

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 594 333**

51 Int. Cl.:

G01N 35/00 (2006.01)

B01L 3/02 (2006.01)

B25J 19/02 (2006.01)

B01L 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.05.2003 PCT/US2003/15602**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.11.2003 WO03097808**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.05.2003 E 03728991 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.07.2016 EP 1506413**

54 Título: **Sistema automatizado para aislar, amplificar y detectar una secuencia blanco de ácidos nucleicos**

30 Prioridad:

17.05.2002 US 380859 P

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

19.12.2016

73 Titular/es:

**BECTON, DICKINSON AND COMPANY (100.0%)
1 Becton Drive
Franklin Lakes, NJ 07417-1880, US**

72 Inventor/es:

**FORT, THOMAS;
COLLIS, MATTHEW;
THOMAS, BRADLEY y
HANSEN, TIMOTHY**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 594 333 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

Sistema automatizado para aislar, amplificar y detectar una secuencia blanco de ácidos nucleicos

Campo de la invención

5 La invención se refiere a la detección de ácidos nucleicos. Más en concreto, la invención se refiere a un sistema y a un procedimiento para el aislamiento, la amplificación y la detección de ácidos nucleicos blanco en un sistema completamente automatizado e integrado que comprende una pipeta, un extractor y un lector de análisis, así como muchos otros dispositivos, para detectar los ácidos nucleicos blanco.

Antecedentes de la invención

10 Ninguna de las referencias descritas o designadas en la presente memoria deben ser consideradas como técnica anterior de la invención reivindicada.

15 Diversas metodologías biológicas moleculares, como por ejemplo la secuenciación de ácidos nucleicos, la detección directa de secuencias concretas de ácidos nucleicos mediante hibridación, requieren que los ácidos nucleicos (ADN o ARN) queden separados de los componentes celulares restantes. Este proceso generalmente incluye las etapas de recogida de las células en un tubo de muestra y el lisado de las células con calor y / o con reactivo(s) lo que provoca que las células revienten y liberen los ácidos nucleicos (ADN o ARN) dentro de la solución del tubo. El tubo es a continuación situado en una centrifugadora, y la muestra es centrifugada para que los diversos componentes de las células se separen formando capas de densidad dentro del tubo. La capa de los ácidos nucleicos puede ser retirada de la muestra por una pipeta o cualquier instrumento apropiado. Las muestras son entonces lavadas y tratadas con reactivos apropiados, por ejemplo sondas de fludeoscoína, para que los ácidos nucleicos puedan ser detectados en un aparato, como por ejemplo el sistema ET BDProbe Tec®, fabricado por Becton Dickinson and Company y descrito en la Patente estadounidense No. 6,043,880 de Andrews et al.

20 Aunque las técnicas existentes para separar de las muestras de células los ácidos nucleicos pueden, en términos generales, resultar apropiadas, dichos procedimientos llevan tiempo y son complejos. Cuando se llevan a cabo manualmente, la complejidad y el número de etapas del tratamiento asociadas con un análisis basado en ácidos nucleicos introducen también posibilidades para el error de los facultativos, la exposición a elementos patógenos y a la contaminación cruzada entre análisis. Así mismo, aunque el proceso de centrifugado es en general eficaz para separar los ácidos nucleicos de los demás componentes celulares, determinadas impurezas que presentan la misma o similar densidad que los ácidos nucleicos pueden también recogerse en la capa de ácidos nucleicos, y deben ser retirados de la muestra de células con los ácidos nucleicos.

25 Recientemente se ha desarrollado una técnica que es capaz de separar de manera más eficaz los ácidos nucleicos de los componentes restantes de las células. Esta técnica conlleva el uso de partículas paramagnéticas, y se describe en la Patente estadounidense No. 5,973,130 de Mathew P. Collis.

30 En esta técnica, las partículas paramagnéticas o de otro tipo magnéticas o magnetizables son situadas en una solución ácida junto con las muestras de células. Cuando las muestras de células son lisadas para liberar los ácidos nucleicos, los ácidos nucleicos quedan ligados de manera reversible a las partículas. Las partículas pueden entonces ser separadas del resto de la solución mediante técnicas conocidas, como por ejemplo centrifugado, filtrado o fuerza magnética. La partícula a la que están ligados los ácidos nucleicos puede ser retirada de la solución y colocada en una solución tampón apropiada, lo que provoca que los ácidos nucleicos queden desligados de las partículas. Las partículas pueden entonces ser separadas de los ácidos nucleicos mediante cualquiera de las técnicas anteriormente descritas.

35 Ejemplos de sistemas y procedimientos para manipular partículas magnéticas se describen en las Patentes estadounidenses Nos. 3,988,240, 4,895,650, 4,936,687, 5,681,478, 5,804,067 y 5,567,326, en el documento EP-A-905520 y en el documento WO 96/09550.

40 Existen también técnicas para desplazar soluciones entre recipientes, como por ejemplo tubos de ensayo, pocillos de muestras, etc. En una técnica de pipeteo automatizada, con el fin de controlar apropiadamente un dispositivo de pipeta para extraer fluido de un recipiente de muestras como por ejemplo un tubo de ensayo, es necesario conocer el nivel del fluido de muestra del tubo para que la pipeta pueda ser bajada hasta la profundidad apropiada. También es necesario detectar si la punta de la pipeta ha sido adecuadamente conectada al dispositivo de pipeta. Procedimientos anteriores para detectar el nivel de un fluido en un recipiente incluyen el uso de la detección de la conductividad eléctrica. Este procedimiento requiere el uso de puntas de pipeta eléctricamente conductoras conectadas a un amplificador sensible que detecte pequeños cambios de la capacitación eléctrica de la punta de la pipeta cuando se sitúa en contacto con un fluido iónico. La detección de las puntas de la pipeta en este sistema conocido se consigue poniendo en contacto el extremo de la punta de la pipeta conductora con un conductor puesto a tierra. Los inconvenientes de este sistema incluyen el coste más elevado de las puntas de las pipetas conductoras y el hecho de que el procedimiento solo funciona con eficacia con fluidos iónicos. En otras palabras, si el fluido no es conductor, no proporcionará una trayectoria eléctrica apropiada para completar el circuito entre los conductores de la punta de la pipeta.

Un sistema y un procedimiento para la medición del nivel del fluido en un tubo de pipeta se ha descrito en la Patente estadounidense No. 4,780,833 concedida a Atake. El sistema y procedimiento de Atake conlleva la aplicación de aspiración del líquido que ha de medirse, manteniendo el líquido en un tubo o tubos de micropipeta, y proveyendo a los tubos de una porción de almacenaje que tiene un diámetro interior amplio y una porción tubular más fina con un diámetro más pequeño. Se incluye un manómetro para medir la carga potencial del tubo o tubos. Conociendo la carga hidrostática potencial medida en el tubo de pipeta y la gravedad específica del líquido, se puede verificar la cantidad de fluido contenido en el tubo de pipeta.

Los dispositivos utilizados en procedimientos de biología molecular pueden incorporar el dispositivo de pipeta mencionado anteriormente con dispositivos robóticos para conseguir unos desplazamientos controlados con precisión para desplazar de manera segura y cuidadosa los fluidos biológicos de las muestras de un recipiente a otro. Típicamente, estos dispositivos robóticos son capaces de acoplarse a las una o más anteriormente mencionadas puntas de pipeta y emplear una bomba de aire u otro dispositivo de presurización apropiado para extraer el fluido biológico de muestra introduciéndolo en las puntas de pipeta.

La aparición de las sondas de ADN, que pueden identificar una bacteria específica mediante las pruebas de la presencia de una secuencia única de ADN bacteriano de la muestra obtenida del paciente, ha aumentado en gran medida la velocidad y la fiabilidad de las pruebas diagnósticas clínicas. Una prueba del *Mycobacterium tuberculosis*, por ejemplo, se puede completar en cuestión de horas utilizando la tecnología de sondas de ADN. Esto permite que el tratamiento empiece más rápidamente, y evita la necesidad de periodos de tiempo prolongados de aislamiento del paciente. La técnica de separación de secuencias de ácidos nucleicos y la técnica del pipeteo descritas con anterioridad, pueden ser utilizadas para preparar muestras destinadas a ser utilizadas en combinación con la tecnología de las sondas de ADN con fines diagnósticos.

En el uso de sondas de ADN con fines diagnósticos, generalmente se lleva a cabo una reacción de amplificación de ácidos nucleicos con el fin de multiplicar el ácido nucleico elegido como blanco en muchas copias o amplicones. Ejemplos de reacciones de amplificación de ácidos nucleicos incluyen una amplificación de desplazamiento de la hebra (SDA), la amplificación por círculo rodante (RCA), la replicación por secuencias autosostenidas (3SR), la amplificación mediada por transcripción (TMA), la amplificación basada en la secuencia de ácidos nucleicos (NASBA), la reacción en cadena de la ligasa (LCR) y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En la literatura se describen procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos. Por ejemplo, la amplificación PCR, se describe por ejemplo por Mullis et al. en las Patentes estadounidenses Nos. 4,683,195, 4,683,202 y 4,800,159, y en *Methods in Enzymology*, 155: 335-350 (1987). Ejemplos de la amplificación SDA pueden encontrarse en Walker, *PCR Methods and Applications*, 3: 25-30 (1993), Walker et al., en *Nucleic Acids Res.*, 20: 1691-1996 (1992) y *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 89: 392-396 (1991). La LCR se describe en las patentes estadounidenses Nos. 5,427,930 y 5,686,272. Y diferentes formatos de TAA se proporcionan en publicaciones tales como Burg et al., en la patente estadounidense No. 5,437,990; Kacian et al. en las patentes estadounidenses Nos. 5,399,491 y 5,554,516 y Gingeras et al., en los documentos WO 88/01302 y WO 88/10315.

La detección de los amplicones de ácidos nucleicos puede llevarse a cabo de diversas maneras, implicando todas la hibridización (enlaces) entre el ADN blanco y sondas específicas. Procedimientos de detección con sonda de ADN muy habituales implican el uso de tintes de fluoresceína. Un procedimiento de detección es la transferencia de energía de fluorescencia. En este procedimiento, una sonda detectora es marcada tanto con un tinte de fluoresceína que emite luz cuando es excitado por una fuente externa, como con un extintor que suprime la emisión de luz procedente del tinte de fluoresceína en su estado original. Cuando están presentes amplicones de ADN, la sonda marcada con fluoresceína enlaza con los amplicones, se extiende y hace posible que se produzca la emisión de fluorescencia. El aumento de la fluorescencia se considera como una indicación de que la bacteria que provoca la enfermedad está presente en la muestra del paciente.

Otros procedimientos de detección resultarán evidentes a los expertos en la materia. Por ejemplo, un único marcador fluorescente puede ser empleado en la fracción indicadora con la detección de un cambio en la polarización de la fluorescencia en presencia del complemento de la fracción indicadora (véase la patente estadounidense No. 5,593,867). Los marcadores no fluorescentes también son útiles, por ejemplo, la fracción indicadora puede ser marcada con un tinte lipofílico y contener una zona de restricción que esté fisurada en presencia del complemento de la fracción indicadora (véase la patente estadounidense No. 5,550,025). Como alternativa, la sonda indicadora puede ser radiomarcada y los productos resultantes de las síntesis del complemento de la fracción indicadora pueden ser resueltos por electroforesis y visualizados por autorradiografía. También pueden emplearse marcadores inmunológicos. Una sonda indicadora es marcada con un hapteno puede ser detectada después de la síntesis del complemento de la fracción indicadora retirando en primer término la sonda indicadora no reaccionada (por ejemplo, mediante la captura de un adaptador específico en una fase sólida) y a continuación la detección del tubo de hapteno sobre la sonda indicadora reaccionada utilizando ELISAs quimioluminiscentes o colorimétricas. Un marcador biotinado puede ser sustituido por el hapteno y detectado utilizando procedimientos conocidos en la técnica.

Los compuestos quimioluminiscentes que incluyen ésteres de acridinio que pueden ser utilizados en un análisis de protección de hibridización (HPA) y a continuación detectados con un luminómetro (véanse las Patentes estadounidenses Nos. 4,950,613 y 4,946,958).

Una amplia categoría de dispositivos de posición que pueden ser utilizados en las diversas formas de realización de la invención (descritas con detalle de forma más acabada más adelante), son los lectores ópticos y los escáneres. Existen diversos tipos de lectores ópticos o escáneres que son capaces de excitar muestras de fluido con luz, y a continuación detectar cualquier tipo de luz que se genere por las muestras de fluido expuestas a la excitación. Por ejemplo, un aparato de escaneo de placa X - Y, como por ejemplo la Serie 4000 de CytoFluor fabricada por PerSeptive Biosystems es capaz de escanear una pluralidad de muestras de fluido almacenadas en una matriz o placa de micropocillos. El aparato incluye un cabezal de escaneo para emitir luz hacia una muestra concreta y para detectar la luz generada procedente de la muestra. El aparato incluye unos primero y segundo cables ópticos, presentando cada uno de ellos unos primero y segundo extremos. Los primeros extremos de los cables ópticos están integrados para formar un cable único "bifurcado" en forma de Y. El cabezal de escaneo incluye este extremo del cable bifurcado. El segundo extremo del primer cable óptico del cable bifurcado está configurado para recibir luz procedente de un dispositivo fotoluminiscente, por ejemplo una lámpara, y el segundo extremo del segundo cable del cable bifurcado está configurado para transmitir luz hacia un detector, por ejemplo un tubo fotomultiplicador.

Durante su operación, el cabezal óptico es situado para ser el extremo integrado de la fibra óptica bifurcada en una posición adecuada con respecto a uno de los micropocillos. El dispositivo fotoluminiscente es activado para transmitir luz a través del primer cable óptico del primer cable óptico bifurcado de manera que la luz sea emitida fuera del extremo integrado del cable óptico bifurcado hacia el pocillo de la muestra. Si la muestra de fluido fluoresce en respuesta a la luz emitida, la luz producida por la fluorescencia es recibida por el extremo integrado de la fibra óptica y es transmitida a través de la segunda fibra óptica hacia el detector óptico. La luz detectada es convertida por el detector óptico en una señal eléctrica, cuya magnitud es indicativa de la densidad de la luz detectada. La señal eléctrica es procesada por un ordenador para determinar si el AND blanco está presente o ausente de la muestra de fluido en base a la magnitud de la señal eléctrica.

