

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 625 940**

51 Int. Cl.:

**B01L 3/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.07.2009 PCT/EP2009/005031**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.01.2010 WO10003690**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.07.2009 E 09793891 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.04.2017 EP 2310128**

54 Título: **Dispositivo para analizar una muestra biológica o química**

30 Prioridad:

**10.07.2008 EP 08012523**

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

**21.07.2017**

73 Titular/es:

**CURETIS GMBH (100.0%)  
Max-Eyth-Strasse 42  
71088 Holzgerlingen, DE**

72 Inventor/es:

**KOLTZSCHER, MAX;  
RÖTGER, ANTJE;  
SIEMIENIEWICZ, KRZYSZTOF, WLODZIMIERZ;  
HEITMANN, JENS;  
MAI, CHRISTOFFER;  
SCHOELER, KLAUS-GERD y  
WOLTER, TILMANN**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

**ES 2 625 940 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

Dispositivo para analizar una muestra biológica o química

5 La invención se refiere a un dispositivo y un método para analizar una muestra biológica o química, en particular, una muestra de origen biológico, por ejemplo, una muestra biológica que comprende ácidos nucleicos. Adicionalmente la invención se refiere al campo de la tecnología "Sistema de análisis electrónico miniaturizado" adecuado para aplicaciones "campo" y "punto de cuidado" (POC).

10 Análisis basados en biología molecular, bioquímica, o química altamente sofisticados, tal como pruebas de ácido nucleico, NAT, en particular todas las modificaciones de la reacción de cadena de polimerasa (PCR), que son cada vez más y más atractivas en medicina y cuidado de la salud, así como en casi todos los campos de la industria, que incluyen negocios de agricultura, biotecnología, químicas y medio ambiente. Subsiste una gran demanda de métodos analíticos capaces de satisfacer las crecientes necesidades que se relacionan con, por ejemplo, resultados terapéuticos o planificación y control de costes y procesos de fabricación industrial.

15 La mayor parte de los sistemas analíticos del estado de la técnica son muy complejos, requieren manejo de reactivos inestables, equipos de laboratorio costosos y así como también personal altamente capacitado para realizar e interpretar las pruebas. Por lo tanto, el análisis no es efectivo ni en tiempo ni en costes ya que implica enviar una muestra a un laboratorio especializado con el considerable retardo en la obtención de resultados. Por esta razón, las pruebas en campo y de punto de cuidado (POCT) se han vuelto particularmente deseables ya que acortan significativamente el tiempo de muestreo hasta resultado. En diagnóstico clínico, algunos pacientes asintomáticos suelen ser impacientes con los procesos de pruebas y no asisten a la cita de seguimiento, por lo tanto, se debe ofrecer el tratamiento adecuado o tranquilidad durante una única visita. Adicionalmente, subsiste una necesidad de pruebas rápidas fáciles de realizar para otras aplicaciones en campo, por ejemplo, pruebas forenses ("escena del crimen", "punto de detención"), pruebas alimenticias (detección GMO, fraude alimenticio), defensa (detección de bio amenazas) y muchas más.

20 Hasta ahora, las pruebas de ácido nucleico (NAT) procesadas en laboratorio han tenido en general mucha más sensibilidad que las pruebas POC rápidas, que se utilizan en función de inmunodetección de patógenos. La mayoría de las plataformas basadas en NAT y las tecnologías actuales en desarrollo no proporcionan una solución integrada para preparación simple, evaluación y análisis de datos. Un ejemplo de una plataforma exitosa se conoce del documento WO 2005/106040 A2. Sin embargo, dicho dispositivo, requiere carga manual de reactivos que puede ser inconvenientes para el usuario y ser propenso a errores. También la evaluación de datos requiere la intervención del operador. Por lo tanto, es inapropiado para pruebas en campo. Adicionalmente el diseño complejo de laboratorio en una caja del dispositivo, que consiste de diversas partes grandes moldeadas por inyección y adicionalmente diversas partes de montaje tal como filtros, tornillos y roscas, resulta en altos costes para el dispositivo desechable.

30 Otros ejemplos de dispositivos o equipos para analizar muestras biológicas o pruebas de punto de cuidados de fluidos corporales, incluyen análisis de ácidos nucleicos, que se proporcionan en el documento WO 2005/047855 A2 y US2002/0143272 A1. Se conocen sistemas de análisis miniaturizado por ejemplo del documento US 2005/0161669 A1 o US 5.922.288. En estos documentos se describen dispositivos que comprenden diversas cámaras de sondas o de reacción que se integran en elementos de soporte. Las cámaras se pueden conectar entre sí mediante movimientos relativos de los elementos de soporte. Sin embargo, utilizar estos sistemas presenta un riesgo de contaminación potencial de las sondas provenientes del entorno.

