento pueden comprender uno o varios dispositivos de accionamiento para accionar uno o varios medios para bombear líquido, uno o varios dispositivos de accionamiento de válvulas para accionar una o varias válvulas dispuestas en un canal de líquido en el cartucho, y otros medios de accionamiento tales como dispositivos mecánicos de accionamiento para proporcionar, por ejemplo, un movimiento de rotación o traslación a una o varias partes del cartucho.

40 En el aparato hay un dispositivo de detección que puede detectar la presencia, ausencia y/o la cantidad de ADN. A este fin, el ADN se puede colocar en una cámara de detección situada en el cartucho. El dispositivo de detección puede actuar basado en un principio óptico, electroquímico o magnético como es conocido en la técnica anterior. Se puede aplicar cualquier otro procedimiento de detección adecuado.

45 El aparato puede comprender además un dispositivo de recogida de datos y un dispositivo de procesamiento de datos para recoger datos obtenidos del dispositivo de detección y procesar estos datos, respectivamente.

50 El aparato 2 comprende un soporte 6 para sostener el cartucho 5. El soporte 6 es móvil en dirección vertical entre una posición inferior (en la que se muestra el soporte) y una posición superior. En la posición inferior, el cartucho 5 se puede poner en el soporte 6 o sacarlo del soporte. La posición superior es la posición de trabajo, en la que se coloca el cartucho 5 durante el proceso de detección. En esta posición superior el cartucho se fija entre el soporte 6 y varios dispositivos que se colocan sobre el cartucho, tales como medios de bombeo, válvulas, medios mecánicos, y puede cooperar una cámara con los correspondientes dispositivos, dispuestos en el aparato 7, tales como medios de bombeo, válvula y otros

dispositivos mecánicos de accionamiento, y un dispositivo de detección.

En una realización alternativa, también es posible que una parte del aparato 2 que comprende los dispositivos correspondientes se pueda mover hacia un cartucho, y alejarse de él, colocado en el aparato 2.

5 En una realización alternativa también se posible que una parte del aparato 2 que comprende los correspondientes dispositivos se pueda mover hacia un cartucho, y alejarse de él, colocado en el aparato 2.

En la Fig. 2 se muestra un diagrama de bloque esquemático en el que se presentan las diferentes etapas del proceso de detección usando el procedimiento del estado de la técnica, útil en la presente invención. El diagrama se usa para explicar la arquitectura principal del cartucho 5 y la relación entre el aparato 2 y el cartucho 5.

10 En una primera etapa ("inserción de la muestra") se introduce una muestra en el cartucho 5. A este fin, el cartucho 5 comprende un dispositivo de introducción con el que se puede introducir en el cartucho 5 una muestra. El dispositivo de introducción puede ser, por ejemplo, cualquier dispositivo adecuado para introducir una muestra de una pipeta o jeringa o similar, y puede comprender un dispositivo de contención o mantenimiento, una válvula de entrada de una vía, un diafragma, filtros y un rebosadero. Después de introducir la muestra, esta muestra será guiada a una cámara de introducción.

15 En una segunda etapa ("lisis"), la muestra se trata para obtener cualesquier ácidos nucleicos en una forma tal que se puedan aislar de la muestra. Esta etapa de lisis típicamente incluye la lisis de las células que se rompen y/o cuyas membranas nucleares se rompen, liberándose así los ácidos nucleicos contenidos. La etapa de lisis se realiza en una cámara de lisis que es parte del dispositivo de lisis. Esta cámara de lisis está en comunicación de líquido con el dispositivo de introducción de la muestra, por ejemplo mediante un canal de líquido. Se pueden disponer medios de bombeo para bombear la muestra desde la cámara de introducción a la cámara de lisis.

20 En una realización preferente, la cámara de introducción y la cámara de lisis son la misma cámara.

En una realización, el dispositivo de lisis comprende un medio físicos o mecánico de manipulación para la etapa de lisis. En otra realización, o en la misma realización, (también) se pueden usar medios químicos para la lisis de las células de la muestra, tales como tampón de lisis. Tal tampón de lisis puede estar contenido antes de su uso en un recipiente para tampón de lisis conocido que está en comunicación de líquido con la cámara de lisis. En el canal de líquido que conecta el recipiente de tampón de lisis y la cámara de lisis puede colocarse una válvula, preferiblemente una válvula de una vía.

25 Se pueden proporcionar medios de mezcladura para mezclar la muestra y el tampón de lisis. El medio de mezcladura puede ser accionado por el aparato.

30 La lisis y posiblemente la mezcladura se realizan bajo control de la unidad de control del aparato 2. Las válvulas y los medios de bombeo son accionados por los dispositivos de válvula y bombeo colocados en el aparato 2.

En una tercera etapa ("enriquecimiento"), un dispositivo de enriquecimiento, situado en el cartucho, permite aislar el ADN de la muestra lisada. A este fin, el dispositivo de enriquecimiento puede estar equipado con medios para aislar el ADN, tales como partículas magnéticas.

35 La etapa de enriquecimiento se realiza en una cámara de enriquecimiento que está en comunicación de líquido con la cámara de lisis. En el canal de líquido entre la cámara de lisis y la cámara de enriquecimiento está colocada una válvula para posibilitar que sólo fluya líquido por el canal de líquido cuando sea necesario. La válvula puede ser accionada por el medio de accionamiento de válvula proporcionado en el aparato.

40 En esta realización, el ADN o ARN de la presente invención es absorbido sobre partículas magnéticas. El material ácido nucleico absorbido se puede someter a una o varias etapas de lavado, drenaje y/o purificación para eliminar cualquier material innecesario tal como material biológico residual contenido en la muestra y otros componentes de la muestra que no son ADN y/o ARN. Esta etapa de lavado y purificación se muestra como una cuarta etapa, "lavado y purificación", en la Fig. 2. Sin embargo, la etapa de "lavado y purificación" se puede considerar también como parte de la etapa de "enriquecimiento". Cuando el ADN o ARN absorbido es de la pureza deseada, puede ser desorbido o eluido de las partículas magnéticas. La etapa de lavado y purificación se puede realizar en una cámara de lavado. En la presente realización, esta cámara de lavado es la misma que la cámara de enriquecimiento. Sin embargo, en otras realizaciones puede disponerse una cámara separada.

45 El cartucho 5 se proporciona con uno o varios recipientes de tampón de lavado y tampón de elución para contener el (los) tampón(es) de lavado y elución, respectivamente. Cada uno de estos recipientes de tampón de lavado y tampón de elución está en comunicación de líquido con la cámara de lavado, y cada uno de los canales líquido que proporcionan esta comunicación de líquido está provisto de una válvula, preferiblemente una válvula de una vía. Se pueden proporcionar recipientes similares para cualesquier otros reactivos que sean necesarios para la etapa de enriquecimiento, esto es, el aislamiento de ADN o ARN.

50 Las válvulas del dispositivo de enriquecimiento son accionadas por el dispositivo de accionamiento de válvulas del aparato 2 y pueden estar bajo control de la unidad de control 7.

En una realización alternativa, el dispositivo de enriquecimiento también puede estar equipado con medios físicos o mecánicos de manipulación de los líquidos para mezclar, separar y aislar el ADN o ARN. Tales medios físicos o mecánicos de manipulación pueden ser accionados por un dispositivo de accionamiento del aparato 2 y pueden estar bajo control de la unidad de control 7 del aparato.

5 Cualquier desecho producido en la etapa de enriquecimiento, tal como tampones usados, líquidos de lavado y similares se puede desviar a un dispositivo de desechos. Este dispositivo de desechos es parte del cartucho y puede ser el mismo dispositivo de desechos descrito en el dispositivo de lisis. Como alternativa, los dispositivos de desechos de la etapa de lisis y la etapa de enriquecimiento pueden separarse para cada fin o volumen diferente.