Otro tipo existente de aparato se describe en la Patente estadounidense No. 5,473,437 de Blumenfeld et al. Este aparato incluye una bandeja que incorpora unas aberturas para recibir botellas de muestras de fluido. La bandeja incluye una pluralidad de fibras ópticas cada una de las cuales presenta un extremo que termina en una respectiva abertura de la bandeja. La bandeja está conectada a una rueda y puede estar en combinación con la rotación de la rueda. Los otros extremos de las fibras ópticas están dispuestos en circunferencia de forma sucesiva alrededor de la rueda y un dispositivo fotoluminiscente está configurado para emitir luz hacia la rueda para que la rueda rote, los extremos de las fibras ópticas reciben de forma secuencial la luz que es emitida por el dispositivo fotoluminiscente. Esto es, cuando la rueda rota hasta una primera posición, una fibra que se extiende desde la rueda hasta una de las aberturas queda alineada con el eje geométrico óptico del dispositivo fotoluminiscente y, de esta manera, la luz entrará en esa fibra y será transmitida hasta la abertura. El aparato incluye además un detector de luz que presenta un eje geométrico óptico alineado con el eje geométrico óptico de la luz emitida. Por consiguiente, si la muestra de la botella alojada en la abertura fluoresce debido a la luz de excitación, la luz emitida a partir de la muestra transmitirá a su través la fibra óptica y será detectada por el detector. La rueda a continuación continúa rotando hasta las posiciones en las que los extremos de las demás fibras ópticas queden alineadas con el eje geométrico óptico del emisor de luz y del detector de luz, y la emisión de luz y el proceso de detección se repiten para muestrear las muestras de fluido de las botellas almacenadas en las aberturas asociadas con aquellas fibras.

Otro tipo de aparato de pruebas ópticas se describe en la Patente estadounidense No. 5,518,923 de Bemdt et al. Dicho aparato incluye una pluralidad de dispositivos emisores / detectores de luz para analizar una pluralidad de muestras de fluido. Las muestras de fluido están contenidas en unos frascos situados dentro de las aberturas de una bandeja con forma de disco. La pluralidad de los dispositivos emisores / detectores de luz está en la dirección radial de la bandeja. Por tanto, cuando la bandeja rote, las muestras de cada fila circular pasarán por su respectivo dispositivo emisor / detector de luz, el cual transmitirá la luz al interior de la muestra y detectará todo tipo de luz que se genere por la muestra en respuesta a la luz emitida. En teoría, este aparato es capaz de analizar más de una muestra en cualquier momento determinado. Sin embargo, con el fin de conseguir esta capacidad de análisis de múltiples muestras, el sistema debe emplear una pluralidad de detectores de luz y una pluralidad de emisores de luz. Estos componentes adicionales incrementan en gran medida el coste del sistema. Por ejemplo, los tubos fotomultiplicadores, que en general son bastantes costosos, a menudo son utilizados como unidades detectoras de luz en dispositivos de este tipo. Por tanto, el coste de la unidad se incrementa en términos generales si se utiliza más de un tubo fotomultiplicador. Sin embargo, es conveniente utilizar el menor número posible de tubos fotomultiplicadores para mantener un precio competitivo del aparato. Sin embargo, los dispositivos que emplean un solo detector (por ejemplo un tubo fotomultiplicador) no son capaces de analizar una pluralidad de muestras sin algún tipo de movimiento mecánico para cada análisis.

Un aparato detector también se describe en la patente estadounidense No. 4,343,991 de Fujiwara et al. Este aparato emplea un único detector de luz y una pluralidad de dispositivos de emisión de luz para leer una muestra situada sobre una portadora de muestras, que es un medio sustancialmente transparente. En este aparato, la pluralidad de dispositivos de emisión de luz transmiten luz a través de unas correspondientes fibras ópticas. La luz emitida por las fibras ópticas pasa a través de la portadora y es recibida por unas correspondientes fibras ópticas dispuestas en el lado opuesto de la portadora. Las fibras de recepción terminan en un único detector de luz y los emisores de luz son operados para emitir luz en periodos de tiempo diferentes. Por tanto, la luz procedente de uno solo de los emisores pasa a través de la portadora en cualquier momento determinado y es detectada por el detector, el cual genera una señal proporcional a la intensidad de la luz detectada. Por tanto, se puede utilizar un único detector para detectar la

luz a partir de una pluralidad de dispositivos de emisión de luz. Cuando la luz pasa a través de una porción de la portadora que incluye una muestra, la intensidad de la luz se reduce debido a que parte de la luz es absorbida por la muestra. La cantidad a la que se reduce la intensidad de luz es proporcional a la concentración de material de muestra de la muestra. Debido a que la salida de la señal procedente del detector es proporcional a la luz detectada, la concentración de la muestra puede, de esta manera, ser determinada en base a la señal de salida.

Aunque existen por separado las técnicas de separación de ácidos nucleicos, las técnicas de pipeteo, y las técnicas organoeléctricas anteriormente mencionadas, se necesita un sistema integrado que combine sinérgicamente estos y otros instrumentos para crear un sistema avanzado, fácil de operar para el aislamiento, la amplificación y la detección de los ácidos nucleicos blanco para diagnosticar enfermedades mediante la manipulación de muestras de fluido. Los sistemas anteriores de tratamiento de muestras automatizados se limitaron a porciones automatizadas del proceso abandonando las tareas restantes a su realización por parte del técnico. Por ejemplo, muchos sistemas anteriores emplean una etapa de centrifugado manual que requiere que un técnico introduzca y extraiga los tubos de muestras de una centrifugadora externa. Otros sistemas requieren que un técnico transfiera los productos de extracción desde un instrumento de extracción de ácidos nucleicos a un instrumento de amplificación y / o detección.

Se han efectuado determinadas tentativas para conseguir una automatización limitada de sistemas de manipulación de muestras. Por ejemplo, determinados sistemas utilizan robots cartesianos para desplazar las muestras de un desplazamiento a otro. Como es conocido en la técnica, los robots cartesianos pueden desplazarse en las direcciones X, Y y Z, son capaces de llevar a cabo unas inserciones en línea recta y son fáciles de programar. Los robots cartesianos incorporan la estructura robótica más rígida para una longitud determinada, dado que los ejes pueden ser soportados en ambos extremos. Debido a su estructura rígida, los robots cartesianos pueden manipular cargas relativamente elevadas. Esto permite que sean utilizados en aplicaciones de recogida y colocación, la carga de máquinas herramientas y en piezas de apilamiento en archivos. Los robots cartesianos pueden también ser utilizados en operaciones de ensamblaje y en sistemas de distribución de líquidos. Ejemplos de dichos usos tienen lugar en aplicaciones de laboratorios (investigación genética) o en cualquier tarea que requiera un gran volumen y que sean repetitivas.

Un inconveniente de los robots cartesianos, sin embargo, es que requieren una gran superficie en la que puedan operar o, en otras palabras, ofrezcan una zona de recepción amplia con respecto a la relación trabajo - espacio. Otro inconveniente es que los robots cartesianos incorporan elementos mecánicos al descubierto que son difíciles de cerrar herméticamente respecto de entornos húmedos, corrosivos o polvorientos y son difíciles de descontaminar.

Así mismo, los robots de brazos robóticos articulados de respuesta selectiva (SCARA) han sido utilizados en el área del genoma para obtener colonias y transferirlas desde una placa de medios a una placa de muestras.

Aunque los sistemas analizados anteriormente pueden ser de utilidad en determinadas condiciones, existe la necesidad de contar con un sistema completamente automatizado para tratar un componente de interés, en el que dicho tratamiento incluye el aislamiento, la amplificación y la detección y en el que el componente de interés incluya una secuencia y / o proteína de ácidos nucleicos específica. Pueden conseguirse ventajas considerables mediante la automatización de diversas etapas del proceso de un análisis, incluyendo la reducción en gran medida del riesgo de un error por parte del usuario, la exposición patógena, la contaminación y el vertido, con el consiguiente aumento de la eficiencia. Las etapas de automatización de un análisis reducirán también la cantidad de adiestramiento requerida por los facultativos y la eliminación virtual de las fuentes de lesiones atribuibles a aplicaciones de gran volumen.

Sumario de la invención

Por tanto, es un objetivo general de la invención proporcionar un sistema de tratamiento novedoso que elimine o reduzca al mínimo los problemas del tipo anteriormente descrito.

Con el fin de conseguir este y otros objetivos de la presente invención, se proporciona un sistema completamente automatizado para tratar un componente de interés contenido en al menos una muestra, que comprende:

una estación de separación que comprende un dispositivo de extracción, adaptado para recibir y extraer el componente de interés de dicha muestra cuando la muestra está dispuesta en un tubo;

una estación de incubación de amplificación que comprende un calentador y un instrumento prensor de junta de placa, estando la estación de amplificación adaptada para recibir una placa de amplificación que comprende una pluralidad de pocillos;

una estación de detección, adaptada para detectar la presencia de dicho componente de interés extraído por dicho dispositivo de extracción, estando la estación de detección adaptada para recibir la placa de amplificación procedente de la estación de amplificación; y

un robot con un aparato de pipeteo asociado que utiliza unas puntas de pipeta desechables, adaptado para transferir automáticamente dicha muestra dentro del tubo del dispositivo de extracción y automáticamente transferir el componente de interés extraído de dicho dispositivo de extracción a la estación de amplificación y automáticamente alzar un instrumento prensor de junta de placa y sellar la placa de amplificación utilizando

5 dicho instrumento prensor de junta de placa para transferir automáticamente la placa de amplificación sellada desde la estación de amplificación hasta la estación de detección, en el que el robot es un brazo robótico articulado de respuesta selectiva (SCARA), en el que el SCARA está también adaptado para transferir un fluido hacia y retirar un fluido del dispositivo de extracción para ayudar al dispositivo de extracción a extraer el componente de interés.

10 De acuerdo con una forma de realización de la presente invención, la etapa de centrifugado anteriormente analizada se suprime y, en su lugar, se efectúa con el uso de un subsistema extractor de partículas magnéticas. La utilización de una captura de ácidos nucleicos no específicos proporciona las ventajas de un coste inferior de los reactivos y una robustez mejorada con respecto a sistemas de captura específicos más complejos. El bajo coste de las partículas de captura no específicas (óxido de hierro) hace posible una flexibilidad que incrementa la matriz de captura y la capacidad de enlace a escala sin una repercusión considerable del coste. El sistema utiliza un brazo robótico (SCARA) de calidad industrial que proporciona un posicionamiento preciso, repetible y fiable de la pipeta por oposición a las plataformas robóticas de manipulación de líquidos en laboratorio que utilizan componentes robóticos menos fiables.

15 Se proporciona también un procedimiento para tratar un componente de interés contenido en una muestra utilizando un sistema completamente automatizado según se ha definido anteriormente en la presente memoria, comprendiendo el procedimiento:

la transferencia automatizada de la muestra desde dicho recipiente hasta el dispositivo de extracción utilizando el SCARA;

20 la operación del dispositivo de extracción para extraer dicho componente de interés de dicha muestra efectuando una captura no específica del ácido nucleico blanco para extraer el ácido nucleico de la muestra sin separar el ácido nucleico blanco de un ácido nucleico no blanco que pueda existir en la muestra;

amplificar el ácido nucleico extraído, en el que dicho SCARA automáticamente transfiere el ácido nucleico extraído del dispositivo de extracción hasta la placa de amplificación;

25 operar un detector para detectar la presencia de dicho componente de interés extraído de dicho dispositivo de extracción y transferir automáticamente dicho componente de interés extraído de dicho dispositivo de extracción hacia dicho dispositivo de extracción, en el que dicha transferencia automática incluye la operación de un brazo robótico articulado de respuesta selectiva (SCARA) para efectuar dicha transferencia.

Breve descripción de los dibujos

30 Las características y ventajas novedosas de la presente invención se comprenderán de forma óptima con referencia a la descripción detallada de las formas de realización específicas que a continuación se relacionan, tomadas en combinación con los dibujos que se acompañan, en los cuales:

La FIG. 1 ilustra un procedimiento conocido para preparar manualmente múltiples muestras de especímenes para el aislamiento, la amplificación y la detección de secuencias blanco de ácidos nucleicos;

35 la FIG. 2 ilustra una vista en perspectiva de un sistema de preparación de especímenes múltiples automatizado, para el aislamiento, la amplificación y la detección de secuencias blanco de ácidos nucleicos de acuerdo con una forma de realización de la invención;

40 la FIG. 3 ilustra una vista interna del sistema de múltiples especímenes automatizado y completamente integrado para el aislamiento, la amplificación y la detección de secuencias blanco de ácidos nucleicos como el mostrado en la FIG. 2 de acuerdo con una forma de realización de la invención;

la FIG. 4 ilustra un diagrama de bloques del sistema de los componentes principales de un sistema de múltiple especímenes automatizado y completamente integrado como el que se muestra en la FIG. 2 y que se describe con mayor amplitud con referencia a la FIG. 3 y las figuras relacionadas;

45 la FIG. 5 ilustra una vista en perspectiva de un brazo robótico SCARA utilizado en el sistema de múltiples especímenes automatizado e integrado para el aislamiento, la amplificación y la detección de secuencias blanco de ácidos nucleicos de acuerdo con la forma de realización de la invención;

50 las Figs. 6 y 7 ilustran diferentes vistas en perspectiva de un montaje de pipeta de seis canales utilizado en el sistema de múltiples especímenes automatizado e integrado mostrado en la Fig. 2 para el aislamiento, la amplificación y la detección de secuencias blanco de ácidos nucleicos de acuerdo con una forma de realización de la invención;

la Fig. 8 ilustra un ejemplo de una punta de pipeta utilizada con el montaje de pipeta mostrado en las Figs. 6 y 7 en el sistema de múltiples especímenes automatizado e integrado de la Fig. 2 para el aislamiento, la amplificación y la detección de secuencias blanco de ácidos nucleicos de acuerdo con una forma de realización de la invención;

la Fig. 9 ilustra una vista en perspectiva de un bastidor de tubos con un sistema de identificación para su uso en el sistema de múltiples especímenes automatizado e integrado para el aislamiento, la amplificación y detección de secuencias blanco de ácidos nucleicos como el mostrado en las Figs. 2 y 3 de acuerdo con una forma de realización de la invención;