35 De acuerdo con lo anterior, la presente invención se dirige a proporcionar un dispositivo para analizar una muestra química o biológica, que evita por lo menos una de las desventajas de los dispositivos conocidos del estado de la técnica. En particular, el objeto de la presente invención es proporcionar un dispositivo que permite la prueba rápida, es fácil de manejar y es económico de producir.

40 Este objeto se resuelve mediante un dispositivo de acuerdo con la invención. Las realizaciones preferidas de la presente invención se someten a las reivindicaciones dependientes respectivas.

45 De acuerdo con la invención, se proporciona un dispositivo para analizar una muestra, dicho dispositivo comprende por lo menos una cámara de depósito para recibir uno o más reactivos y por lo menos una cámara de proceso, mientras que la cámara de depósito se puede conectar con la cámara de proceso. El dispositivo se caracteriza adicionalmente por que la cámara de proceso está integrada en un primer elemento de soporte y la cámara de depósito se integra en por lo menos un segundo elemento de soporte, mientras que los elementos de soporte se disponen de tal manera que la cámara de proceso se puede conectar con la cámara de depósito mediante un movimiento relativo del primero y segundo elementos de soporte con respecto a otro. De acuerdo con la invención, se proporcionan adicionalmente conductos y elementos de bomba, dicho elemento de bomba (temporalmente) crea suficiente presión para transferir una sustancia que se ubica dentro del dispositivo de una cámara a la otra. El elemento de bomba se integra dentro de uno de los elementos de soporte, es decir, hace parte del dispositivo

propriadamente dichos. También los conductos se integran en los elementos de soporte. Cuando las cámaras se conectan a un bucle de circuito de fluido cerrado se forma con la cámara de proceso y la cámara de depósito.

5 Son posibles una o más cámaras de depósitos y/o cámaras de proceso. Preferiblemente las cámaras se pueden conectar en forma reversible.

10 El dispositivo para analizar una muestra de acuerdo con la invención proporciona un diseño simple y sencillo, y en particular un diseño que se puede producir económicamente. De esta manera, la invención también proporciona un dispositivo que permite en forma adecuada el uso como "desechable", es decir, un sistema de análisis miniaturizado que se desecha después de uso. De acuerdo con lo anterior el dispositivo de la invención es particularmente adecuado para configuraciones en campo y punto de cuidado. Adicionalmente, al integrar el elemento de bomba en el dispositivo propriadamente dicho, todos los elementos que entran en contacto con las sustancias durante análisis se combinan en una unidad, preferiblemente desechable, que permite la creación de un sistema fluido cerrado, que ayuda a evitar cualquier contaminación de las sustancias o el interior del dispositivo propriadamente dicho. Dicha contaminación puede ocurrir cuando el dispositivo se tendría que conectar a una bomba "externa".

15 Ventajosamente, la cámara del dispositivo se puede precargar con reactivos adaptados para realizar un análisis diferente. Con ello el dispositivo se puede utilizar como un formato "listo para uso" de un sistema de análisis miniaturizado.

20 La muestra analizada en el dispositivo de la invención puede tener cualquier origen o naturaleza, por ejemplo, biológico, natural, sintético o semisintético. La invención no se limita de esta manera a ningún origen de muestra específico.

25 Preferiblemente, se puede proporcionar una manguera elástica como parte del elemento de bomba. La manguera elástica se puede conectar a las cámaras mediante conductos respectivos, que se integran en los elementos de soporte. Se puede crear una presión de bombeo dentro de la manguera elástica al deformar localmente y por lo tanto sellando reversiblemente, por ejemplo, por medio de un elemento de rodillo, que se mueve a lo largo de la longitud de la manguera elástica. Esto crea una presión positiva dentro de la manguera elástica sobre el lado del elemento de rodillo que enfrenta la dirección del movimiento. Por consiguiente, se crea una presión negativa en el lado opuesto dentro de la manguera elástica.

30 El término "manguera elástica" de acuerdo con la invención puede cubrir todos los elementos, que definen un espacio interior y tienen una cubierta elástica que circunda dicho espacio interior y adicionalmente por lo menos una entrada y una salida. Una manguera elástica de acuerdo con la invención no necesariamente tiene una forma alargada, similar a tubo, aunque se prefiere.