10 En una quinta etapa, ("preamplificación"), se puede incrementar la cantidad total de ADN o ARN a analizar usando un dispositivo de preamplificación. Sometiendo el ADN o ARN obtenido en la etapa de aislamiento a una etapa de preamplificación se puede aumentar la cantidad total de ADN. Esto es ventajoso, especialmente en el caso de análisis multiplex, en los que se realizan múltiples ensayos con el ADN aislado, por ejemplo para detectar simultáneamente la presencia, ausencia o cantidad de múltiples patógenos en una muestra.

15 El dispositivo de preamplificación comprende una cámara de preamplificación en la que se realiza la preamplificación. La cámara de preamplificación puede ser la misma o diferente a la usada como cámara de enriquecimiento y/o cámara de lavado. El dispositivo de preamplificación está bajo control de la unidad de control 7.

20 En el dispositivo de preamplificación, el ADN o ARN aislado y purificado se puede pretratar, *Inter alia*, con un tampón de preamplificación y, en el caso de una amplificación de genoma entero, con enzimas y DNTP. Antes del uso, este tampón de preamplificación se mantiene en un recipiente para tampón que está en comunicación de líquido con la cámara anterior de proceso, por ejemplo, la cámara de lavado. Puede haber una válvula en el canal de líquido que proporciona la comunicación de líquido.

El dispositivo de preamplificación puede conectarse a un dispositivo de válvula para desecho de materiales.

25 En una sexta etapa ("amplificación"), el ADN aislado, opcionalmente pretratado como se ha descrito en esta memoria en otro lugar, se somete en el dispositivo de amplificación a un tratamiento de amplificación. El tratamiento de amplificación comprende poner en contacto el ADN aislado con una serie de cebadores de RCP que son específicos para el ácido nucleico diana, enzimas de RCP tales como una o varias polimerasas y DNTP.

30 A este fin el dispositivo de amplificación comprende una pluralidad de cámaras de amplificación. La pluralidad de cámaras de amplificación permite dividir en porciones el ADN o ARN aislado o preamplificado y distribuirlo entre las cámaras. En cada cámara se puede realizar una etapa de amplificación usando una serie diferente de cebadores. De esta manera se realiza análisis multiplex en cuanto a que se puede analizar una muestra respecto a la presencia, ausencia o cantidad de diferentes ácidos nucleicos diana. En el caso de análisis multiplex, la serie de cebadores para cada ácido nucleico diana se puede equipar con un marcador detectablemente diferente, esto es, con un espectro fluorescente diferente.

35 El cartucho puede comprender recipientes de reactivos para contener reactivos para la amplificación de ADN aislado, tales como enzimas, DNTP, etc.

40 En una etapa final ("detección") se detectan el ADN o ARN amplificado y preferiblemente los marcadores que se han incorporado en los productos de amplificación. A este fin, el sistema 1 comprende un dispositivo de detección. El dispositivo de detección comprende una cámara de detección que está colocada en el cartucho 5. En el aparato reutilizable 2 descrito antes se pueden colocar otras partes del dispositivo de detección. La cámara de detección está en comunicación de líquido con la cámara o las varias cámaras de amplificación para extraer simultánea o sucesivamente de las cámaras de amplificación el ADN o ARN. Se pueden colocar válvulas en el canal de líquido que conecta la cámara de detección con la cámara o las cámaras de amplificación.

45 El dispositivo de detección puede estar bajo control de la unidad de control 7. El dispositivo de detección puede detectar sobre la base de marcador, longitud, movilidad, secuencia de nucleótidos, masa o combinación de los mismos. En ciertas realizaciones, un dispositivo de detección puede detectar sobre una base óptica, electroquímica, magnética o de movilidad (electroforesis en gel). En principio se puede usar cualquier dispositivo de detección conocido de la técnica anterior. La información de la detección se puede recoger por medios de recogida de datos y ser procesada por medios de procesamiento de datos para llegar, por ejemplo, a un cierto diagnóstico.

50 Todas las corrientes de líquido que están dentro del cartucho se pueden obtener con medios de bombeo que se han dispuesto en el cartucho. Tales medios de bombeo pueden trabajar sobre la base de espacios de compresión o expansión del cartucho, en particular los espacios de las respectivas cámaras de proceso, esto es, la cámara de introducción, la cámara de lisis, la cámara de preamplificación, la cámara de lavado y purificación, la cámara de amplificación y la cámara de detección, y los respectivos recipientes de reactivos. Estos medios de bombeo pueden ser también de cualquier otro tipo.

55 Los medios de bombeo del cartucho son accionados por dispositivos de actuación de medios de bombeo proporcionados en el aparato 2. Estos dispositivos de accionamiento de medios de bombeo están bajo control de la unidad de control 7.

Los pasos o canales de líquido entre las diferentes cámaras de proceso, esto es, la cámara de introducción, la cámara de lisis, la cámara de preamplificación, la cámara de lavado y purificación, la cámara de amplificación y la cámara de detección, y los respectivos recipientes de reactivos, pueden estar provistos de válvulas para que sólo fluyan los líquidos cuando sea necesario. Dado que la mayor parte de líquidos pasará por los canales de líquido en una dirección, las válvulas serán preferiblemente válvulas de una vía.

Las válvulas pueden ser accionadas por dispositivos de accionamiento de válvulas que preferiblemente están colocados en el aparato 2.

Todas las etapas descritas antes pueden estar bajo control de la unidad de control 7.

Las Figs. 3 y 4 muestran más detalladamente una realización de un cartucho indicado generalmente con el número de referencia 10, en el que se puede realizar el procedimiento descrito antes. El cartucho comprende una parte genérica 11 que tiene varias cámaras de proceso y sistemas de manipulación de líquidos, como se describirá seguidamente.

Seguidamente se describirán las diferentes partes del cartucho 10 en el orden en que se usarán cuando se realice un procedimiento de detección para la detección de la presencia, ausencia o la cantidad de una secuencia de nucleótidos diana en una muestra que comprende una o varias secuencias de ácido nucleico.

La primera parte de aplicación específica comprendida en el cartucho 10 es un dispositivo de prelisis 12. Este dispositivo de prelisis está configurado para procesar una muestra a un cierto estado que puede ser procesado por el cartucho 10.

Por ejemplo, la muestra se puede proporcionar en estado sólido, por ejemplo, sangre desecada, mientras que el cartucho está diseñado para procesar una muestra en estado líquido. En tal caso, la muestra se ha de llevar al estado líquido antes de procesarla en el cartucho. Tal procesamiento se puede hacer proporcionando enzimas adecuadas en un medio adecuado en el dispositivo de prelisis 12. Tales procesamientos son conocidos en la técnica, por ejemplo, tripsinización. Proporcionando un dispositivo de prelisis que se puede conectar a la parte genérica 11, el procesamiento de la muestra se puede realizar al estado deseado sin necesidad de transferir la muestra después de ser procesada, evitando cualquier oportunidad de contaminación. El procesamiento de la muestra al estado deseado se puede realizar antes o después de conectar el dispositivo de prelisis a la parte genérica 11.

Cuando no se necesita el procesamiento de la muestra, ya que la muestra está ya en un estado que se puede procesar por el cartucho, el dispositivo de prelisis puede servir también como dispositivo de introducción de muestras. Luego se usa el dispositivo de introducción de muestras para introducir la muestra sin riesgo de contaminación, dado que el dispositivo de introducción de muestras está diseñado para ser conectado a la parte genérica 11 para la introducción de la muestra en el cartucho 10.

Cuando la muestra se introduce en el cartucho 10, puede ser bombeada a la cámara de lisis 13. La parte genérica 11 del cartucho 10 comprende medios de manipulación de líquidos, incluidas bombas y válvulas para bombear la muestra a las diferentes cámaras de proceso. En general la parte genérica comprende dos componentes principales 14, 15 que están situados uno frente al otro con una membrana 16 interpuesta. Los dos componentes principales 14, 15 comprenden huecos que junto con la membrana flexible 16 pueden formar cámaras de bomba, válvulas, canales de líquido, estaciones de almacenamiento de líquido y similares.