5 la Fig. 10 ilustra una perspectiva de una porción de la estación de identificación de un bastidor de tubos como el mostrado en la Fig. 9 para el uso de sistemas de múltiples especímenes automatizado e integrado para el aislamiento, la amplificación y detección de secuencias blanco de ácidos nucleicos de acuerdo con una forma de realización de la invención;

10 la Fig. 11 ilustra una vista en perspectiva en despiece ordenado que muestra una porción del montaje de la estación de identificación del bastidor de tubos como el mostrado en la Fig. 9 para su uso en el sistema de múltiples especímenes automatizado e integrado como el mostrado en las Figs. 2 y 3, para el aislamiento, la amplificación y detección de secuencias blanco de ácidos nucleicos de acuerdo con una forma de realización de la invención;

15 la Fig. 12 ilustra una vista en perspectiva de una estación de soporte de puntas de pipeta para su uso en el sistema de múltiples especímenes automatizado e integrado para el aislamiento, la amplificación y detección de secuencias blanco de ácidos nucleicos como el mostrado en las Figs. 2 y 3 de acuerdo con una forma de realización de la invención;

20 la Fig. 13 ilustra una vista en perspectiva de un soporte de puntas de pipeta con una estación de cambios de puntas para su uso en el sistema de múltiples especímenes automatizado e integrado para el aislamiento, la amplificación y detección de secuencias blanco de ácidos nucleicos como el mostrado en las Figs. 2 y 3 de acuerdo con una forma de realización de la invención;

25 la Fig. 14 ilustra una vista en perspectiva de unas placas de calentador de cebado para su uso en el sistema de múltiples especímenes automatizado e integrado para el aislamiento, la amplificación y detección de secuencias blanco de ácidos nucleicos como el mostrado en las Figs. 2 y 3 de acuerdo con una forma de realización de la invención;

la Fig. 15 ilustra una vista en perspectiva en despiece ordenado de un sistema extractor para su uso en el sistema de múltiples especímenes automatizado e integrado para el aislamiento, la amplificación y detección de secuencias blanco de ácidos nucleicos como el mostrado en las Figs. 2 y 3 de acuerdo con una forma de realización preferente de la invención;

30 la Fig. 16 ilustra una vista en perspectiva de una etapa de lector de análisis para su uso en el sistema de múltiples especímenes automatizado e integrado para el aislamiento, la amplificación y detección de secuencias blanco de ácidos nucleicos como el mostrado en las Figs. 2 y 3 de acuerdo con una forma de realización de la invención;

35 la Fig. 17 ilustra una vista en perspectiva de una placa de micropocillos de múltiples posiciones con unos pocillos para su uso en el lector de análisis de la Fig. 16 en el sistema de múltiples especímenes automatizado e integrado para el aislamiento, la amplificación y detección de secuencias blanco de ácidos nucleicos como el mostrado en las Figs. 2 y 3 de acuerdo con una forma de realización de la invención;

la Fig. 18 ilustra una vista en perspectiva de una placa de micropocillos de múltiples posiciones como la mostrada en la Fig. 17;

40 la Fig. 19 ilustra una vista en perspectiva de una porción de un montaje de micropocillos como la mostrada en la Fig. 17;

45 la Fig. 20 ilustra una vista en perspectiva un utensilio prensor de junta de placa para su uso en la aplicación de una placa de sellado a la placa de micropocillos mostrada en la Fig. 17 en el sistema de múltiples especímenes automatizado e integrado para el aislamiento, la amplificación y detección de secuencias blanco de ácidos nucleicos como el mostrado en las Figs. 2 y 3 de acuerdo con una forma de realización preferente de la invención; y

la Fig. 21 es un diagrama de flujo que ilustra un ejemplo de etapas de un procedimiento para operar el sistema de múltiples especímenes automatizado y completamente integrado para el aislamiento, la amplificación y detección de secuencias blanco de ácidos nucleicos como el mostrado en la Fig. 2.

50 **Descripción detallada de la forma de realización preferente**

A continuación se describirán las diversas características de la forma de realización preferente con referencia a las figuras en las que las mismas partes son identificadas con los mismos números de referencia.

La Fig. 1 ilustra un procedimiento conocido para preparar manualmente múltiples muestras de especímenes para el aislamiento, la amplificación y detección de secuencias blanco de ácidos nucleicos que emplea el Sistema ET de

BDProbe Tec™ que proporciona la detección sensible y específica de *Chlamydia trachomatis* (CT) y *Neisseria gonorrhoeae* (GC) a partir de muestras clínicas. La tecnología se basa en la Amplificación de Desplazamiento de la Hebra (SDA) homogénea y en la detección del ADN blanco. Actualmente, las muestras son procesadas, lisadas y manualmente pipeteadas desde los tubos de muestra hasta los pocillos de cebado y amplificación. El sistema 200, ilustrado en la Fig. 2, (y analizado con detalle más adelante) ha sido desarrollado para reducir al mínimo el pipeteo y reducir el periodo de contacto manual con los análisis de CT / GC del ET de BDProbe Tec™ mediante el pipeteo automático desde los tubos de muestra al extractor, aislando el componente de interés y a continuación transfiriendo el componente de interés a los pocillos de cebado y desde el cebado a los pocillos de amplificación.

Como se describe con mayor detalle más adelante, el sistema 200 consigue una automatización fiable mediante el uso de un brazo 524 robótico de calidad industrial (véanse las Figs. 3 y 5) el cual, en esta forma de realización, es un brazo robótico articulado de respuesta selectiva (SCARA) que ofrece un tiempo medio entre fallos de 20,000 horas hasta 10 años de un único turno de desplazamiento. El montaje 522 de pipeta está compuesto por unas puntas 528 de pipeta, así como por otros componentes, con un rango de 20 - 1100 $\mu\text{l} \pm$ un 10% con un Intervalo de Mantenimiento Preventivo (PMI) de > 1 año o 1,000,000 ciclos. A diferencia de otros instrumentales clínicos, el sistema 200 no utiliza tubuladuras perecederas para el desplazamiento del fluido.

Procedimiento para montar el sistema 200

En primer término, se energiza el sistema 200. En segundo lugar, las puntas de pipeta son cargadas sobre el sistema 200. En tercer lugar, los micropocillos de cebado y amplificación son cargados sobre el sistema 200. A continuación, en una cuarta etapa, las muestras son cargadas en la plataforma del instrumento. Los parámetros de muestra y el tipo de análisis son escogidos a través de una pantalla táctil en una quinta etapa, y en la etapa sexta el sistema 200 es habilitado para ejecutar el programa de tratamiento.

El sistema 200 reduce al mínimo el contacto manual con el pipeteo consiguiendo al tiempo los mismos resultados de especímenes de CT / GC por turno que el sistema manual ET de BDProbe Tec™.

Como se describirá a continuación, el sistema 200 mostrado en la Fig. 2 puede ser utilizado para el aislamiento, la amplificación y la detección de componentes de interés de acuerdo con una forma de realización de la invención. Estos componentes de interés pueden incluir la captura específica o no específica de ácidos nucleicos y / o proteínas. La Fig. 3 ilustra un diagrama de bloques de un sistema de múltiples especímenes automatizado y completamente integrado para el aislamiento, la amplificación y la detección de secuencias blanco de ácidos nucleicos de acuerdo con una forma de realización de la invención. El sistema de preparación de múltiples especímenes automatizado (sistema) 200 mostrado en la Fig. 3, está compuesto por una etapa 502 de lector de análisis, unas juntas 504 de placa, una pantalla 506 táctil LCD, un trazador 508 de teclado, un bastidor de tubos con un sistema 510 de identificación (bastidor ID de tubos), un soporte 512 de puntas de pipeta, un bastidor 514 de tubos de muestras de entrada, un extractor 516, un tablero 518 reactivo de bastidor de puntas de 5 posiciones, un orificio 520 de disipador, un brazo 524 robótico y unas placas 526 de calentador de cebado (con instrumento de vacío).

Existe más de un tipo de dispositivo de extracción que pueden ser utilizados de acuerdo con las formas de realización de la invención, descritas con mayor amplitud más adelante, como puede apreciar un experto en la materia. Un dispositivo de extracción de este tipo es un extractor 516, que se describe con detalle en la Solicitud de Patente estadounidense con el número de serie 09/573,540 "Sistema y Procedimiento para Manipular Partículas Magnéticas en Muestras de Fluido para Obtener el ADN o el ARN a partir de una Muestra", T. Hansen et al., y la Solicitud de Patente estadounidense con el número de serie 09/858,889 "Sistema y Procedimiento para Manipular Partículas Magnéticas en Muestras de Fluido para obtener el ADN o el ARN a partir de una Muestra", T. Hansen et al., (documento US20020008053 A1). Así mismo, el montaje 522 de pipeta se describe con mayor amplitud en la Solicitud de Patente estadounidense con el número de serie 10/073,207 "Un Sistema y un Procedimiento para Verificar la integridad de la Condición y Operación de un dispositivo de Pipeta para Manipular Muestras de Fluido", T. Hansen et al. (documento EP-A-1338339).

Existe más de un tipo de dispositivo de detección que pueden ser utilizados de acuerdo con las formas de realización de la invención, descritos más adelante con mayor amplitud, como puede apreciar un experto en la materia. Un dispositivo de detección de este tipo es un lector 502 de análisis que se describe con mayor amplitud en la Patente estadounidense No. 6,043,880 "Lector Óptico Automatizado para Análisis de Ácidos Nucleicos", J. Andrews et al. estos y otros tipos de dispositivos de detección fueron brevemente descritos en el apartado de antecedentes de la invención

La FIG. 4 ilustra un diagrama de bloques conceptual en el sistema 200, que muestra los componentes principales del sistema 200, y cómo son procesadas las muestras. Las líneas de puntos ilustran el momento en el que el brazo 524 robótico es utilizado para desplazar el material de muestras (con las puntas 528 de pipeta) y otros dispositivos. La FIG. 4 incluye un microcontrolador 564 (que puede también ser un PC "local" o "remoto"), o cualquier otro controlador apropiado. A lo largo del análisis subsecuente, y especialmente en combinación con la descripción que se acompañan en el procedimiento ilustrado en la FIG. 21, la operación del sistema 200 es controlada por un programa que puede ser almacenado y operado localmente y / o a distancia. Se excluye una descripción detallada

de dichos dispositivos y procedimiento, en cuanto un experto en la material relevante y relacionada puede comprender su operación. Dicho controlador puede incluir una pantalla 560, una impresora 562, un microcontrolador 564 con un ratón 568 y / o un teclado numérico 566, una memoria 558, una interfaz 570 de E / S y un bus 556 de datos / control.

5 Como se analizó anteriormente, el sistema 200 automatizado utiliza un brazo 524 robótico para llevar a cabo todas las etapas requeridas para aislar y amplificar ácido nucleico de una muestra de fluido. Los componentes incluyen un bastidor 510 de tubos de muestras de entrada con un mecanismo de unión de muestras (FIGS. 9 - 11), un subsistema 510 extractor utilizado para aislar y concentrar el ácido nucleico de la muestra de entrada (FIG. 15), unas estaciones de cebado y amplificación calentadas (FIG. 14) utilizadas para la amplificación de ácido nucleico aislado y unos lectores que monitorizan la amplificación de análisis blanco específicos (FIG. 16). Todas las etapas del proceso están totalmente automatizadas mediante el uso de un brazo robótico de calidad industrial (FIG. 5) con un aparato de pipeteo adjunto (FIGS. 6 - 8, 12 y 13) capaz de transferir fluidos utilizando unas puntas 528 de pipeta desechables para impedir la contaminación cruzada de las muestras de líquido. El montaje 522 de pipeteo utiliza unos transductores de presión para detectar la presencia de las puntas 528 de pipeta filtradas sobre la tobera de la pipeta y para detectar los niveles de líquido de los tubos de ensayo de las muestras (FIGS. 9 - 11). Un programa de ordenador que permite que sea introducida una entrada de ejecución específica por medio de un monitor 506 de pantalla táctil LCD controla todas las etapas del procesamiento.

El sistema 200 es completamente independiente dentro de un recinto con ventanas acrílicas deslizantes que protege al facultativo del brazo 524 robótico móvil e impide que escape cantidad alguna de aerosol que puede estar presente en las muestras líquidas. Unos recipientes sustituibles, accesibles desde la parte inferior del instrumento son utilizados para recoger las puntas 528 de pipeta contaminadas y de desechos líquidos.

A continuación se realizará la operación del sistema 200 que emplea el brazo 524 robótico SCARA como puede apreciar un experto en la materia, un robot SCARA realiza unos movimientos muy parecidos a los de un cuerpo humano. Estos dispositivos incorporan tanto una articulación de hombro y codo así como un eje geométrico vertical de muñeca y un movimiento vertical. Los robots SCARA fueron inventados en Japón a principios de los años 60 y han sido utilizados ampliamente desde entonces en muchas industrias diferentes.

Los robots SCARA son ideales para una diversidad de aplicaciones de propósito general que requieran unos desplazamientos de punto a punto rápidos, repetibles y articulados. Ejemplos de sus usos incluyen la paletización y la despaletización, la carga y descarga y el montaje. Debido a sus movimientos "de codo" exclusivos, los robots SCARA son también ideales para aplicaciones en las que se requiere una aceleración constante por medio de movimientos circulares, como por ejemplo la distribución y la formación en posición de juntas. Las articulaciones del robot SCARA son todas capaces de rotación y pueden ser completamente selladas y salvaguardadas, lo que es necesario en el caso de que el robot sea desplegado en entornos polvorientos o corrosivos. Los robots SCARA son en general más rápidos que los robots cartersianos y pueden llevar a cabo movimientos múltiples en sus articulaciones. El brazo 524 robótico, ilustrado en la FIG. 5, es un ejemplo de un brazo robótico tipo SCARA.