35 Las cámaras se conectan al elemento de bomba con el fin de crear un circuito de bucle cerrado si los elementos de soporte están en una posición relativa en la que las cámaras se conectan entre sí. El bucle fluido cerrado por un lado evita cualquier contaminación de las sustancias dentro de las cámaras y permite adicionalmente en una forma simple la revisión de la dirección del flujo de dichas sustancias.

40 De acuerdo con la invención, el movimiento relativo de los elementos de soporte que conectan las cámaras entre sí puede tener diferente naturaleza, por ejemplo, las cámaras se pueden interconectar a través movimientos lineales, diagonales, arqueados, circulares o similares de los elementos de soporte, o combinaciones de los mismos. Por lo tanto, las cámaras del dispositivo se pueden ubicar en uno o más niveles o secciones y el dispositivo puede comprender una secuencia de elementos de soporte que incluyen cámaras que se extienden a través de diferentes niveles o diferentes secciones de un nivel.

45 Las cámaras de proceso de depósito de acuerdo con la invención no se limitan en número, tamaño, forma (por ejemplo, cúbica, rómbica, serpenteante, etcétera), material o de cualquier otra propiedad física, como por ejemplo recubrimientos o aislamientos. Sus diseños individuales se adaptan adecuadamente a la naturaleza de la muestra que se va a procesar o la etapa de proceso, para la que se utiliza la cámara. Por ejemplo, en caso de que el dispositivo de la invención, se utiliza para pruebas de ácido nucleico (NAT), la cámara de proceso puede comprender ventajosamente una matriz de unión de ácido nucleico; Adicionalmente por lo menos un reactivo de aislamiento y un reactivo de análisis que se ubican en diferentes cámaras de depósito. Cuando se amplifica los ácidos nucleicos que utilizan reacción de cadena de polimerasa (PCR), una gran relación de superficie/volumen de la cámara de reacción respectiva se prefiere para mejorar la eficiencia del ciclo térmico.

50 De acuerdo con una realización preferida de la presente Invención, el primer elemento de soporte se forma como un elemento circular y el segundo elemento de soporte se forma como un elemento anular, mientras que el elemento circular y el elemento anular se ubican concéntricamente con respecto al otro. Esta realización sobresale por su forma compacta, similar a disco. Adicionalmente, como los primeros y segundos elementos de soporte se pueden girar con respecto al otro, se puede alcanzar un movimiento relativo de los elementos sin ninguna variación para sus dimensiones externas. Esto es una ventaja especial en términos del dispositivo que se va a integrar en un aparato complejo para automatización (por ejemplo, una estación base).

5 En una realización preferida adicional de esta invención, se proporciona un tercer elemento de soporte que se puede mover con respecto al segundo elemento de soporte. Preferiblemente, el tercer elemento de soporte se forma como un disco anular, que se dispone concéntricamente y puede girar con respecto al primero y/o segundo elementos de soporte.

10 En una realización de la invención, los elementos de soporte forman un sello sobre el ensamble, proporcionando así un sistema fluido sustancialmente cerrado dentro del dispositivo. Simultáneamente, con el fin de permitir que se lleven a cabo etapas sucesivas del proceso, los elementos de soporte dentro de dicho dispositivo ensamblado pueden girar (o moverse) con respecto al otro. Adicionalmente, es ventajoso que el sellado se alcanza al proporcionar un contacto directo óptimo entre los miembros de soporte dentro del dispositivo ensamblado, sin necesidad de material de empaque adicional. De esta manera los elementos de soporte se hacen preferiblemente de materiales de polímero adecuados, tal como polioximetileno (POM), polietileno (PE), policarbonato (PC), politetrafluoroetileno (PTFE) o copolímero de olefina cíclico (COC).

15 Con el fin de permitir una forma visual, óptica o cualquier otra forma de una evaluación relacionada con la imagen de la prueba o resultados de análisis, el dispositivo de la invención se puede constituir por lo menos parcialmente de un material transparente, por ejemplo, un polímero transparente, junto con este permitiendo la observación de la cámara de reacción u otras partes del dispositivo (incluyendo conductos).