En el cartucho representado en los dibujos, la muestra se mantendrá principalmente por encima de la membrana flexible, mientras que la bomba 17 y las válvulas 18 son accionadas principalmente desde el lado del fondo de la membrana flexible 16. El líquido se puede bombear para que entre o salga de una cámara moviendo el miembro flexible para aumentar o disminuir el espacio dentro de la cámara, respectivamente. La membrana flexible puede moverse, por ejemplo, introduciendo aire o líquido en el espacio entre la membrana flexible 16 y el componente 15. El aire o líquido se puede introducir a través del canal 19. Las otras cámaras de bomba se pueden utilizar también como cámaras de bomba como corresponda. También se pueden usar otros medios para mover la membrana flexible, tales como elementos de acción mecánicos. Las válvulas se pueden accionar por presión de aire o líquido, accionamiento mecánico o cualquier otro dispositivo de accionamiento adecuado. También se puede usar el movimiento de la membrana flexible 16 respecto al componente 14 para abrir y cerrar un asiento de válvula, de manera que, por ejemplo, en la posición cerrada de una válvula la membrana flexible se mantenga contra un extremo de canal del componente 14.

En sí, tales sistemas de cartucho que tienen el tipo de bomba 17 y válvulas 18 para la manipulación de los líquidos descritos han sido considerados antes, aunque no a los fines de la presente invención. Se hace referencia, *Inter. alia*, a los documentos US 6156270, USD37164, USD351913, US 6382923, US 6663359, US6416293, US 4865584 y US 4479760.

En la cámara de lisis 13, la muestra será lisada como se ha descrito aquí antes en la etapa 2 en relación a la Fig. 2. Hay un almacén 20 de lisis para almacenar un tampón de lisis antes de bombearlo a la cámara de lisis.

Después de la etapa de lisis, se puede bombear la muestra a una segunda cámara de proceso 21 en la que se puede enriquecer la muestra de acuerdo con la etapa 2 y lavarla y purificarla de acuerdo con la etapa 4 conforme se ha descrito aquí antes. Se proporcionan almacenes de líquido 22 para almacenamiento de diferentes tampones de lavado y purificación que se pueden usar en las etapas de lavado y purificación. Estos almacenes de líquido 22 están en

comunicación de líquido mediante válvulas con una segunda cámara de proceso 21.

Después de la posible preamplificación (como se ha descrito en la etapa 6 en relación a la Fig. 2), que también se puede realizar en la segunda cámara de proceso 21 o en la cámara 23, la muestra se puede introducir en el cuerpo de RCP 24.

Este cuerpo 24 de RCP es una segunda parte específica de aplicación del cartucho. El cuerpo 24 de RCP es circular, tiene forma de disco y está conectado a la parte genérica 11 mediante una unión de tipo click-fit (25).

El cuerpo 24 de RCP comprende seis cámaras de termociclación 26 de manera que se pueden realizar simultáneamente en una muestra seis procesos de RCP. Tal proceso de amplificación de PCR se ha descrito aquí antes como etapa 6 en relación a la Fig. 2. Cada una de las cámaras de termociclación 26 está provista de como mínimo un cebador específico.

El cuerpo 24 de RCP puede seleccionarse entre un grupo de diferentes tipos de cuerpos de RCP, comprendiendo cada uno de ellos una serie diferente de cebadores, un número diferente de cámaras y/o un tamaño o geometría de la cámara diferente. Por ejemplo, el cuerpo de RCP que comprende los cebadores puede seleccionarse sobre la base de los paneles de bacterias/resistencias que se han de detectar, selección que puede ser específica para un ensayo particular o para una región particular, tal como Europa, Asia o África.

Los cebadores se aplican como manchas sobre una pared de las cámaras de termociclación, por ejemplo, por un procedimiento de impresión con chorro de tinta, de manera que durante el almacenamiento de los cuerpos de RCP, no hayan de tomarse medidas para evitar que los cebadores salgan del cuerpo de RCP, lo que sería el caso, por ejemplo, si se usaran cebadores en estado líquido. En tal caso, se puede proporcionar una cámara cerrada separada para contener los cebadores y cualquier otro líquido específico de aplicación antes de su uso.

Después de la etapa de amplificación, el ADN o ARN amplificado y preferiblemente los marcadores que se incorporan en los productos de amplificación son bombeados al dispositivo de detección 27. El dispositivo de detección o al menos parte de él es una tercera parte específica de aplicación del cartucho 10, que es una parte separada y que puede conectarse a la parte genérica 11. En la realización presentada, el dispositivo de detección está conectado a la parte genérica mediante una conexión de tipo click-fit.

Dependiendo del tipo del procedimiento de detección (como se describe en esta solicitud, en particular la etapa seis descrita en relación a la Fig. 2), se puede seleccionar un dispositivo de detección entre una serie de diferentes dispositivos de detección específicos para una aplicación, que se pueden diseñar específicamente para cada procedimiento de detección.

En algunos casos, el tipo de dispositivo de detección que se usará en el cartucho 10 dependerá del tipo de cuerpo de RCP que se use para el proceso de amplificación. La elección del cuerpo de RCP conducirá luego automáticamente a la selección del dispositivo de detección.

La parte genérica 11 y las partes específicas de aplicación se proporcionan con un dispositivo de identificación, por lo que después de montar las partes genérica y específica de aplicación se puede comprobar si se ha hecho la combinación correcta. Posiblemente se usa un sistema de identificación más avanzado, tal como una etiqueta RF, que comprende etiquetas de identificación que pueden ser automáticamente comprobadas y que incluso cuya historia se puede seguir. Tal comprobación y seguimiento de la historia se puede controlar mediante la unidad de control del aparato reutilizable como una etapa del procedimiento para procesar la muestra en el cartucho.

Una ventaja adicional de la construcción de la presente invención con una parte genérica y una o varias partes de aplicación específica es que la conexión entre la parte genérica y cada una de las partes de aplicación específica puede hacerse fácilmente impermeable al aire, de manera que el espacio entero en el que se usan la muestra y otros líquidos usados en el cartucho se puedan cerrar respecto al ambiente. De esta manera, se evita la contaminación de la muestra durante la introducción de la muestra en el cartucho y su procesamiento y, puesto que cada muestra está en un medio cerrado que tiene su propia presión interna, el procesamiento de la muestra se puede hacer independiente de la presión de aire en el medio directo y, por ello, independiente de otras condiciones ambientales tales como la humedad. Esto posibilita un procesamiento más fiable de la muestra.

Se contempla que el cartucho de acuerdo con la invención pueda comprender otras partes de aplicación específica de acuerdo con la presente invención, aparte de las partes de aplicación específica identificadas en la descripción anterior. La aplicación de estas otras partes de aplicación específica en el cartucho se estima que está en el alcance de la presente invención. Entre los ejemplos de tales partes de aplicación específica pueden figurar recipientes de líquidos que contienen un líquido tal como enzimas, reactivos y otras sustancias químicas para aplicación específica, dispositivos de mezcla y otros dispositivos mecánicos de manipulación con diferentes geometrías o tamaños para una aplicación específica, y otros.

La invención se puede usar también para partes específicas del cartucho que han de ser pretratadas o que se han de mantener a ciertas temperaturas que no se desean o que se requieren para las otras partes del cartucho. Por ejemplo, puede ser muy útil que se provea un recipiente separado de un líquido que se puede usar en el pretratamiento o almacenar en un sitio diferente, y que consecuentemente se pueda conectar a la parte genérica del cartucho antes del

uso, dado que se evita el riesgo de contaminación de esa parte, en particular los líquidos dentro de él, puesto que el líquido no se ha de transferir desde un recipiente al cartucho en un medio abierto.

Tal uso de una parte separada se considera que es específica de aplicación dentro del significado de la presente invención, incluso si la misma parte se usa en varias aplicaciones diferentes. Un ejemplo de tal aplicación es un recipiente de líquido separado para una mezcla madre de RCP que se ha de almacenar a baja temperatura antes de usarla en el cartucho. Justo antes de que se introduzca el cartucho en el aparato reutilizable, el recipiente separado de fluido se conecta a la parte genérica del cartucho, por ejemplo, mediante una conexión de tipo clic-fit.