Las líneas que siguen son una descripción del procedimiento descrito en la Fig. 21, en la que se hace referencia a un uso específico de una de las formas de realización de la invención, que es el tratamiento de un ácido nucleico blanco. Sin embargo, como se ha descrito anteriormente y puede apreciar el experto en la materia, la invención no está limitada a esta forma de realización específica ni al tratamiento de un ácido nucleico blanco, sino que la invención ofrece diversas formas de realización y puede por el contrario ser utilizado para el tratamiento de ácidos nucleicos blanco o no blanco y / o proteínas blanco o no blanco. Con referencia a la FIG. 21, el procedimiento para operar el sistema 200 comienza con la etapa 102, en la que el usuario en primer lugar carga las puntas 528 de pipeta desechables, los tubos extractores, los reactivos líquidos, los micropocillos de cebado y amplificación y las juntas de placa. A continuación, un bastidor 510 de tubos de muestra vacío es colocado en posición dentro del registro del bastidor de tubos. El operario escanea el código de barras 510 del bastidor de tubos por medio del detector óptico del código de barras de sujeción manual y a continuación escanea cada tubo de muestras que debe ser analizado y coloca el tubo dentro del bastidor 510 de muestras. Cuando cada tubo está situado dentro del bastidor 510 de tubos, un teclado numérico 554 de membrana montado por debajo del bastidor 510 de tubos es activado, comunicando el emplazamiento del tubo con el ordenador. El operario continúa con la detección óptica de cada tubo y lo coloca dentro del bastidor 510 de tubos hasta que son cargados todos los tubos que deben ser tratados. Al final de este proceso el ordenador ha registrado la identidad del bastidor 510 de tubos y la información del paciente y el emplazamiento de cada tubo cargado en el bastidor 510 de tubos.

El bastidor 510 de tubos es a continuación colocado dentro de la estación 546 de tratamiento. Un lector de código de barras fijo situado por debajo del bastidor 510 de tubos lee la identificación del bastidor 510 de tubos y relaciona la identificación del bastidor 510 de tubos con la información de la base de datos del paciente registrada para ese bastidor 510 de tubos concreto. Esta información es rastreada hasta la etapa final del proceso cuando los resultados del paciente son impresos. A continuación, el usuario cierra las ventanas acrílicas e inicia la ejecución por medio de la pantalla táctil 506 LCD.

En la etapa 104, el brazo 524 robótico prende las puntas 528 de pipeta y transfiere el fluido de cada tubo de muestra hasta el interior de un correspondiente tubo 548 de extracción. Los tubos de extracción son prellenados con

- partículas magnéticas y con reactivos de lisado y cubiertos con una película de papel metalizado que el brazo 524 robótico perfora al distribuir la muestra de fluido al interior del tubo. El brazo 524 robótico mezcla la muestra para suspender los componentes del tubo de extracción. Todas las etapas de mezcla pueden ser dirigidas, pero no necesariamente, bajo la influencia de un campo de desmagnetización para facilitar la dispersión de las partículas. El
- 5 brazo 524 robótico desecha las puntas 528 de pipeta y obtiene nuevas puntas 528 de pipeta después de cada transferencia de muestras. Este proceso continúa hasta que todas las muestras han sido transferidas hasta el interior de sus correspondientes tubos extractores. Como alternativa, la muestra puede ser cargada directamente dentro del dispositivo extractor. En esta forma de realización, la muestra está en un recipiente que puede ser prellenado con los necesarios reactivos y / o con material para extracción.
- 10 En la etapa siguiente, etapa 106, unos calentadores 572 dispuestos dentro del subsistema 516 de extractor calientan la muestra hasta una temperatura apropiada que provoca la liberación de los microorganismos del ácido nucleico contenidos en la muestra biológica. Los calentadores 572 son a continuación desactivados haciendo posible que las muestras lisadas se enfríen. Como alternativa, en lugar de utilizar calor, o una combinación con calor, el ácido nucleico puede ser liberado de los organismos contenidos en la muestra biológica por medios químicos. Medios de
- 15 extracción química se describen en "Pretratamiento Químico de Plasma para Análisis de Amplificación de Ácidos Nucleicos" documento US con el número de serie 10/359,180 (documento US 20040157219) y "Procedimiento de Tratamiento para la Extracción de Ácido Nucleico a partir de Muestras Biológicas y Kits Correspondientes", documento US con el número de serie 10/359,179 (documento US 7601491).
- Después del enfriamiento, el brazo 524 robótico, en la etapa 108, prende nuevas puntas 528 de pipeta, aspira el reactivo de enlace, distribuye y mezcla el reactivo de enlace hasta el interior del primer grupo de tubos de extracción utilizando una punta 528 de pipeta diferente para cada muestra. Este proceso no enlaza específicamente el ácido nucleico sobre las partículas magnéticas. A continuación, en la etapa 110, unos imanes 550 dispuestos dentro del
- 20 subsistema 516 extractor son automáticamente desplazados en posición para recoger las partículas magnéticas sobre los lados de los tubos. El brazo 524 robótico, que utiliza las mismas puntas 528 de pipeta, aspira el líquido de desecho procedente de cada tubo extractor dejando las partículas magnéticas con el ácido nucleico total adscrito sobre el lado del tubo (etapa 111). Los imanes 550 entonces son desplazados hasta su posición original por debajo de los tubos, liberando así las partículas de los lados de los tubos.
- 25 En la etapa 112 el brazo 524 robótico prende nuevas puntas 528 de pipeta, aspira el reactivo de lavado, distribuye y a continuación mezcla el reactivo de lavado con las partículas magnéticas y con el material de ácido nucleico ligado.
- 30 En la etapa 114, los imanes 550 son a continuación desplazados en posición para bloquear las partículas a los lados del tubo y el brazo 524 robótico, utilizando las mismas puntas 528 de pipeta elimina el reactivo de lavado de desechos líquidos (etapa 115), dejando las partículas lavadas ligadas de ácido nucleico bloqueadas en el lateral de los tubos. Los imanes 550 son entonces desplazados hasta la posición por debajo de los tubos. En la etapa 116 un tampón de elusión es a continuación distribuido al interior de, y mezclado con, las partículas magnéticas, liberando
- 35 de este modo de las partículas magnéticas del ácido nucleico total (etapa 117). Un volumen del tampón de elusión que es menor con respecto al volumen de la muestra de entrada puede ser utilizado para concentrar eficazmente los ácidos nucleicos. En la etapa 118 los imanes 550 son desplazados hacia arriba hasta la posición de bloqueo y el brazo 524 robótico pipetea la muestra eluida que contiene el ácido nucleico concentrado al interior de los pocillos de cebado (etapa 119). Más detalles de los procesos de enlace de ácido nucleico no específicos se desarrollan en la Solicitud de Patente estadounidense con el número de serie 09/858,889, referenciada anteriormente.
- 40 Después de un periodo de incubación a temperatura ambiente de 20 minutos, son habilitadas las placas 526 de calentador de cebado, elevando la temperatura de los pocillos de cebado a una temperatura de calor apropiada, lo que disgrega los oligonucleóticos no específicamente hibridizados (etapa 120). En la etapa 121, el brazo 524 robótico, a continuación, aspira el volumen apropiado de muestra a partir de los pocillos de cebado y lo distribuye al
- 45 interior de los pocillos de amplificación / lector. Después de que todas las muestras han sido transferidas desde la placa 526 de calentador de cebado hasta la placa 530 de amplificación, el brazo 524 robótico prende el instrumento 544 prensor de junta de placa, prende una junta 504 de placa y coloca la junta 504 de placa sobre la placa 530 de amplificación. La placa 530 de amplificación sellada es transferida al interior de la cámara 502 de lector de análisis, la cual mantiene una serie de temperaturas requeridas para la amplificación de los ácidos nucleicos blanco (etapa
- 50 122).
- En la etapa 124, la cámara 502 de lector de análisis desplaza la placa 530 de amplificación sellada por encima de los cabezales 552 leídos para detectar los productos de amplificación de ácidos nucleicos. La cámara 502 de lector de análisis determina el resultado de la prueba y facilita los datos por medio de un impreso. Los emplazamientos de los resultados de las pruebas se hacen coincidir con el emplazamiento de los tubos de muestra originales. Dos
- 55 conjuntos de placas de cebado y dos conjuntos de placas de amplificación / lector son suministradas para soportar una o dos pruebas por muestra. Más detalles del lector de análisis se desarrolla en la Patente estadounidense No. 6,043,880 anteriormente referenciada.
- Procedimientos alternativos de tratamiento de muestras incluyen la extracción automática de ácidos nucleicos con el uso de membranas de silicio. En este caso, los fluidos de las muestras lisadas mezclados con reactivos de enlace son pipeteados hasta el interior de una vasija abierta con una membrana de silicio suspendida en el centro. Se aplica un vacío para arrastrar la muestra a través de la membrana atrapando el ácido nucleico de la membrana y
- 60

5 haciendo posible que el fluido de desecho restante sea descartado. Unos reactivos son entonces utilizados para liberar el ácido nucleico de la membrana. Problemas con el automatismo de este sistema requieren el montaje y desmontaje de una cámara de vacío. La utilización de automatización para conseguir esta tarea compleja puede ser problemática especialmente teniendo en cuenta que todas las partes deben ser estancas al aire. Así mismo, las secciones no utilizadas del dispositivo deben estar bloqueadas (generalmente de forma manual con una cinta) para hacer posible que se consiga un vacío uniforme sobre la porción activa del dispositivo.

10 La captura eficiente de los ácidos nucleicos totales (incluyendo copias bajas de blancos de interés específicos) es particularmente problemática en muestras con un alto contenido proteínico más viscosas como por ejemplo plasma. Mediante la optimización del proceso de extracción se han desarrollado unos protocolos que utilizan el sistema 200, los cuales hacen posible una captura eficiente de los ácidos nucleicos en muestras viscosas como por ejemplo plasma y en torundas vaginales obtenidas por presión. Avances cruciales han incluido la reducción al mínimo del revestimiento proteínico de las partículas mediante la introducción de las partículas después del tratamiento con plasma. Esto reduce el concurso de puntos de enlace potenciales entre los ácidos proteínicos y nucleicos y reduce la agregación de partículas debida a las interacciones proteína - proteína. La reducción al mínimo de la agregación de partículas, a su vez, facilita una mezcla más eficiente de las partículas. La implantación de un campo de desmagnetización durante la mezcla de la aspiración también potencia la eficiencia de la mezcla reduciendo al mínimo la agregación de partículas debido al magnetismo de las partículas residuales. La combinación de estos avances permite la extracción eficiente de ácidos nucleicos a partir de muestras proteínicas viscosas sin la ayuda de sales caotrópicas.

20

REIVINDICACIONES

1.- Un sistema completamente automatizado para tratar un componente de interés contenido en al menos una muestra, que comprende:

5 una estación de separación que comprende un dispositivo (516) de extracción, adaptado para recibir y extraer el componente de interés de dicha muestra cuando la muestra está dispuesta en un tubo;

una estación de incubación de amplificación que comprende un calentador (526) y un instrumento (544) prensor de junta de placa, estando la estación de amplificación adaptada para recibir una placa (530) de amplificación que comprende una pluralidad de pocillos;

10 una estación (502) de detección, adaptada para detectar la presencia de dicho componente de interés extraído por dicho dispositivo (516) de extracción, estando la estación (502) de detección adaptada para recibir la placa (530) de amplificación proveniente de la estación de amplificación; y

15 un robot (524) con un aparato (522) de pipeteo adjunto que utiliza unas puntas (528) de pipeta desechables, adaptado para transferir automáticamente dicha muestra dentro del tubo del dispositivo (516) de extracción y transferir automáticamente el componente de interés extraído desde dicho dispositivo (516) de extracción hasta la estación de amplificación y alzar automáticamente un instrumento (544) prensor de junta de placa y sellar la placa (540) de amplificación utilizando dicho instrumento (544) prensor de junta de placa y transferir automáticamente la placa (540, 530) de amplificación sellada desde la estación de amplificación hasta la estación (502) de detección, en el que el robot (524) es un brazo robótico articulado de respuesta selectiva (SCARA), en el que el SCARA está también adaptado para transferir fluido hacia y retirar fluido del dispositivo (516) de extracción para ayudar al dispositivo (516) de extracción a extraer el componente de interés.

20

2.- Un sistema automatizado de la reivindicación 1, en el que

el componente de interés incluye un ácido nucleico;

25 estando el dispositivo (516) de extracción adaptado para extraer de la muestra dicho ácido nucleico; estando el dispositivo (502) de detección adaptado para detectar la presencia de dicho ácido nucleico extraído; y

estando el SCARA (524) adaptado para transferir automáticamente el ácido nucleico extraído hacia los pocillos de muestra dispuestos en la placa de amplificación.

3.- El sistema automatizado de la reivindicación 1, en el que dicho dispositivo (516) de extracción está adaptado para llevar a cabo una captura no específica de dicho componente de interés para extraer de la muestra dicho componente de interés.

30

4.- El sistema automatizado de la reivindicación 3, en el que dicho componente de interés es una proteína.

5.- El sistema automatizado de la reivindicación 1, en el que el dispositivo (516) de extracción, la estación (526) de amplificación y el dispositivo (502) de detección están integrados como una sola unidad.

35 6.- El sistema automatizado de la reivindicación 1, que comprende además un bastidor (510) de muestras, adaptado para recibir al menos un recipiente que contiene la muestra, en el que el SCARA (524) transfiere automáticamente, la muestra desde el recipiente hasta el dispositivo (516) de extracción.