20 El dispositivo de acuerdo con la invención se puede utilizar ventajosamente con una estación base, mientras que la estación base puede comprender por lo menos una unidad para mover a los elementos de soporte con respecto al otro. La estación base puede adicionalmente comprender una unidad de bomba. Dicho sistema comprende por lo menos una estación base y un dispositivo de análisis separado proporciona la ventaja de que los dispositivos técnicos complejos y de esta forma costosos se pueden incorporar en una estación base, mientras que el dispositivo de análisis se puede diseñar como un dispositivo desechable económico. Esto reduce los costos implicados con el uso del dispositivo de análisis o, respectivamente, el sistema de acuerdo con la invención.

30 En una realización preferida de la invención, el elemento de bomba del dispositivo comprende una manguera elástica y la unidad de bomba de la estación base comprende un elemento de deformación, preferiblemente un elemento de rodillo, que se mueve a lo largo de la longitud de la manguera elástica, deformando localmente por lo tanto la manguera elástica. Esta realización es ventajosa porque partes complejas y costosas de la bomba (que comprenden el elemento de bomba del dispositivo y la unidad de bomba de la estación base) se ubican en la estación base y solo la manguera elástica hace parte del dispositivo desechable (preferiblemente). Por lo tanto, se puede mantener bajo el coste de producción del dispositivo.

35 En el caso de que la estación base comprenda una unidad de evaluación y control, el control de las unidades de la estación base se puede automatizar. Esto permite una automatización completa del proceso de análisis ejecutado dentro del dispositivo.

40 El sistema de acuerdo con la invención puede comprender adicionalmente por lo menos unos medios de calefacción. Dichos medios de calefacción pueden generar diferentes zonas de temperatura en la estación base. Adicionalmente la estación base puede comprender una unidad mediante la cual dichas zonas de temperatura se pueden mover con respecto al dispositivo. Por lo tanto, las temperaturas dentro de las diferentes cámaras del dispositivo se pueden ajustar a valores que se adecuan más para las etapas de proceso respectivas llevadas a cabo dentro de dichas cámaras. Esto permite la generación de un perfil de temperatura que se adapta a las etapas de procesos sucesivas que se realizan dentro del dispositivo de análisis.

45 Un método para analizar una muestra que utiliza el dispositivo de acuerdo con la invención comprende la etapa de insertar la muestra en el dispositivo y una secuencia de procesos (analizar la muestra dentro del dispositivo, adquisición de datos, procesamiento de datos y finalmente informar resultados) que se realiza con la ayuda de una estación base de acuerdo con la invención. En una realización, la primera etapa puede ser una etapa manual, mientras que las otras etapas pueden ser completamente o parcialmente automatizados.

50 La invención presenta preferiblemente diversas ventajas en comparación con los dispositivos conocidos de la técnica anterior. El dispositivo (sistema respectivamente) de acuerdo con la invención permite un uso fácil y seguro incluso por personal no capacitado. Por ejemplo, todas las etapas de proceso, que incluyen la preparación de muestra y análisis, así como evaluación de los datos y resultados de llamada, se pueden integrar y se pueden ejecutar automáticamente. El uso de un dispositivo desechable, que esta precargado con todos los reactivos requeridos para el proceso completo, elimina el riesgo de error humano o contaminación cruzada, mientras que el diseño compacto del dispositivo reduce la cantidad de material de desperdicio. En particular, si el dispositivo se construye como un sistema sustancialmente cerrado, el riesgo de contaminación de reactivos, así como el riesgo de contaminación por amplicones del ambiente se reduce sustancialmente.

65 La invención se explicará en más detalle con referencia a realizaciones específicas como se muestra en los dibujos, en los que

La figura 1: muestra una vista isométrica de un dispositivo de acuerdo con la invención en una primera realización;

Figura 2 a figura 14: Muestran diferentes etapas de proceso mientras utilizan el dispositivo de acuerdo con la figura 1;

Figura 15A: Muestra una estación base para uso con el dispositivo de acuerdo con la figura 1 a 14 en una vista lateral;

Figura 15B: Muestra la estación base de acuerdo con la figura 15A en una vista superior;

Figura 16: Muestra el dispositivo de mezcla de la estación base de la figura 15;

La figura 17: Muestra una vista isométrica del lado delantero de un dispositivo de acuerdo con la invención en una segunda realización;

Figura 18: Muestra una vista isométrica de un dispositivo de acuerdo con la invención en una tercera realización; y

Figura 19: Muestra un elemento aislado del dispositivo de acuerdo con la figura 18.