Las Figs. 5 y 6 describen más detalladamente un cuerpo de RCP generalmente de forma de disco que como conjunto tiene el número de referencia 30. El cuerpo 30 de RCP comprende seis cámaras 31 de termociclación, siendo capaz cada una de ellas de contener un líquido durante el proceso de RCP. El cuerpo 30 de RCP comprende una parte principal en forma de disco 32 y seis partes flexible 33 similares a dedos. Similar a dedos significa en este contexto que las partes flexibles 33 están conectadas en un extremo, en este caso extremos radialmente exteriores, con la parte principal 32 en forma de anillo, mientras que el extremo opuesto está libre, esto es, no conectado fijamente a cualquier parte del cuerpo de RCP. En otras palabras, las partes flexibles 33 están conectadas sólo en un lado con la parte principal 32 en forma de disco, mientras que los otros extremos están libres. Debido a esta construcción similar a dedos, las partes flexibles 33 son flexibles en la dirección perpendicular al plano principal del cuerpo 30 de disco de forma de anillo (en la Fig. 6, en las direcciones hacia arriba o abajo).

En el lado del fondo de las cámaras de termociclación 31 se dispone una abertura 34 de líquido con el fin de posibilitar el intercambio de líquido entre una cámara de termociclación 31 y una cámara de proceso de otra parte del cartucho. Esta abertura para líquido está localizada en el extremo de la parte flexible 33, que está alejado de la parte principal 32 en forma de anillo, de manera que esta abertura 34 para fluido y una superficie asociada 35 de cierre se pueden orientar en la dirección de la parte principal del cartucho con la que está conectado el cuerpo de RCP 30. Esta orientación de las partes flexibles 33 se logra por medios de orientación. Estos medios de orientación pueden estar situados en el cuerpo 30 de RCP y/o en la parte principal del cartucho. En la presente realización, los medios de orientación están comprendidos en un dispositivo de fijación separado, que también se usa para fijar el cuerpo 30 de RCP de la parte principal del cartucho. Este dispositivo de fijación se describirá más en relación a la Fig. 7.

Orientando las partes flexibles 33, o al menos la posición de la abertura de líquido 34 y la superficie asociada de cierre 35, se obtiene un mejor cierre entre el cuerpo de RCP 30 y la parte principal del cartucho. Es importante que tal cierre sea apropiado, dado que de esta manera se evita el escape de líquido contenido en el cartucho, y lo que es más importante, la contaminación de este líquido. Además, puesto que preferiblemente el cartucho es un sistema cerrado, como se ha descrito aquí antes, la orientación del cuerpo de RCP hacia la parte principal del cartucho evita el escape y la contaminación en especial cuando la presión interior en el sistema de líquido del cartucho es mayor que la presión ambiental exterior (aire). En esta realización, como se muestra en las Figs. 5 y 6, las superficies de cierre 35 son sustancialmente paralelas entre sí, lo que tiene la ventaja de que la orientación del cuerpo de RCP hacia la parte principal mejora el cierre de todas las aberturas 34 de líquido respecto a la parte principal. El cierre se mejora además con las varias partes flexibles 33 que se han descrito antes.

Se describirá ahora más detalladamente la construcción del cuerpo de RCP 30. El cuerpo de RCP 30 comprende un componente 36 que comprende la parte principal 32 en forma de anillo y seis partes flexibles 33. En cada una de estas seis partes flexibles 33 hay un hueco que delimita el fondo y los lados de las cámaras de termociclación 31. En la parte del componente 36 se ha colocado una hoja 37 para limitar el lado superior de las cámaras 31 de termociclación. La hoja 37 puede ser flexible de tal manera que, cuando se bombea líquido a las cámaras de termociclación, la hoja 37 se estira, con lo que se aumenta el espacio dentro de las cámaras de termociclación 31. La elasticidad de la hoja 37 puede usarse luego para bombear el líquido saliendo de las cámaras de termociclación 31. En el caso de que la hoja flexible 37 se diseñe para que se estire debido a la presión existente en las cámaras de termociclación 31, el hueco practicado en el componente 36 puede ser sustancialmente menor que el mostrado en la realización de la Fig. 7, o incluso puede omitirse.

La hoja 37 puede estar conectada al componente 36 con cualquier medio conocido, tal como usando un pegamento, una cinta (de dos lados), por soldadura y fusión. En vez de una hoja también se puede usar un material más rígido para cerrar el hueco para formar las cámaras de termociclación 31. Sin embargo, puede ser preferida una hoja a la vista de la capacidad de estiramiento antes mencionada y su bajo peso. Además, la hoja u otro material puede ser transparente de manera que se pueda ver el interior de las cámaras de termociclación 31 y/o se puede usar de un color específico como código para indicar el tipo de cuerpo de RCP, por ejemplo en la serie específica de cebadores.

Preferiblemente el componente 36 se hace de plástico por el procedimiento de moldeo por inyección. Sin embargo, el componente 36 también se puede hacer de otro material adecuado y por cualquier procedimiento adecuado. Preferiblemente la hoja 37 se hace de material plástico.

El cuerpo de RCP 30 comprende además un elemento de cierre 38 que comprende la superficie de cierre 35 y una parte de la abertura de líquido 34. El elemento de cierre 38 preferiblemente es de un material relativamente blando adecuado como material de cierre, tal como, por ejemplo, caucho. Proporcionando un elemento de cierre 38 separado, se puede

mejorar el cierre entre el cuerpo de RCP 30 y la parte principal del cartucho, puesto que el material y la forma del elemento de cierre 38 se puede diseñar en particular para el cierre.

Después de conectar el cuerpo de RCP 30 en la parte principal del cartucho, se puede girar el cuerpo de RCP 30 respecto a la parte principal del cartucho entre una primera posición abierta en la que la abertura de líquido 34 está en comunicación de líquido con una abertura de líquido de la parte principal del cartucho, y una segunda posición cerrada en la que está cerrada la comunicación de líquido entre la abertura de líquido 34 y la abertura de líquido asociada de la parte principal del cartucho. Estará claro para el experto en la técnica que en ambas posiciones, la cerrada y la abierta, el cierre entre el cuerpo de RCP 30 y la parte principal del cartucho ha de ser suficiente para impedir el escape y la contaminación. Por tanto, para ambas posiciones, la abierta y la cerrada, el elemento de cierre 38 tiene una superficie de cierre apropiada, que es la 35 para la posición abierta (lado izquierdo de la Fig. 6) y la 38 en la posición cerrada (lado de la derecha de la Fig. 6). En la Fig. 7 se muestra más detalladamente el elemento de cierre 38.

Moviendo el cuerpo de RCP 30 respecto a la parte principal del cartucho entre las posiciones abierta y cerrada, se usa como válvula la transición entre esas dos partes. Esto es ventajoso puesto que no se necesita un mecanismo de válvula separado con el fin de abrir y/o cerrar la comunicación de líquido entre las cámaras de termociclación 31 y la parte principal del cartucho. Esto es en particular ventajoso en la aplicación de la presente invención, dado que se usan cantidades relativamente pequeñas de líquido. La presencia de un mecanismo de válvula separado requeriría un espacio extra para el líquido, espacio que tendría que llenarse con líquido después de que se hubiera bombeado líquido a través del mecanismo de válvula. Este líquido fluido no puede usarse más en el procedimiento de RCP.