7.- Un procedimiento para tratar un componente de interés contenido en una muestra que utiliza el sistema completamente automatizado de la reivindicación 6, comprendiendo el procedimiento:

40 la transferencia automática de la muestra desde dicho recipiente hasta el dispositivo de extracción utilizando el SCARA (524);

a operación del dispositivo (516) de extracción para extraer dicho componente de interés de dicha muestra llevando a cabo una captura no específica del ácido nucleico blanco para extraer el ácido nucleico de la muestra sin separar el ácido nucleico blanco del ácido nucleico no blanco que pueda existir en la muestra;

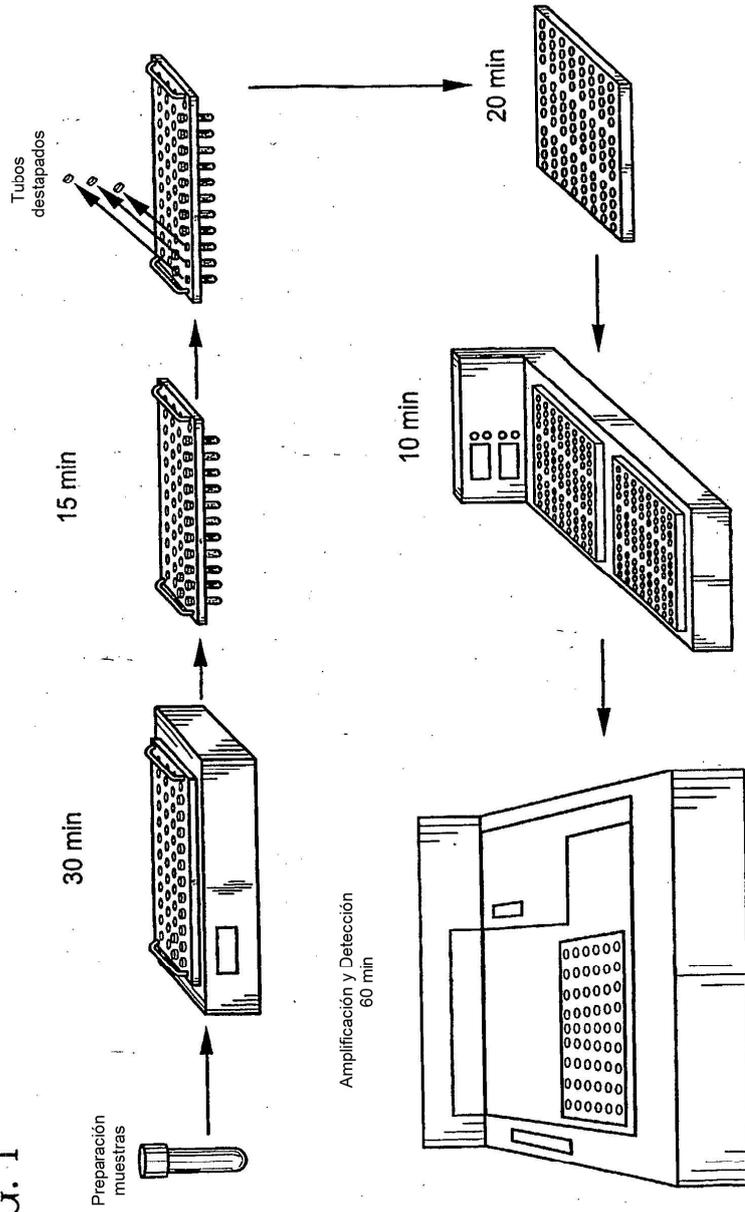
45 la amplificación del ácido nucleico extraído, en el que en dicho SCARA (524) transfiere automáticamente el ácido nucleico extraído desde el dispositivo (516) de extracción hasta la placa (530) de amplificación;

50 la operación de un detector (502) para detectar la presencia de dicho componente de interés extraído por dicho dispositivo (516) de extracción y la transferencia automática de dicho componente de interés extraído desde dicho dispositivo (516) de extracción hasta dicho dispositivo (502) de detección, en el que dicha transferencia automática incluye la operación de un brazo robótico articulado de respuesta selectiva (SCARA) para llevar a cabo dicha transferencia.

- 8.- El procedimiento de la reivindicación 7, en el que
el componente de interés incluye un ácido nucleico;
la etapa de operación del dispositivo (516) de extracción extrae el ácido nucleico de la muestra;
la etapa de operación del dispositivo (516) de detección detecta la presencia del ácido nucleico extraído; y
- 5 la etapa de transferencia automática transfiere la muestra hasta el dispositivo (516) de extracción, y transfiere automáticamente el ácido nucleico extraído hasta dicho dispositivo (502) de detección.
- 9.- El procedimiento de la reivindicación 7, en el que
el componente de interés incluye un ácido nucleico;
y
- 10 la etapa de operación del dispositivo (516) de extracción incluye la amplificación automática del ácido nucleico a partir de la muestra.
- 10.- El procedimiento de la reivindicación 9, en el que la amplificación incluye el calentamiento del ácido nucleico.
- 11.- El procedimiento de la reivindicación 7, en el que la etapa de operación del dispositivo de extracción lleva a cabo la captura no específica del componente de interés para extraer de la muestra el componente de interés.
- 15 12.- El procedimiento de la reivindicación 11, en el que el componente de interés es un ácido nucleico.
- 13.- El procedimiento de la reivindicación 11, en el que el componente de interés es una proteína.
- 14.- El procedimiento de la reivindicación 7, en el que el dispositivo de extracción y el dispositivo de detección están integrados formando una sola unidad.
- 15.- El procedimiento de la reivindicación 7, que comprende además la transferencia automática de fluido hasta el dispositivo (516) de extracción para ayudar al dispositivo de extracción a extraer el ácido nucleico blanco.
- 20 16.- El procedimiento de la reivindicación 7, en el que el componente de interés es un ácido nucleico y dicha muestra es una muestra de fluido, y en el que el procedimiento es un procedimiento automatizado para aislar y amplificar una secuencia de ácidos nucleicos blanco que puede estar presente en una muestra, comprendiendo además el procedimiento:
- 25 la separación automática de dicha secuencia blanco de dicha muestra de fluido en una estación de separación llevando a cabo un enlace no específico sobre la secuencia blanco sin necesidad de separar físicamente la secuencia blanco de cualquier secuencia no blanco que pueda existir en la muestra antes de la separación, y en el que dicho SCARA (524) transporta automáticamente la secuencia blanco separada desde la estación (516) hasta una estación de incubación amplificante.

30

FIG. 1



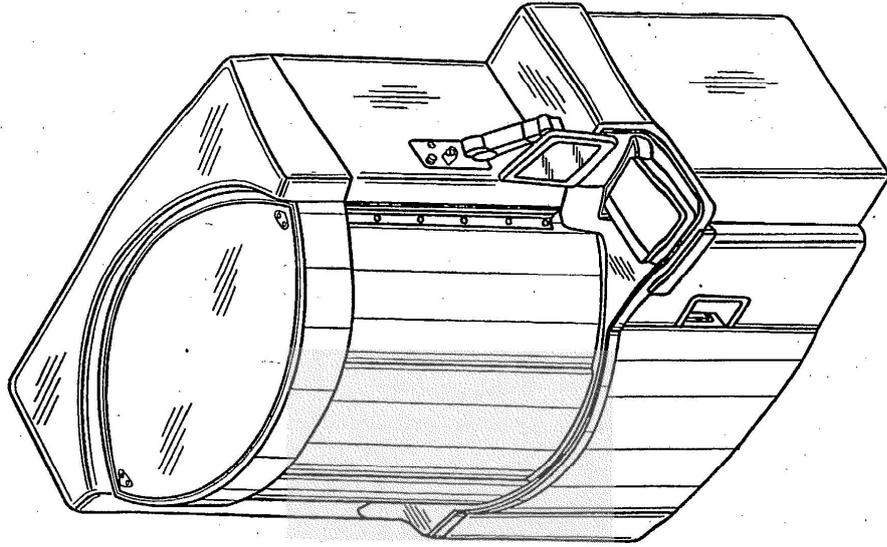


FIG. 2



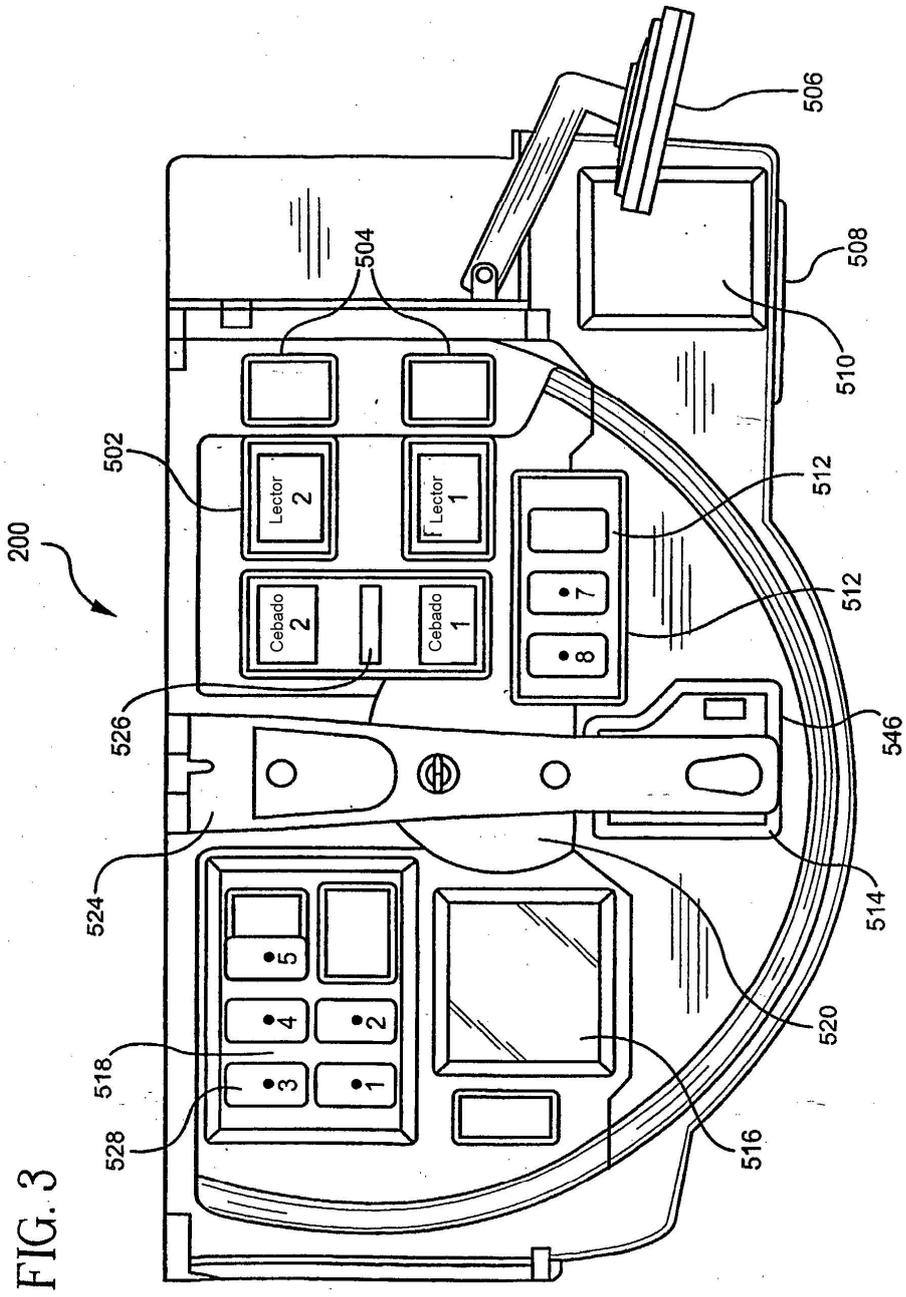
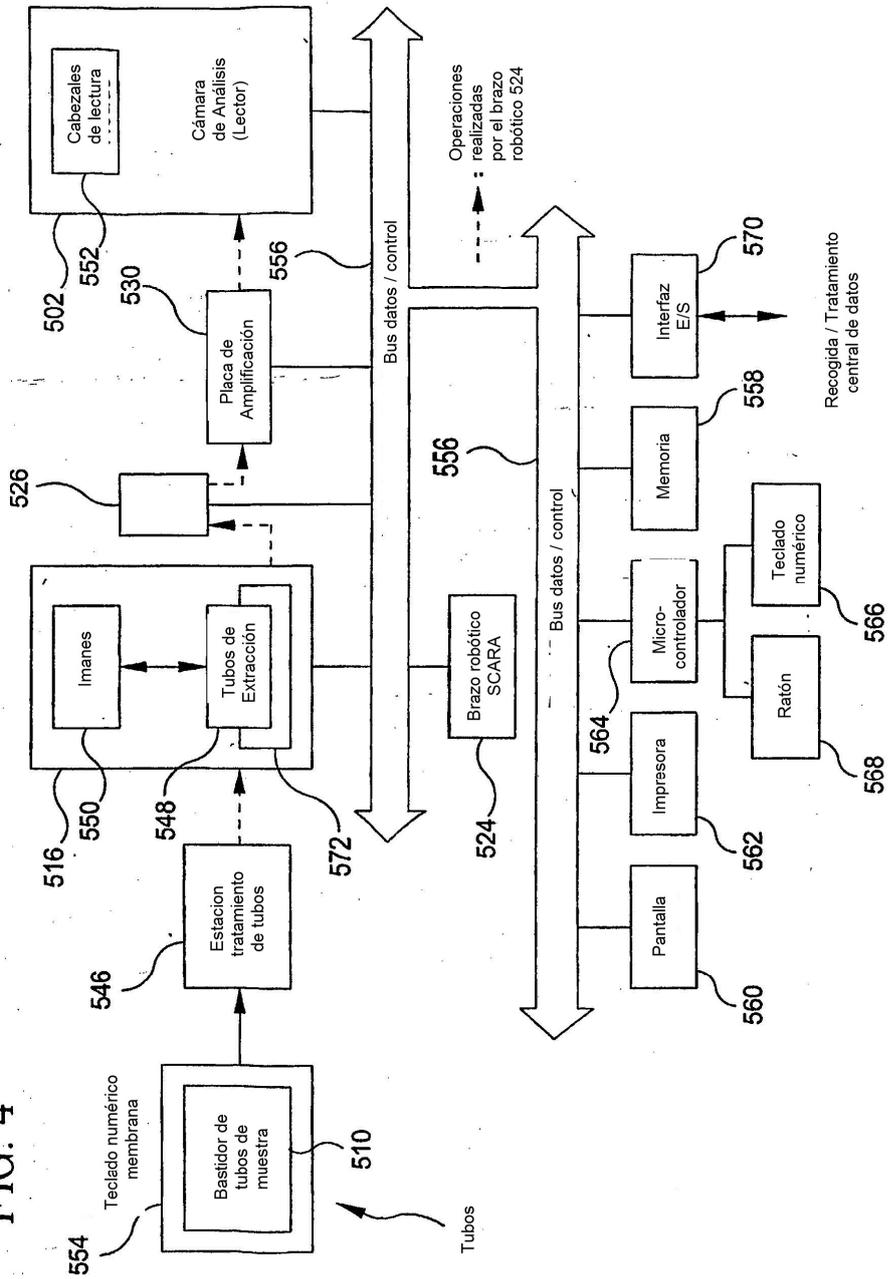