La figura 1 muestra una primera realización de un dispositivo para analizar una muestra de acuerdo con la invención. El dispositivo incluye un sistema líquido para el aislamiento y análisis de ácidos nucleicos de una muestra química o biológica. El dispositivo comprende adicionalmente tres elementos de soporte; el primer elemento 17 de soporte tiene forma de disco circular delgado, es decir, el diámetro del disco circular supera o excede de lejos su espesor. El segundo elemento 18 de soporte tiene forma de disco anular que es concéntrico con respecto al primer elemento de soporte. El primer y segundo elemento 17, 18 de soporte pueden girar con respecto al otro alrededor de su eje central común. El tercer elemento 19 de soporte también tiene forma de disco anular; encierra el segundo elemento 18 de soporte y es concéntrico con respecto al primer y segundo elemento 17, 18 de soporte. El diámetro externo del tercer elemento 19 de soporte tiene aproximadamente 10 cm.

Posibles materiales para los elementos de soporte son los polímeros, tal como polioximetileno (POM), polietileno (PE), policarbonato (PC), politetrafluoroetileno (PTFE) o copolímeros de olefina cíclica (COC). Para sellar las conexiones fluidas entre partes individuales del dispositivo, se proporciona una capa delgada de polímero elástico sobre ambas interfaces del segundo elemento 18 de soporte. Con el fin de crear la capa delgada, preferiblemente el segundo elemento 18 de soporte se produce mediante moldeo de inyección de dos componentes, mientras que los otros elementos de soporte se fabrican mediante cualquier método conocido en la técnica, tal como moldeo por inyección, microfabricación de repujado en caliente. Las partes se producen con un sobretamaño de diámetro. Para crear una conexión de ajustes de todas las tres partes, el ensamble se puede hacer con la ayuda de contracción y expansión térmicas. La parte interna se enfría para reducir el diámetro mientras que la parte exterior se calienta para aumentar el diámetro. Después del ensamble y equilibrio de temperatura, ambas partes se ajustan en forma precisa y se comprime el sello para asegurar hermeticidad a fugas.

Incorporado en los tres elementos 17, 18, 19 de soporte se encuentra una serie de cámaras que tienen tamaño y forma diferente, y componentes funcionales adicionales. Los tres elementos de soporte comprenden,

- una primera cámara 1 de depósito, que aloja un regulador de lisis que contiene dodecil sulfato de sodio (SDS) y proteinasa K en una cantidad total de aproximadamente 100 µl;

- una segunda cámara 2 de depósito, que aloja un regulador de unión comprende por lo menos NaCl 3M y por lo menos Tween 20 al 1% en una cantidad total de aproximadamente 300 µl;

- una tercera cámara 3 de depósito, que aloja un primer agente de purificación que comprende por lo menos NaCl 3M en una cantidad total de aproximadamente 200 µl;

- una cuarta cámara 4A de depósito, que aloja una primera cantidad de un segundo agente de purificación que comprende por lo menos 50% de etanol en una cantidad total de aproximadamente 200 µl;

- una quinta cámara 4B de depósito, que aloja una segunda cantidad de un segundo agente de purificación que comprende por lo menos 50% de etanol en una cantidad total de aproximadamente 200 µl;

- una sexta cámara 5 de depósito, que aloja un regulador de elución que comprende un regulador TE o agua destilada en una cantidad total de aproximadamente 200 µl;

- una cámara 6 de muestra, que tiene una capacidad de aproximadamente 100 µl;

## ES 2 625 940 T3

- una cámara 7 de proceso, que aloja la matriz de unión de ADN de partículas de sílice magnéticas y que tienen capacidad de aproximadamente 400 µl;

- una cámara 8 de desperdicios, que tiene una capacidad de aproximadamente 400 µl;

diez cámaras 9 de depósito de mezcla maestra (sólo se muestra una en la figura 1 a figura 14), que aloja sustancias para la amplificación y detección de ácidos nucleicos en una cantidad total de 16 a 18 µl (en la realización presentada, se utilizan reactivos líquidos para el PCR aunque otras formulaciones (encapsuladas, secadas por congelamiento, secadas al aire, etcétera) son igualmente adecuadas y se pueden preferir debido a su estabilidad prolongada, incluso a temperaturas elevadas (por ejemplo, durante almacenamiento o transporte del dispositivo de punto de cuidado) en el caso de las capacidades de la sexta cámara 5 de depósito y los bucles 14 de medición puede ser necesario ajustar con el fin de asegurar una rehidratación adecuada de los reactivos);