En la realización mostrada en las Figs. 5 y 6, todas las aberturas de líquido 34 se ponen en comunicación de líquido con las aberturas de líquido de la parte principal del cartucho en la posición abierta, mientras que para todas las aberturas de líquido 34, la comunicación de líquido está cerrada en la posición cerrada. En una realización alternativa es posible que la posición abierta para algunas aberturas 34 de líquido corresponda a la posición cerrada para otras aberturas de líquido 34, esto es, que algunas aberturas de líquido 34 estén en comunicación de líquido con la parte principal, mientras que las otras aberturas de fluido 34 estén cerradas. También es posible proporcionar más posiciones abiertas y/o cerradas, de manera que selectivamente se puedan poner una o varias aberturas de líquido 34 en comunicación de líquido con la parte principal, mientras que otras estén cerradas. Por ejemplo, con el cuerpo de RCP con seis cámaras de termociclación, puede haber una primera posición abierta en la que tres aberturas de líquido están en comunicación de líquido con la parte principal, mientras que las otras tres aberturas de fluido están cerradas, una segunda posición abierta en la que las otras tres aberturas de líquido están en comunicación de líquido con la parte principal y las tres primeras aberturas de líquido están cerradas, y una posición cerrada en la que todas las aberturas de líquido están cerradas. El mismo cuerpo de RCP puede comprender también siete posiciones que comprenden, por ejemplo, una posición cerrada en la que todas las aberturas de líquido están cerradas, y seis posiciones abiertas, de las que una abertura de líquido selectiva está en comunicación de líquido con la parte principal, mientras que las otras aberturas de líquido están cerradas. En la presente invención, se prefiere abrir simultáneamente todas las aberturas de fluido 34 de manera que con una sola acción de bombeo se puedan llenar todas las cámaras de termociclación con la misma cantidad de líquido.

En la circunferencia exterior de la parte principal 32 de forma de anillo del cuerpo 30 se proporciona un hueco 39 de manera que se conoce la posición girada del cuerpo de RCP 30 respecto a la parte principal del cartucho. Por esta razón se ha practicado un entalle en el cartucho que se puede poner en el hueco 39. El hueco 39 también se puede usar para girar el cuerpo de RCP 30 entre las posiciones abierta y cerrada. Sin embargo, en la presente invención este giro se transfiere al cuerpo de RCP 30 por el dispositivo de fijación (representado en la Fig. 8).

En la presente invención, el cuerpo de RCP 30 comprende seis cámaras de termociclación 31 en seis diferentes partes flexibles 33. Dependiendo de la aplicación real para la que se usa el cuerpo de RCP 30, se puede proveer un número diferente de cámaras de termociclación 31 con el mismo o diferente volumen. Puede haber dispuestas una o varias de estas cámaras de termociclación en una parte flexible 33. En tal realización también es posible que una cámara de termociclación 31 comprenda dos o más aberturas de líquido 34 o que una abertura 34 de líquido esté conectada con dos o más cámaras de termociclación 31. Con tales realizaciones del cuerpo de RCP 30, se puede usar fácilmente para cuerpos de RCP que tienen un número diferente de cámaras de termociclación, una parte genérica del cartucho que tiene un cierto número de aberturas de líquido para conectarlo con el cuerpo de RCP.

La Fig. 8 muestra una vista en perspectiva de un cuerpo de RCP 40 con diez cámaras de termociclación, cada una dispuesta en una parte flexible 43, conectada a la parte principal 41 del cartucho. Para fijar el cuerpo 40 de RCP en la parte principal 41 del cartucho, hay un dispositivo de fijación 42 que está colocado a través del centro del cuerpo de RCP 40 de forma de disco. El dispositivo de fijación 42 tiene una conexión de tipo click-fit con la parte principal 41 del cartucho, pero se pueden usar cualesquier otros medios de conexión adecuados tales como de tornillo o superposición. El dispositivo de fijación 42 comprende un número de medios de orientación en forma de muelles 44 cada uno de los cuales puede orientar una de las partes flexibles 43 del cuerpo de RCP hacia la parte principal 41. Además, el dispositivo de fijación 42 mostrado en la Fig. 8 se diseña para fijar la posición girada del cuerpo de RCP 40, puesto que el cuerpo de RCP sólo se puede colocar en una posición respecto al dispositivo de fijación 42.

Como las partes flexibles 43 son flexibles en la dirección en la que son orientadas, los elementos de muelle 4 empujan las superficies de cierre del cuerpo de RCP contra las superficies de cierre asociadas de la parte principal 41. Estos

proporciona un cierre apropiado entre la parte principal 41 y el cuerpo de RCP 40 y por ello impide el escape de líquido y/o la contaminación del sistema.

El extremo superior del dispositivo de fijación 42 está diseñado para ser conectado con un dispositivo de accionamiento en un aparato reutilizable para accionamiento del movimiento de giro del cuerpo de RCP 40 entre la posición abierta y la cerrada.

Estará caro para un experto en la técnica que la conexión de acuerdo con la invención entre el cuerpo de RCP 40 y la parte principal 41 del cartucho descrito antes se puede aplicar a cualquier otra combinación de dos componentes que se usan en el cartucho y entre los que se intercambia líquido durante el proceso de detección. Todas estas realizaciones están dentro del alcance de la presente invención.

5

10

REIVINDICACIONES

1. Un cartucho (5, 10) para la detección de la presencia, la ausencia y/o la cantidad de una secuencia de nucleótidos diana en una muestra que comprende una o varias secuencias de ácido nucleico en una muestra, cartucho (5, 10) que comprende un primer componente y un segundo componente que son conectables entre sí, comprendiendo el primer componente al menos una abertura de líquido y una primera superficie de cierre y comprendiendo el segundo componente al menos una segunda abertura de líquido (34) y una segunda superficie de cierre (35), en el que, después de la conexión del primer componente y el segundo componente, las aberturas de líquido primera y segunda (34) se pueden poner en comunicación de líquido y las superficies de cierre primera y segunda se pueden poner enfrentadas entre sí para cerrar la comunicación de líquido entre la primera abertura de líquido y la segunda abertura de líquido, caracterizado porque el cartucho (5, 10) comprende medios para orientar la segunda superficie de cierre (35) en la dirección de la primera superficie de cierre, en el que el segundo componente (30, 40) tiene forma de disco y comprende un cuerpo principal (32) de forma de anillo y un número de partes flexibles similares a dedos (33, 43), estando conectado un extremo de cada parte flexible (33, 43) al cuerpo principal (32) y estando libre un extremo opuesto de la parte flexible (33, 43), comprendiendo el extremo opuesto la segunda abertura de líquido (34) y la segunda superficie de cierre (35).
2. El cartucho de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la mencionada parte flexible (33, 43) es flexible en al menos una dirección perpendicular a la segunda superficie de cierre (35).
3. El cartucho de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el segundo componente (30, 40) comprende dos o más partes flexibles (33), teniendo cada una una segunda abertura de líquido (34) y una segunda superficie de cierre (35) asociada, siendo cada una flexible al menos en una dirección perpendicular a la respectiva segunda resistencia de cierre (35).
4. El cartucho de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que cada uno de los mencionados componentes primero y segundo (30, 40) comprende dos o más aberturas de líquido (34) y las correspondientes superficies de cierre, siendo cada una de las superficies de cierre primera y segunda sustancialmente planas, siendo los planos de cada una de las superficies de cierre primera y segunda, respectivamente, paralelas entre sí.
5. El cartucho de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el primer componente es una parte principal de un cartucho (41), y el segundo componente es un cuerpo de RCP (30, 40) que comprende una o varias cámaras de termociclación (31).
6. El cartucho de acuerdo con la reivindicación 5, en el que cada segunda abertura de líquido (34) es una entrada y salida para la una o las varias cámaras de termociclación (31).
7. El cartucho de acuerdo con la reivindicación 5 o 6, en el que la cámara de termociclación o cada una de las varias cámaras de termociclación (31) está formada por un espacio entre la parte principal (32) del cuerpo de RCP y una hoja flexible (37) que está unida a la parte principal (32) en los bordes del espacio, estando la segunda abertura de líquido (34) en comunicación de líquido con el espacio.
8. El cartucho de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el medio de orientación (44) está comprendido en un dispositivo de fijación (42) para fijar el segundo componente (30, 40) en el primer componente (41).
9. El cartucho de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el dispositivo de fijación (42) comprende al menos un elemento de muelle (44) para orientar la segunda superficie de cierre (35) en la dirección de la primera superficie de cierre.
10. El cartucho de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que, después de la conexión, el segundo componente (30, 40) es móvil respecto al primer componente entre al menos una primera posición en la que las aberturas de líquido primera y segunda están en comunicación de líquido y una segunda posición en la que la comunicación de líquido está obstruida.
11. El cartucho de acuerdo con la reivindicación 9, en el que, después de la conexión del primer componente y el segundo componente (30, 40), el segundo componente (30, 40) es giratorio respecto al primer componente en torno a un eje de rotación, y en el que cada uno de los componentes primero y segundo (30, 40) comprende dos o más aberturas de líquido (34) que está situadas sustancialmente en un círculo en torno al eje de rotación.
12. El cartucho de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10-11, en el que al menos uno de los componentes primero y segundo (30, 40) está provisto de un elemento de cierre (38) que comprende la primera abertura de líquido y la primera superficie de cierre o la segunda abertura de líquido (34) y la segunda superficie de cierre (35), respectivamente, estando configurado el elemento de cierre (38) para que proporcione en la primera posición una comunicación de líquido entre las aberturas de líquido primera y segunda, y en la segunda posición la obstrucción de la comunicación de líquido, estando además configurado el elemento de cierre (38) para cerrar las aberturas de líquido primera y segunda del ambiente en ambas posiciones primera y segunda.
13. El cartucho de acuerdo con la reivindicación 7-8 y la 10, en el que el dispositivo de fijación (42) está configurado para ser usado para mover el segundo componente (30, 40) entre la primera posición y la segunda posición.