FIG. 4



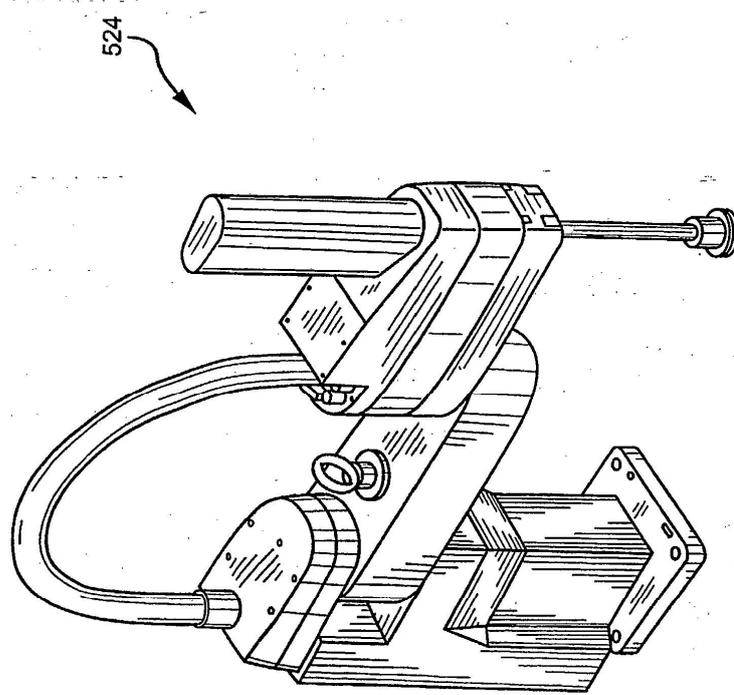


FIG. 5

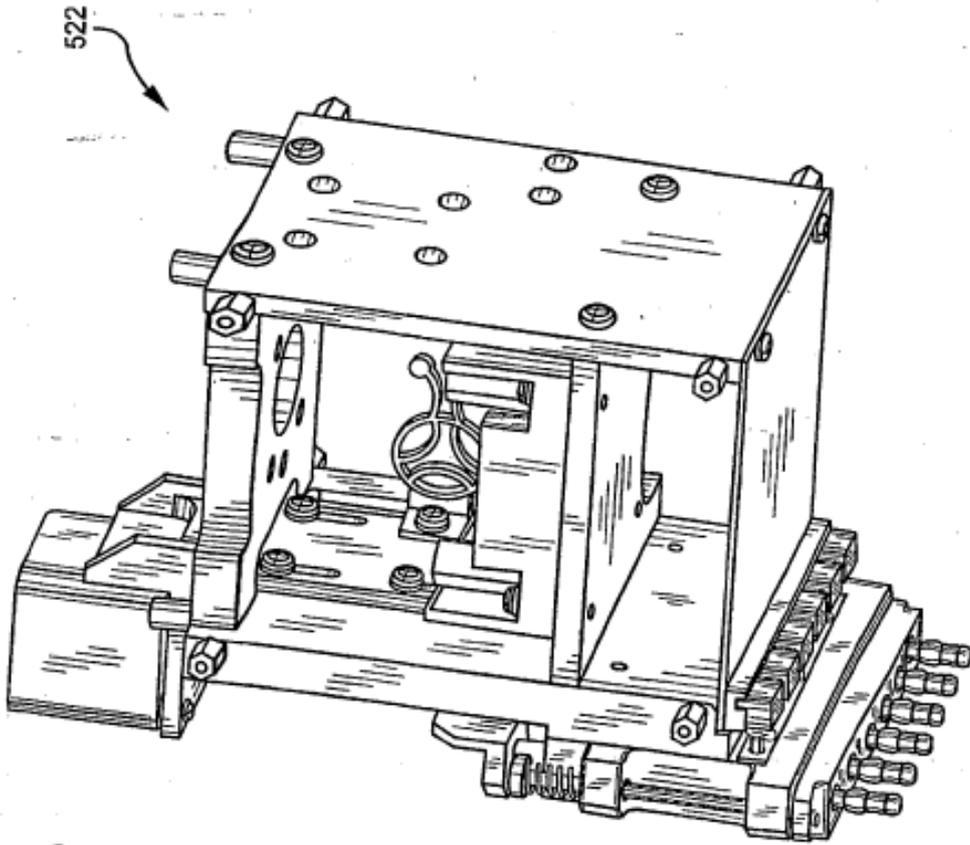


FIG. 6

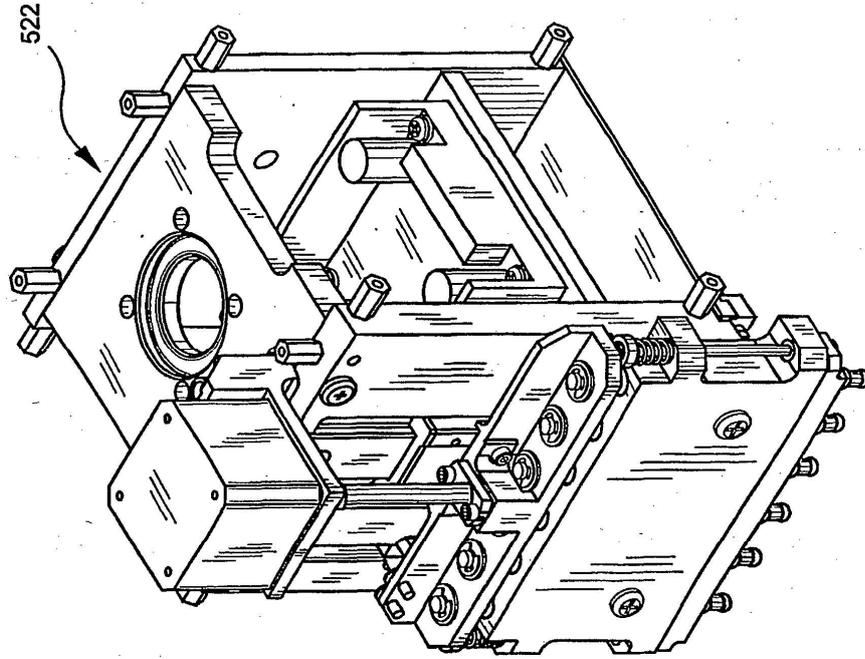


FIG. 7

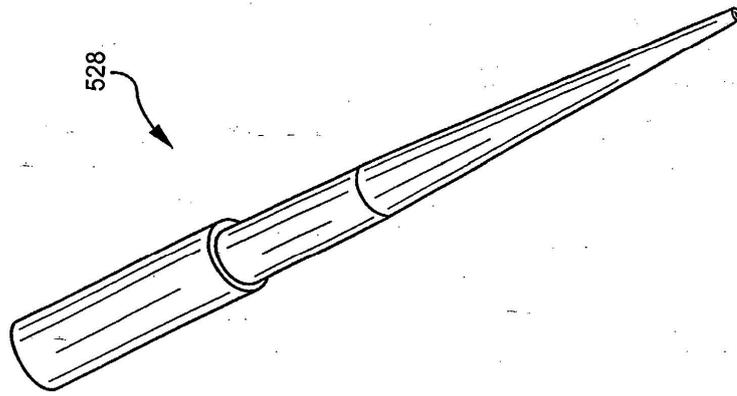


FIG. 8

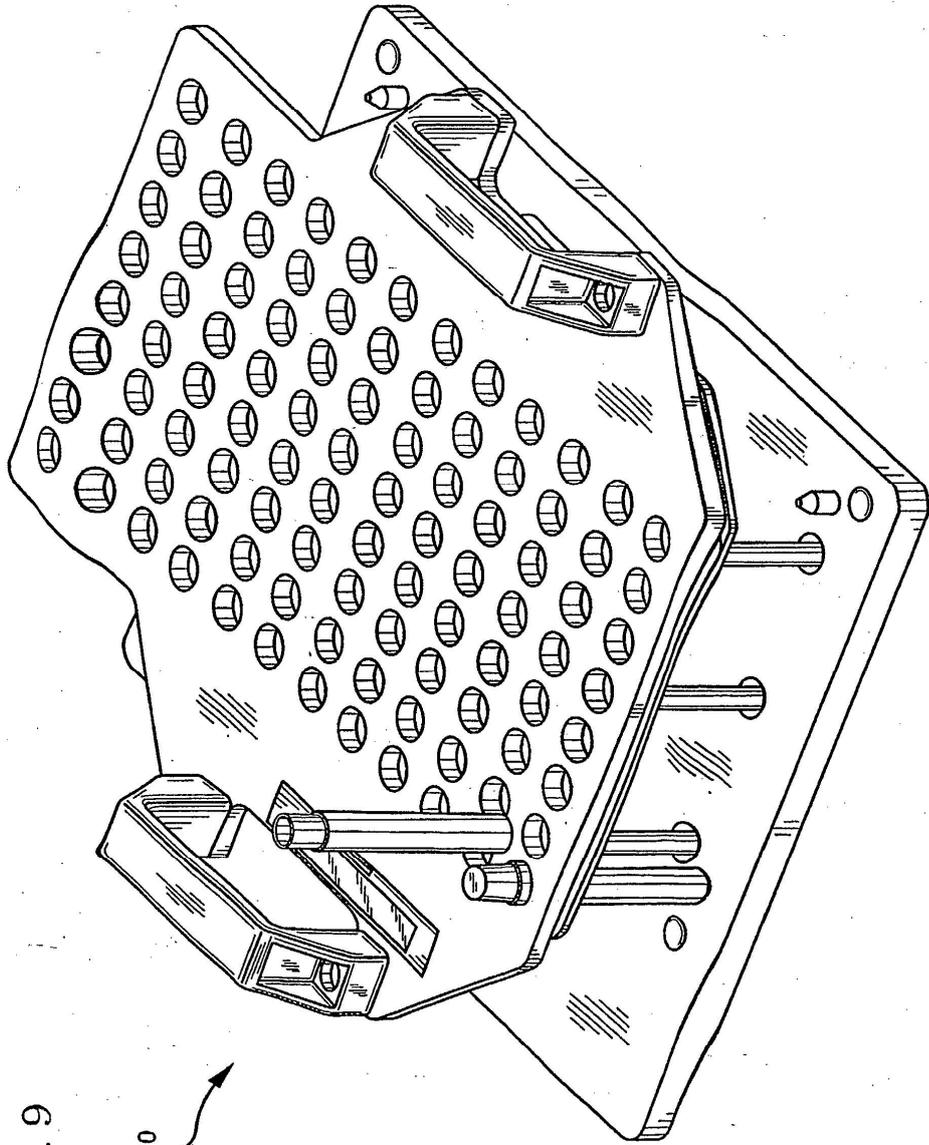
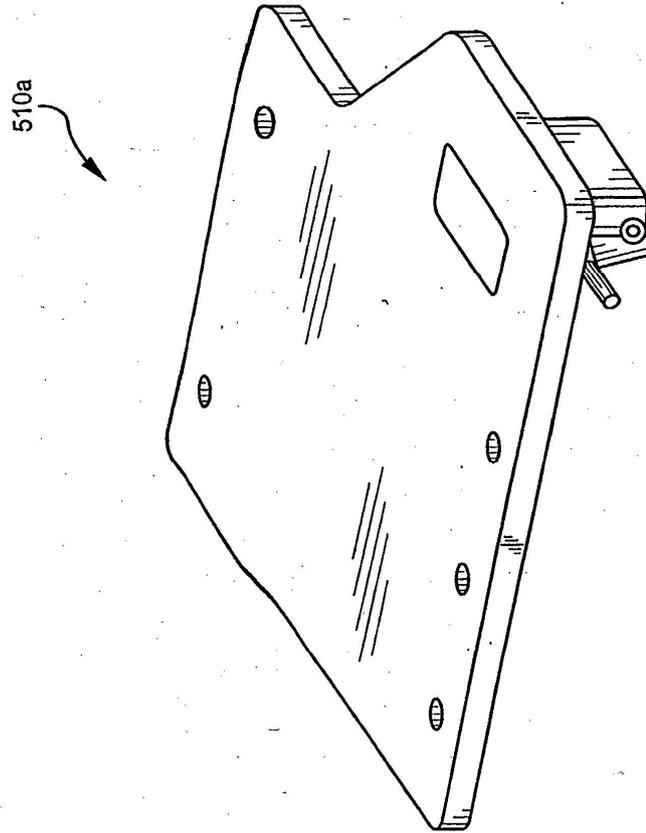