- diez cámaras 10 de reacción PCR (solo se muestran dos en la figura 1 a figura 14) que se utilizan para la amplificación y detección de ácidos nucleicos, cada una tiene una capacidad de 20 µl;

- una cámara 11 de elución, que no se precarga y tiene una capacidad de aproximadamente 100 µl;

- dos puertos 12 para una manguera elástica (no mostrada) que actúa como un elemento de bomba;

- diez bucles 14 de medición de conductos (solo se muestran dos en la figura 1 a figura 14), cada uno tiene una capacidad de aproximadamente 4 µl;

- conductos 15 de carga (sólo se muestran tres pares en la figura 1 a figura 14);

- un canal 16 de ventilación.

En una realización alterna las cámaras de depósito 1 a 3 se pueden cargar con las siguientes sustancias:

- primera cámara 1 de depósito: un regulador de lisis con > 1 M GuHCl (o GuSCN), > 1% Tween 20 (o Triton X-100), SDS, proteinasa K, en una cantidad total de 100 µl

- segunda cámara 2 de depósito: un regulador de unión con > 3 M GuHCl (o GuSCN), en una cantidad total de 50 µl;

- tercera cámara 3 de depósito: un primer agente de purificación con > 3 M GuHCl (o GuSCN) y > 30% etanol, en una cantidad total de 200 µl.

El tercer elemento 19 de soporte comprende adicionalmente una abertura 13 curva para recibir una manguera elástica (no mostrada) como parte del elemento de bomba. La manguera elástica se hace de silicona y se conecta a los dos puertos 12, que se conectan a una red de conductos, dichos conductos se incorporan en los tres elementos de soporte. Los conductos conectan las diferentes cámaras de los elementos de soporte de una forma que será evidente mediante la siguiente descripción más detallada del uso del dispositivo. El elemento de bomba opera como una bomba de rodillo; la manguera elástica se comprime por medio de un elemento 23 de rodillo, que hace parte de una estación base (véase Figura 15A y Figura 15B), en la que el dispositivo se coloca para procesamiento, dicho elemento de rodillo se mueve por medio de una unidad de bomba de la estación base a lo largo de la longitud de la manguera elástica. Debido al movimiento del elemento de rodillo se genera una presión positiva dentro de la manguera elástica sobre un lado del elemento de rodillo y por consiguiente se genera una presión negativa dentro de la manguera elástica en el lado opuesto del elemento rodillo. La manguera elástica del elemento de bomba crea un bucle cerrado con los conductos y las diferentes cámaras, que se conectan a la manguera elástica en la posición respectiva del primer y segundo elementos 17, 18 de soporte. El bucle cerrado reduce el riesgo de contaminación.

El dispositivo como se muestra en la figura 1 es un dispositivo desechable económico, que se precarga con todas las sustancias para la preparación de muestra, así como con todas las sustancias necesarias para un análisis PCR cuantitativo en tiempo real. Las sustancias líquidas se pueden cargar en el dispositivo a través de conductos 15 de carga incorporados en los elementos de soporte. La Figura 2 muestra tres elementos de soporte del dispositivo en una posición de carga de reactivo respectiva (para una mejor vista, sólo se muestran tres pares de conducto de carga). En una realización alterna los elementos de soporte se pueden diseñar con cámaras que se abren de un lado. Las cámaras abiertas se pueden cargar luego fácilmente con reactivos secos (por ejemplo, encapsulados, secados por congelamiento, secados al aire, etcétera) y después de eso sellados mediante una lámina adhesiva, que se une al lado abierto de los elementos de soporte para formar cámaras cerradas.

Para el transporte y manejo del dispositivo, se pueden girar tres elementos de soporte de tal manera que los conductos que conducen hacia y desde diferentes cámaras precargadas se separan de cualquier conducto de conexión en el elemento de soporte adyacente, sellado de esta manera.

El método aplicado para el aislamiento de ADN se basa en el principio de unión de ácidos nucleicos a la superficie de sílice en la presencia de soluciones salinas altamente concentradas. Las partículas de sílice magnéticas, que se alojan dentro de la cámara 7 de proceso, actúan como una matriz para unir el ADN.