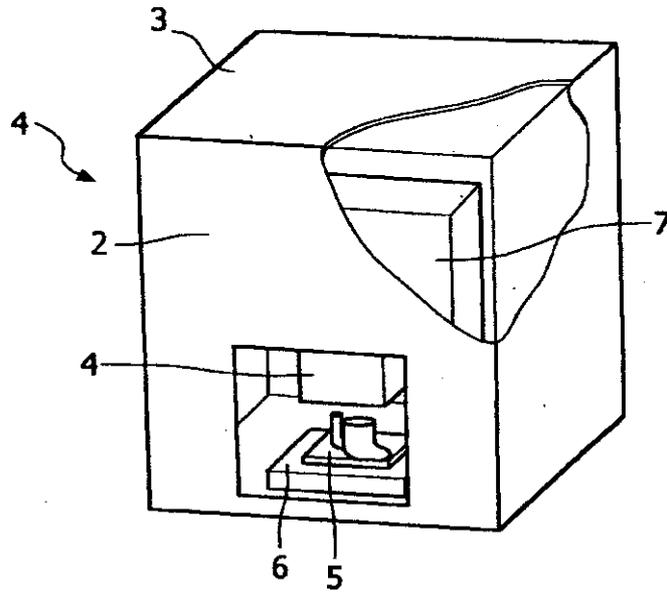


FIG. 1

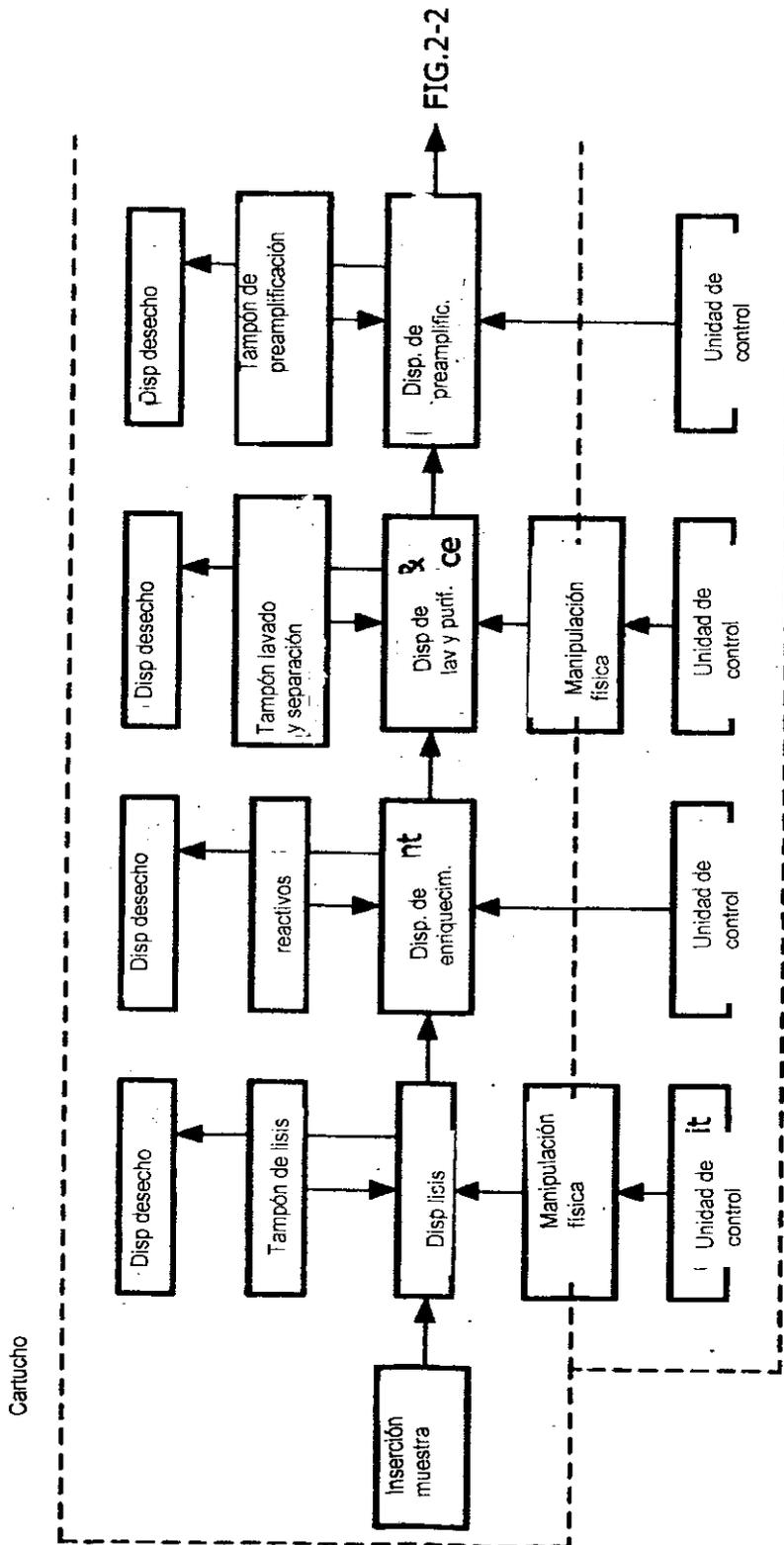