FIG. 9

510

FIG. 10



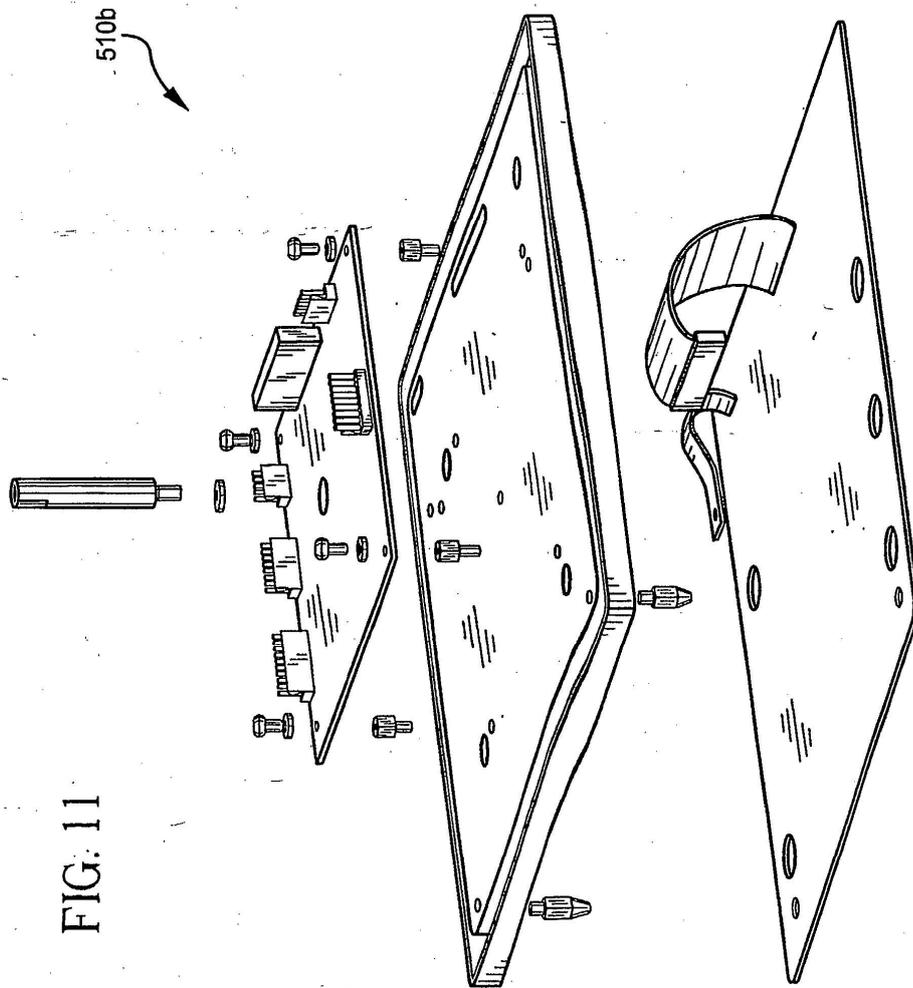


FIG. 11

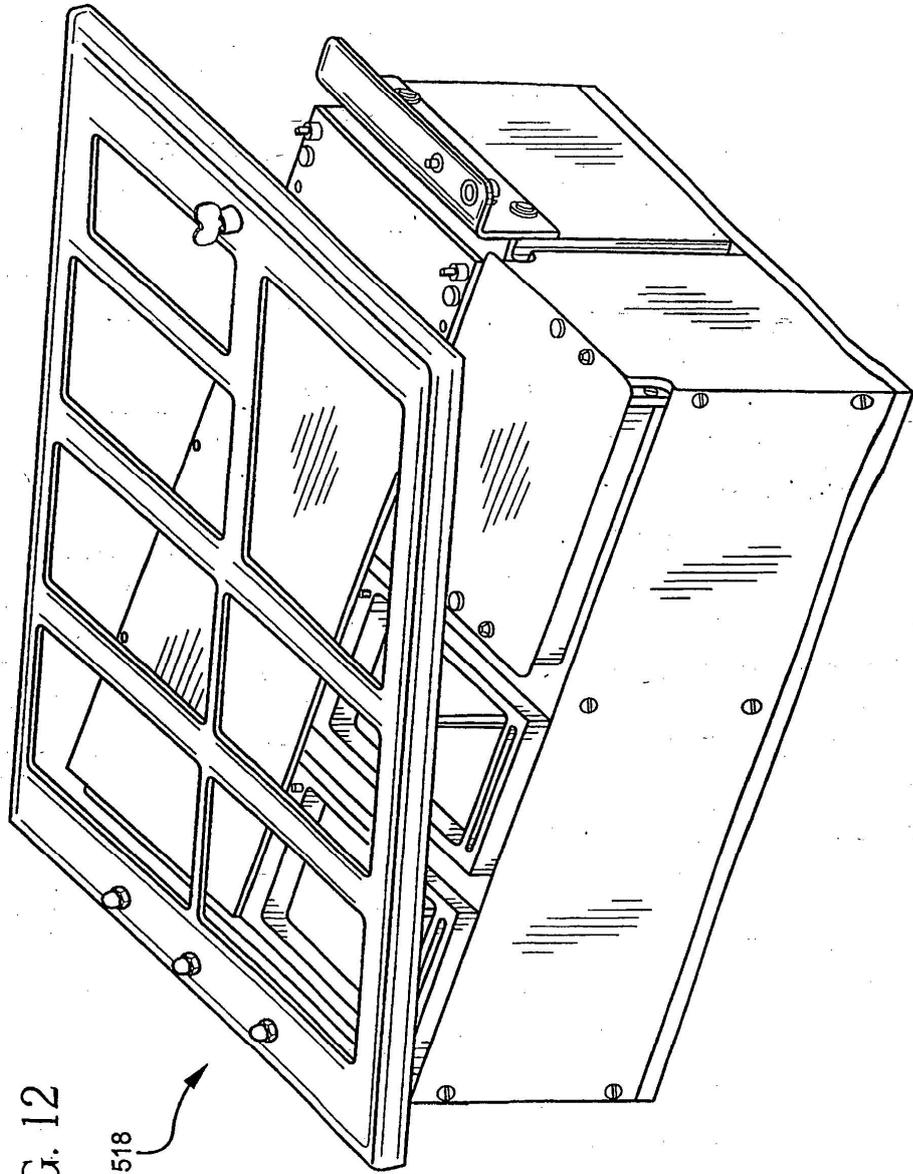


FIG. 12

518

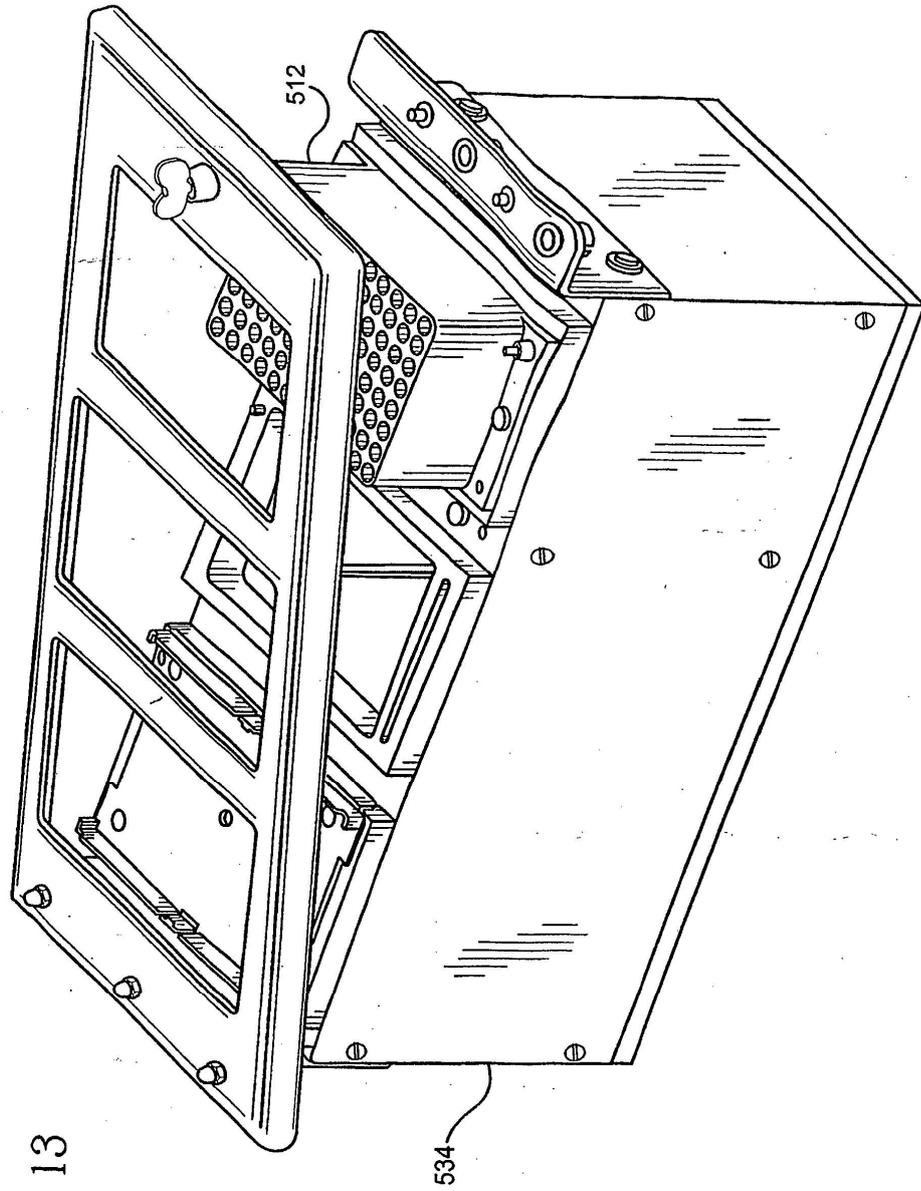


FIG. 13

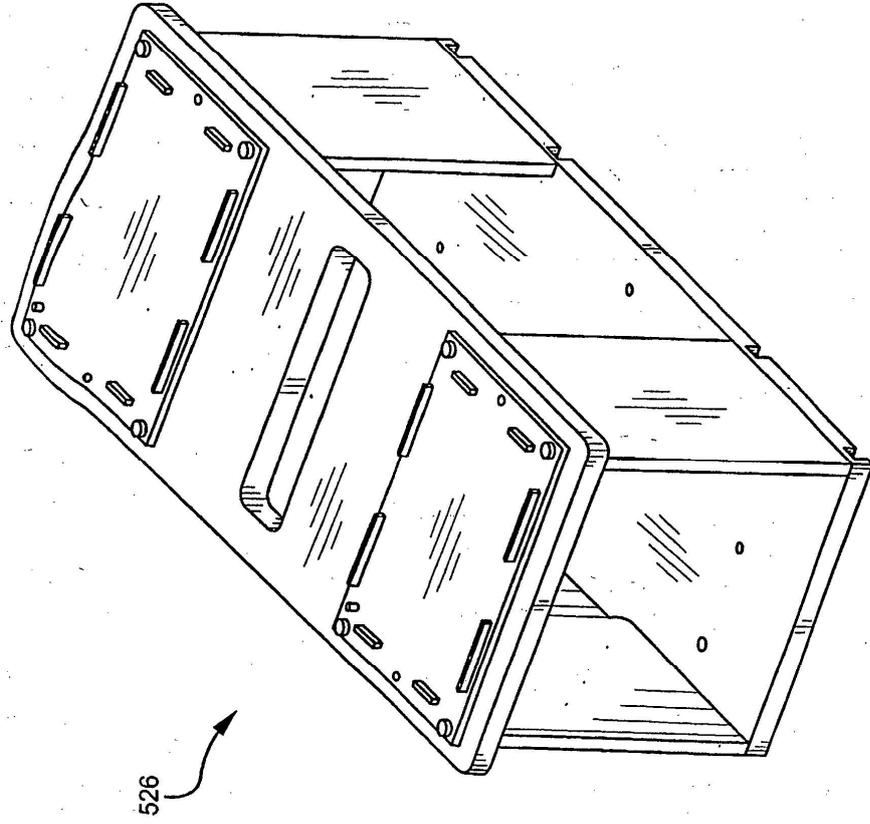
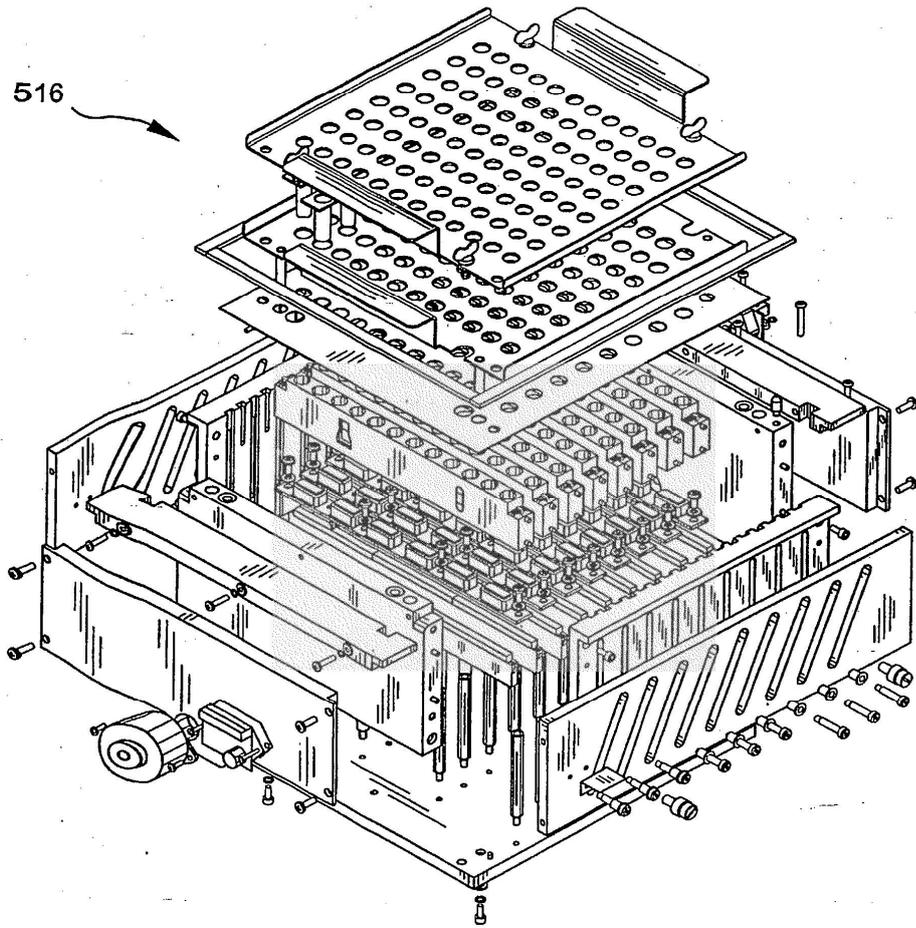
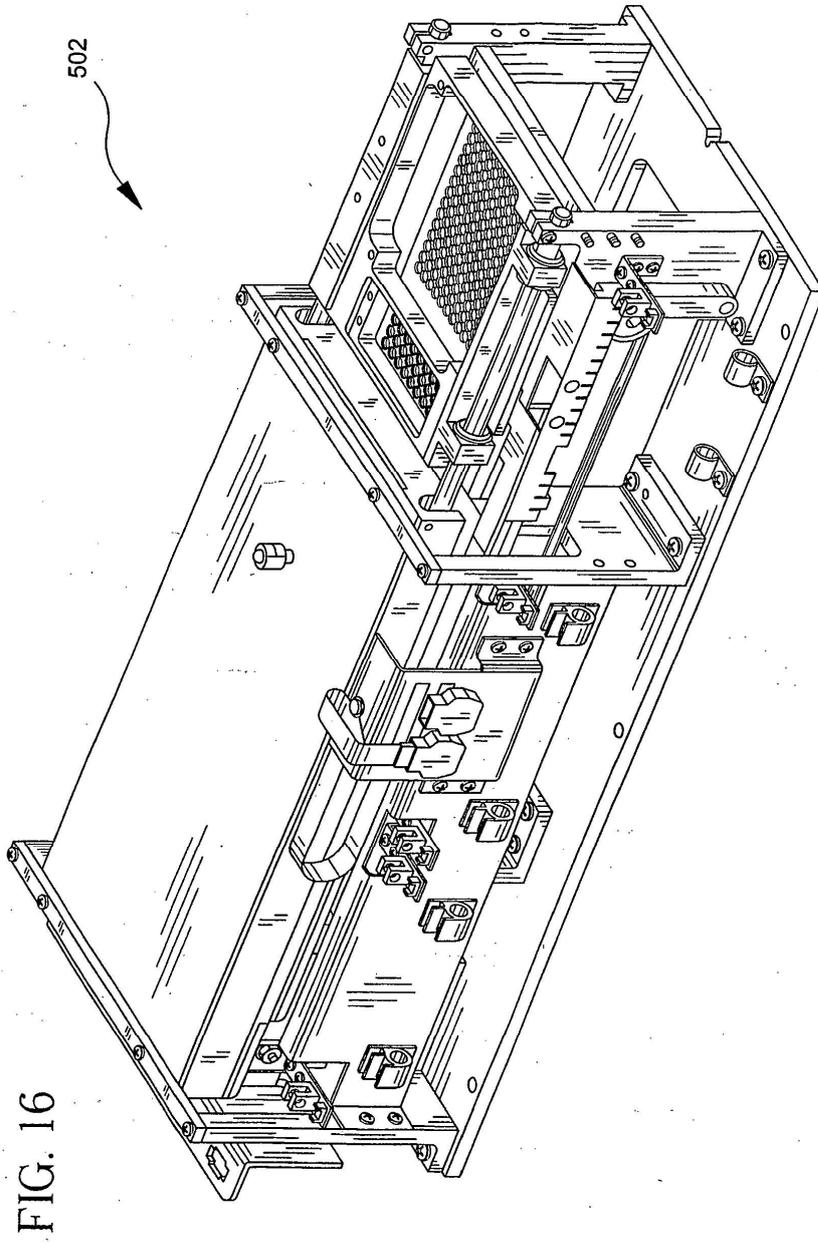