5 La figura 2 a 14 muestran diferentes etapas durante el uso del dispositivo de la figura 1.

Primero se recolecta una muestra que contienen las bacterias, por ejemplo, de la cavidad oral de un paciente y se colocan dentro de la cámara 6 de conservación de muestra. Después de eso la cámara 6 de conservación de muestra se sella por medio de una película adhesiva. Luego se coloca el dispositivo completo dentro de la estación base (Figura 15A y 15B) y se inicia el proceso de análisis automático. La figura 3 muestra tres elementos de soporte del dispositivo en una posición de inicio.

Por medio de la unidad de la estación base, se gira el segundo elemento 18 de soporte con respecto al primer y tercer elemento 17, 19 de soporte en una dirección en sentido horario, como se muestra en la figura 3. Debido al movimiento del segundo elemento 18 de soporte, se crea un primer bucle, que conecta la manguera elástica del elemento de bomba con la primera cámara 1 de depósito y la cámara 6 de muestra. De acuerdo con lo anterior, el regulador de lisis, que está contenido en la primera cámara 1 de depósito, se mueve repetidamente desde la primera cámara 1 de depósito dentro de la cámara 6 de muestra, y viceversa, cuando el elemento de rodillo del elemento de bomba se mueve repetidamente a lo largo de la longitud de la manguera elástica. El movimiento hacia atrás y hacia adelante del regulador de lisis ayuda a mezclarlo con la muestra. Mientras tanto, la mezcla se calienta en la cámara 6 de muestra a una temperatura de 55° C a 95° C durante un período de aproximadamente 5 a 15 minutos. Luego la mezcla se mueve hacia atrás hacia la primera cámara 1 de depósito.

La figura 4 muestra el dispositivo después de rotación en sentido contra horario del primer elemento 17 de soporte que resulta en una conexión de la primera cámara 1 de depósito con la cámara 7 de proceso. La cámara 7 de proceso contiene las partículas de sílice magnéticas que unen ADN (no mostradas). Realizaciones adicionales pueden proporcionar una membrana o filtro de lana como matriz de unión ADN. El lisado se bombea desde la primera cámara 1 de depósito dentro de la cámara 7 de proceso.

Dentro de la cámara 7 de proceso, se ubica un agitador 33 magnético (véase Figura 16), que soporta la mezcla de las sustancias dentro de la cámara 7 de proceso. El agitador 33 magnético se hace girar a una alta velocidad de rotación por medio de un imán 20 permanente externo giratorio, que hace parte de la estación base (véase Figura 15A) e impulsado rotacionalmente por un motor 21 eléctrico.

La figura 5 muestra el dispositivo después de rotación seccional adicional del segundo elemento 18 de soporte en una dirección contra horaria. En esta posición la cámara 7 de proceso se conectada a la segunda cámara 2 de depósito que contiene el regulador de unión. El regulador de unión se bombea desde segunda cámara 2 de depósito dentro de la cámara 7 de proceso. Durante un período de hasta 5 minutos el regulador de unión y el lisado se agitan en la cámara 7 de proceso por medio del agitador 33 magnético y el imán 20 permanente externo giratorio para alcanzar una buena mezcla de los componentes y una buena unión del ADN a las partículas de sílice magnéticas. Esta etapa de proceso se lleva a cabo a temperatura ambiente.

La siguiente posición como se muestra en la figura 6 se alcanzada mediante un movimiento giratorio adicional del primer elemento 17 de soporte en una dirección horaria, mediante la cual la cámara 7 de proceso se conectada a la cámara 8 de desperdicio. El regulador de unión y el lisado (que no contienen más ADN) se mueven a la cámara 8 de desperdicio, mientras que las partículas de sílice magnéticas y el ADN se retienen en la cámara 7 de proceso mediante el imán 20 externo no giratorio.

Después de un movimiento giratorio adicional del primer y la segundo elementos 17, 18 de soporte en una dirección contra horaria, la cámara 7 de proceso se conecta a la tercera cámara 3 de depósito que contiene el primer agente de purificación que comprende NaCl (véase Figura 7). El primer agente de purificación se bombea desde la tercera cámara 3 de depósito dentro de la cámara 7 de proceso, que comprende ADN unido a las partículas de sílice magnéticas. Luego las partículas se resuspenden en el agente de purificación mediante el agitador 33 magnético y el imán 20 permanente externo giratorio. Al hacerlo, las sobras de los reguladores de la preparación de muestra, y los residuos de células adicionales, proteínas, etcétera se eliminan del ADN unido a las partículas de sílice magnéticas. El agente de purificación junto con las impurezas se mueve luego de nuevo dentro de la tercera cámara 3 de depósito, mientras que el ADN unido a las partículas de sílice magnéticas se retiene en la cámara 7 de proceso mediante el imán 20 externo no giratorio.