FIG. 2-1

FIG. 2-2

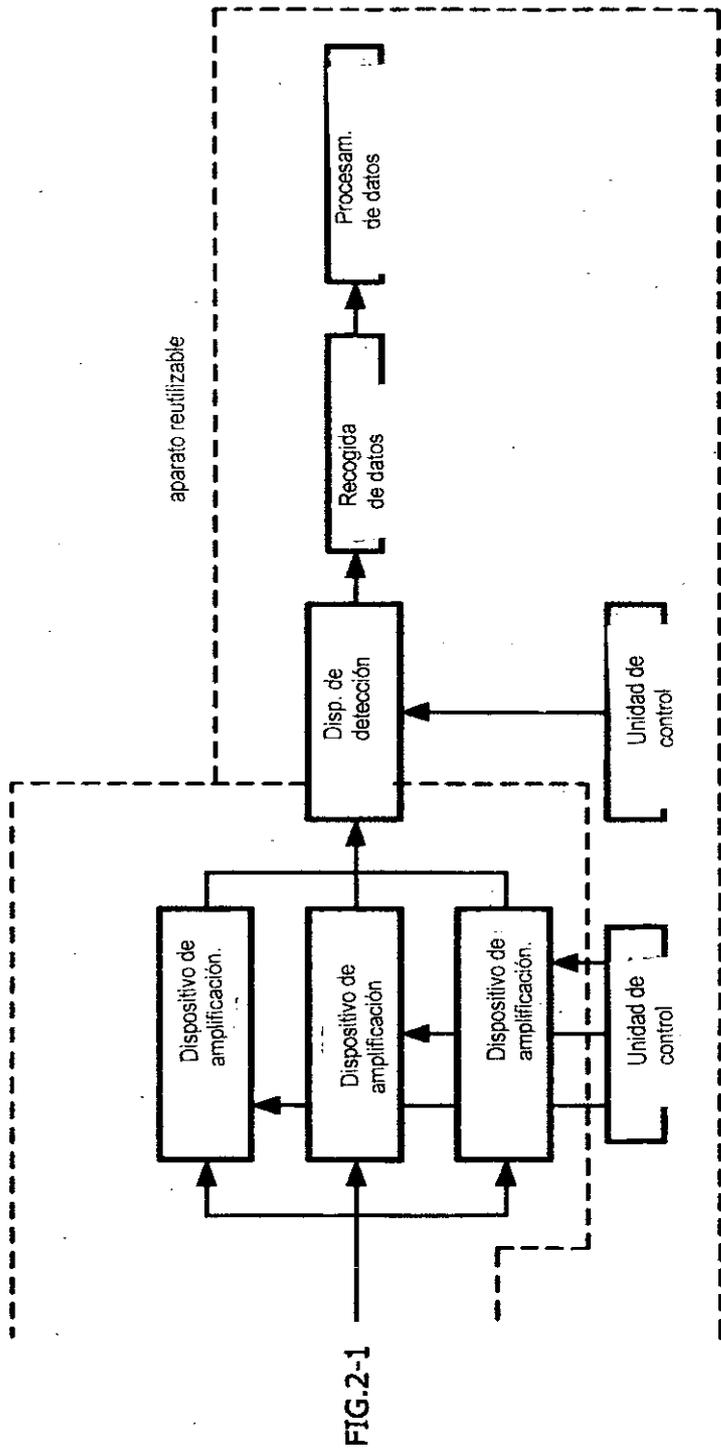
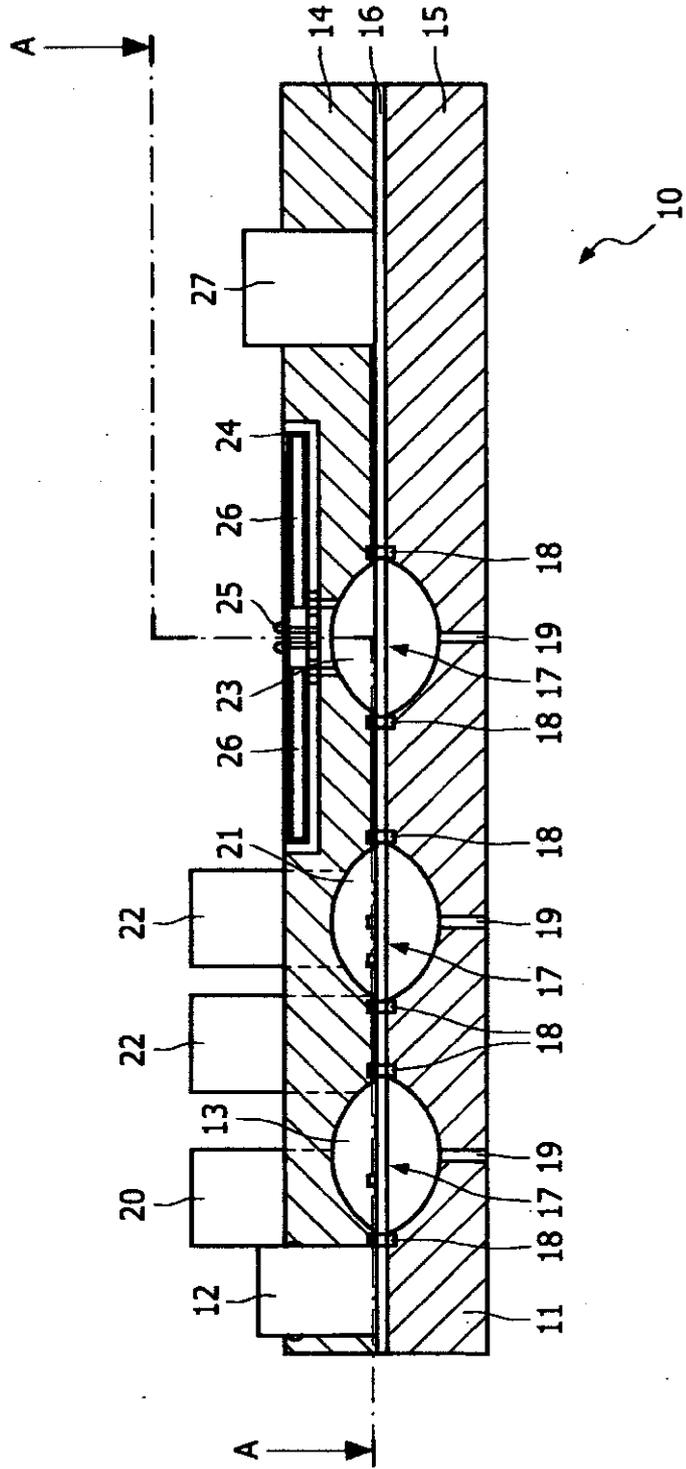