FIG. 14

FIG. 15





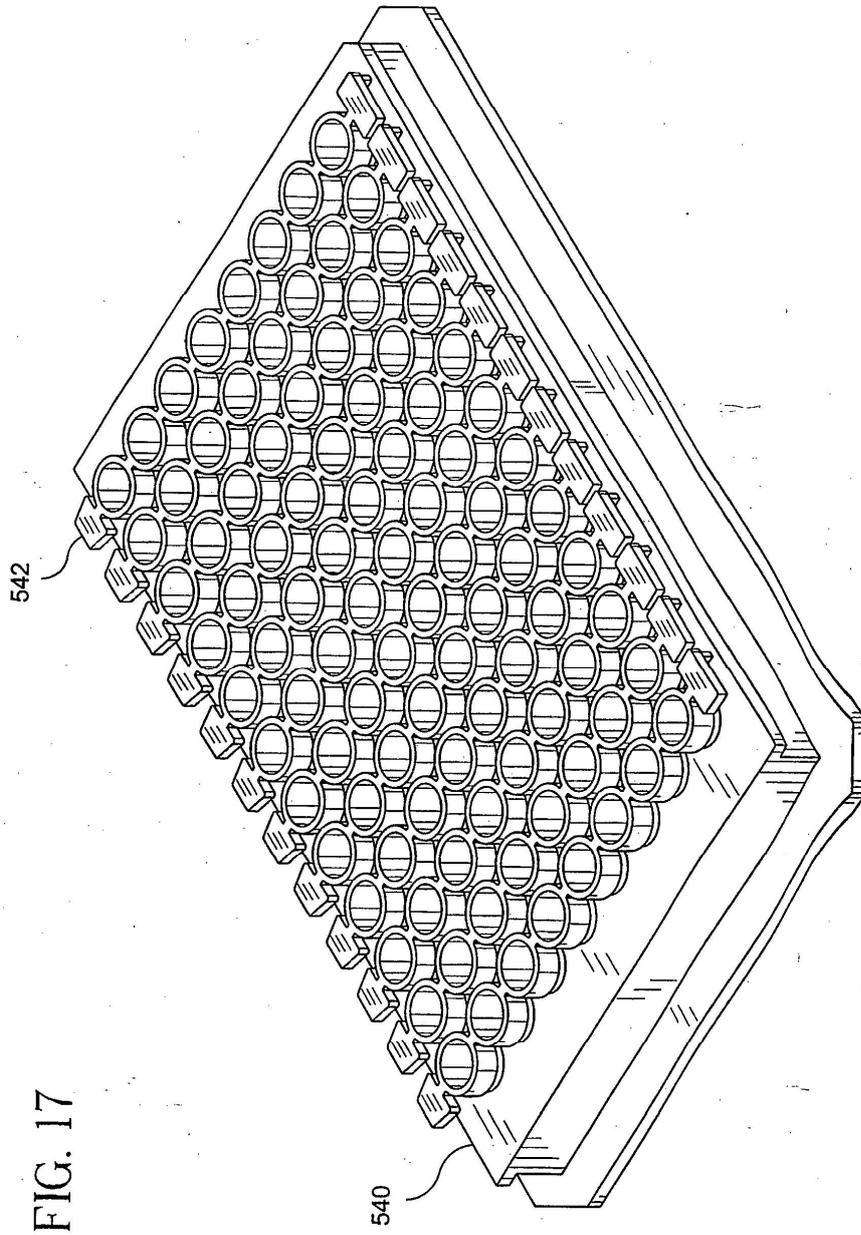


FIG. 17

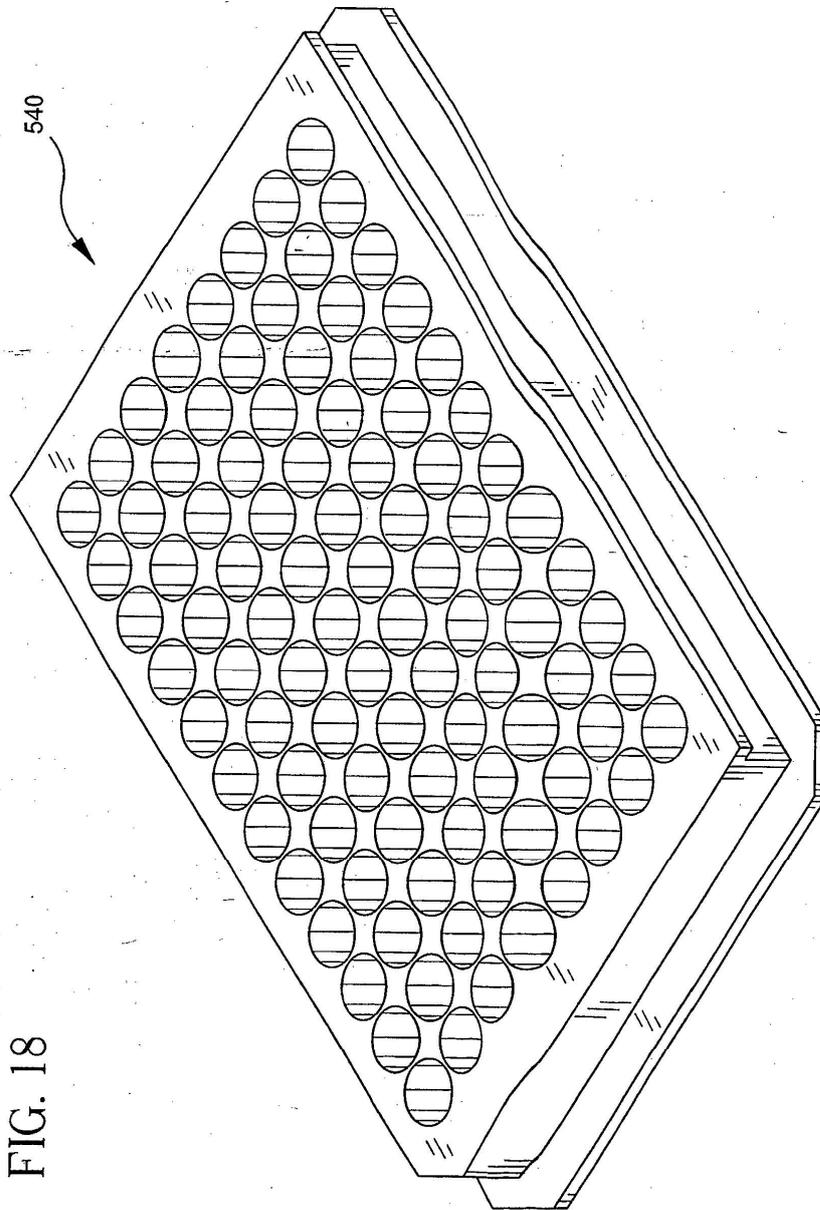


FIG. 18

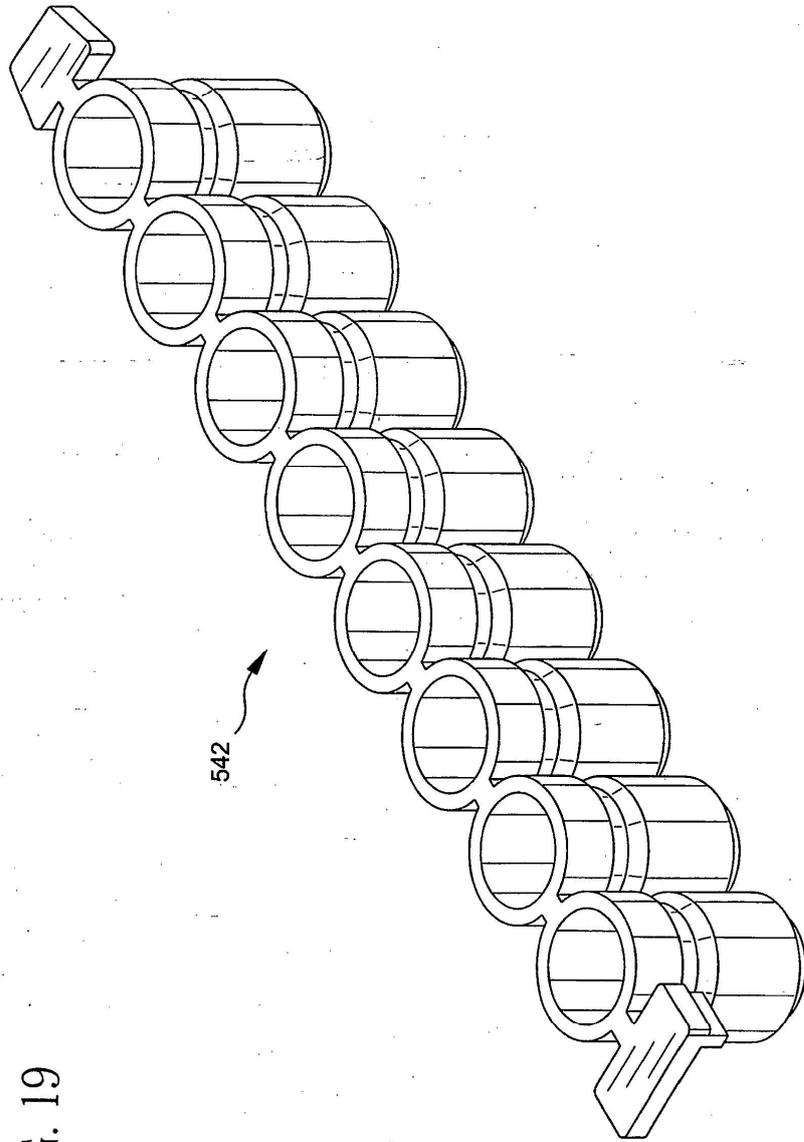


FIG. 19

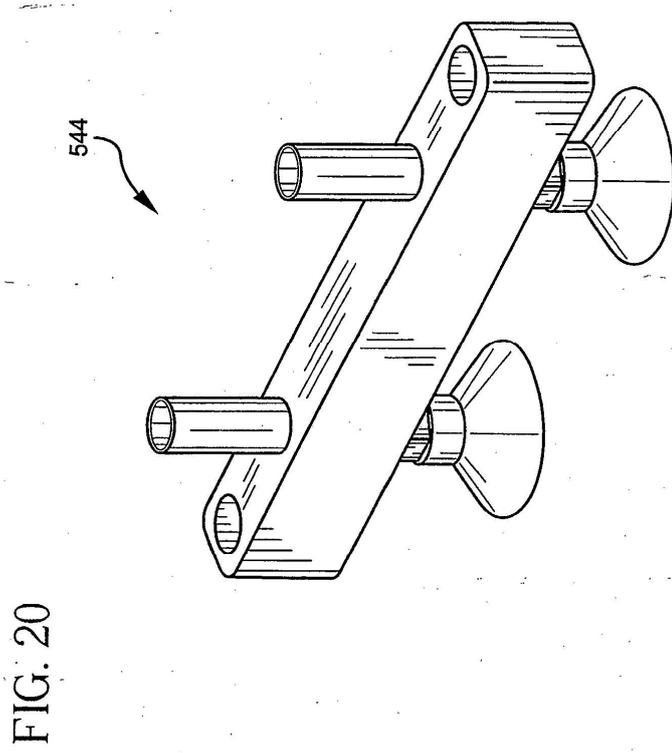


FIG. 21