FIG. 2-2



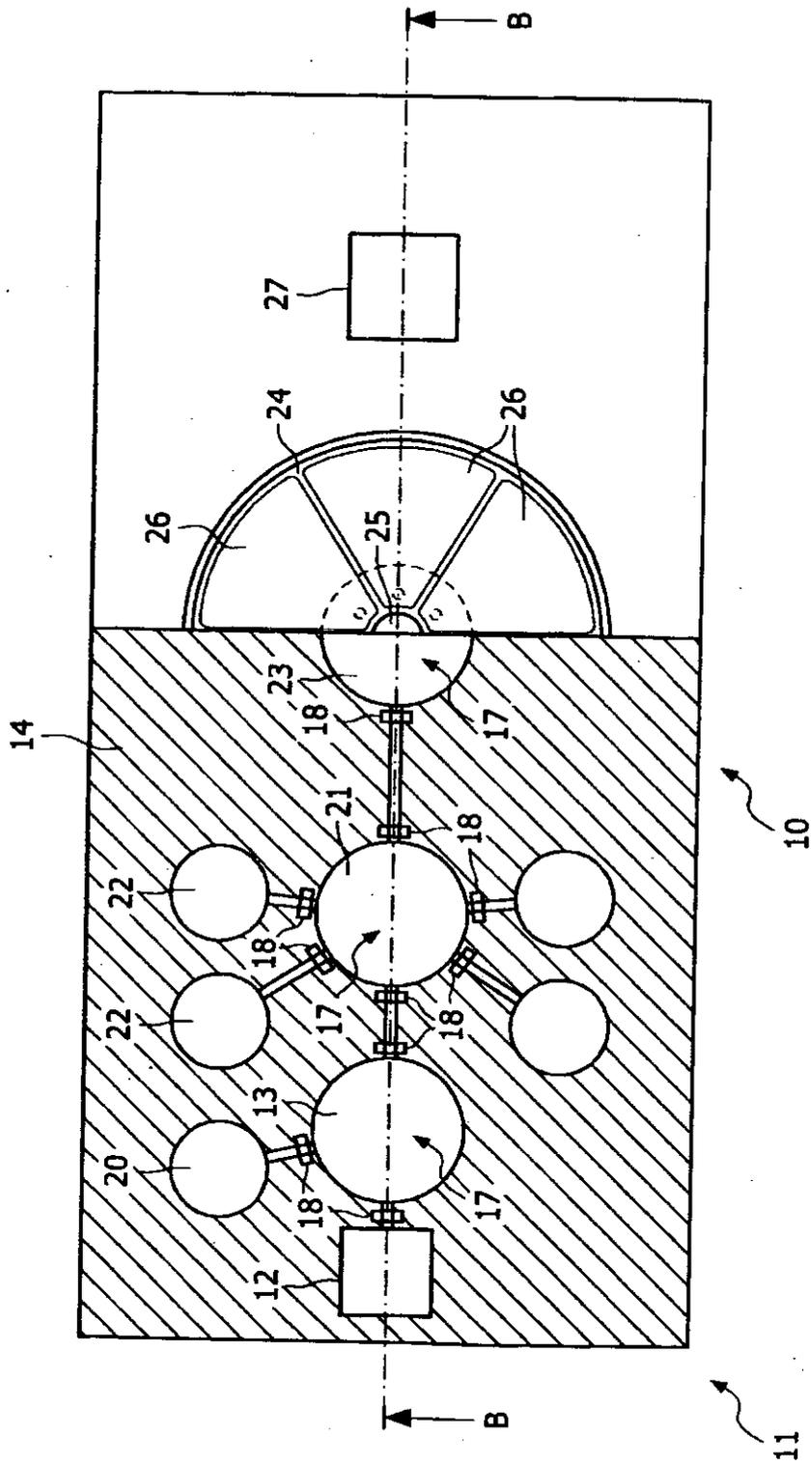


FIG. 4

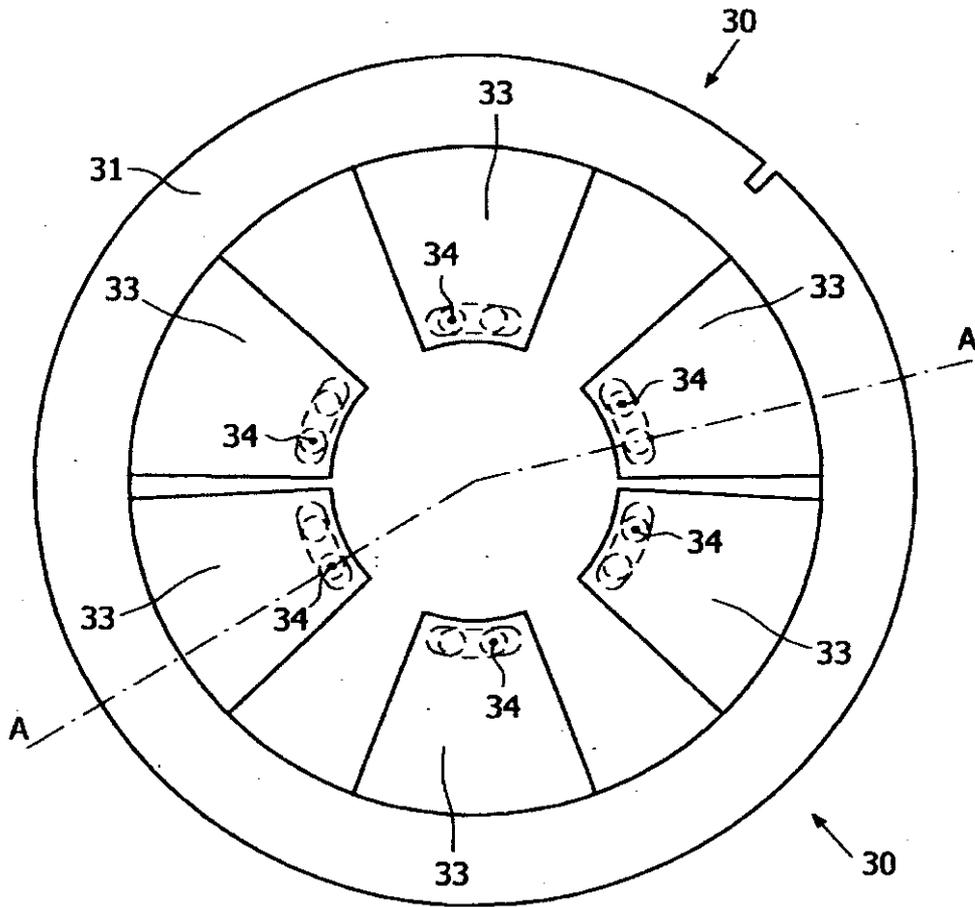


FIG. 5

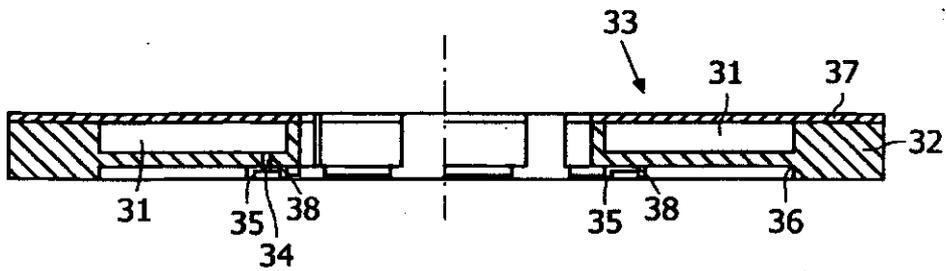


FIG. 6

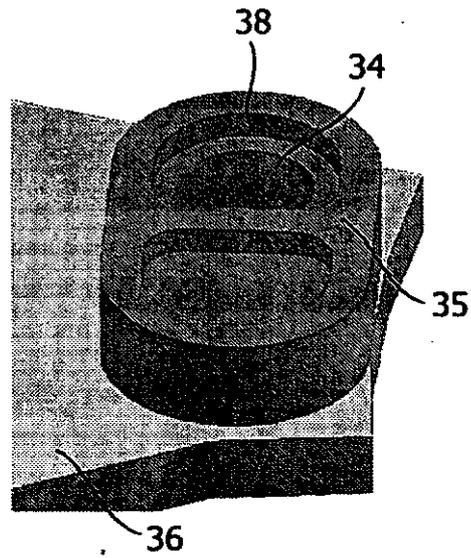


FIG. 7

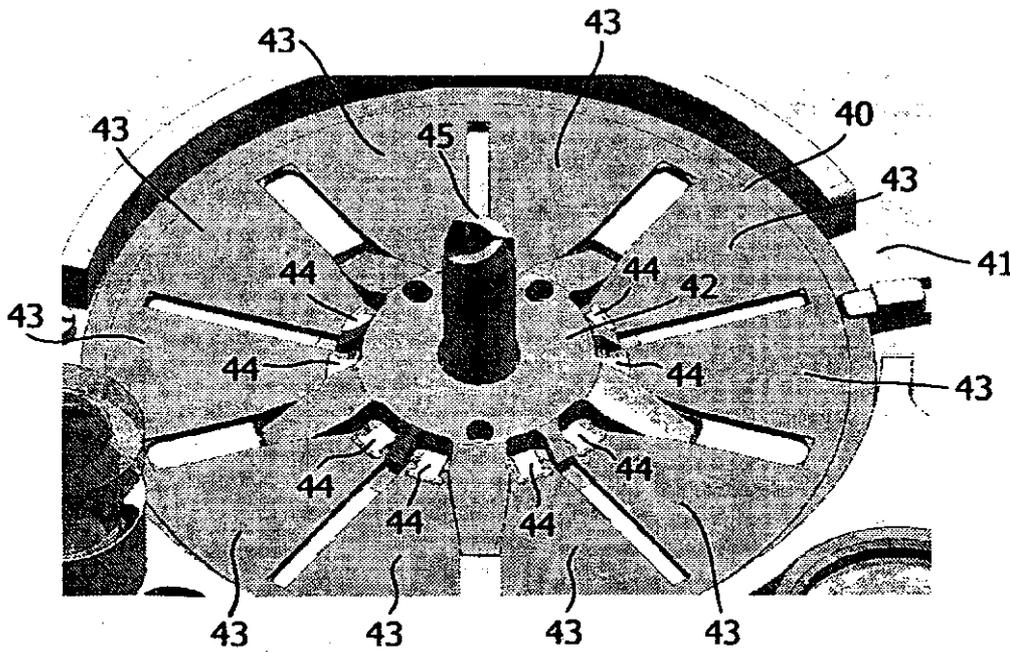


FIG. 8