Después de un movimiento giratorio adicional del segundo elemento 18 de soporte (véase Figura 8), la cámara 7 de proceso se conecta a la cuarta cámara 4A de depósito que contiene una primer cantidad del segundo agente de purificación, que comprende por lo menos 50% etanol. Para purificación adicional del ADN unido a las partículas de sílice magnéticas, el segundo agente de purificación se mueve desde la cuarta cámara 4A de depósito hasta la cámara 7 de proceso. Las partículas luego se resuspenden en el agente de purificación por medio de un agitador 33 magnético y el imán 20 permanente externo giratorio. Residuos indeseados de la preparación de muestra y la primera etapa de purificación se eliminan de este modo. Después una purificación suficiente de ADN unido a las

partículas de sílice magnéticas, el agente de purificación junto con las impurezas se mueve de nuevo a la cuarta cámara 4A de depósito, mientras que las partículas de sílice magnéticas con ADN unido se retienen en la cámara 7 de proceso por medio del imán 20 externo no giratorio.

5 Después de un movimiento giratorio adicional del segundo elemento 18 de soporte en una dirección contra horaria (véase figura 9), la cámara 7 de proceso se conecta a la quinta cámara 4B de depósito, que contiene una segunda cantidad del agente de purificación (que comprende por lo menos 50% de etanol). Para una purificación adicional de las partículas de sílice se mueve el segundo agente de purificación desde la cámara 4B de depósito hasta la cámara 10 7 de proceso. Luego las partículas se resuspenden de nuevo en el agente de purificación por medio del agitador 33 magnético y el imán 20 permanente externo giratorio. Después de purificación suficiente del ADN unido a las partículas de sílice magnéticas, el agente de purificación junto con las impurezas se mueve de nuevo a la quinta cámara 4B de depósito, mientras que las partículas de sílice y el ADN permanecen en la cámara 7 de proceso, que se retienen por medio del imán 20 externo no giratorio.

15 Luego el primer y segundo elemento 17, 18 de soporte, se mueven giratoriamente en una dirección horaria para conectar la cámara 7 de proceso a través del canal 16 de ventilación con la atmósfera (véase figura 10). Incorporado en el canal de ventilación se encuentra un filtro (no mostrado) que evita cualquier escape de aerosoles. La cámara 7 de proceso se calienta a una temperatura de aproximadamente 55 °C y se ventila durante un período de aproximadamente 5 minutos con aire. Por lo tanto, se eliminan residuos de alcohol del segundo agente purificador.

20 A través de un movimiento giratorio adicional del primero y segundo elemento 17, 18 de soporte en una dirección contra horaria, la sexta cámara 5 de depósito y la cámara 11 de soporte se conectan a la cámara 7 de proceso (véase figura 11). El regulador de elución de la sexta cámara 5 de depósito se bombea dentro de la cámara 11 de elución a través de la cámara 7 de proceso, liberando por lo tanto el ADN de las partículas de sílice magnéticas. Este proceso tiene lugar a una temperatura de aproximadamente 55 °C y durante un período de aproximadamente 5 minutos. Después de eso el regulador de elución y el ADN se mueven de nuevo desde la cámara 11 de elución hasta la sexta cámara 5 de depósito y las partículas magnéticas se retienen en la cámara 7 de proceso mediante el imán 20 externo no giratorio.

30 El primer y segundo elementos 17,18 de soporte se giran luego en dirección horaria para conectar la sexta cámara 5 de depósito con uno de los bucles 14 de medición (véase figura 12). El regulador de elución que contiene el ADN se bombea luego dentro de dicho bucle 14 de medición hasta que se carga completamente.

35 Un movimiento giratorio adicional del segundo elemento 18 de soporte en una dirección horaria conecta una de las cámaras 9 de depósito de mezcla maestra con el bucle 14 de medición ahora cargado (véase figura 13). La cámara 9 de depósito de mezcla maestra contiene un de mezcla maestra de sustancias para la amplificación y detección de ácidos nucleicos. Cada cámara 9 contiene una mezcla maestra para una amplificación específica y detección de ácidos nucleicos de interés, por ejemplo, de una o más especies bacterianas. De esta manera se pueden ejecutar simultáneamente diez reacciones independientes (incluyendo control interno) utilizando un cartucho. La mezcla maestra de la cámara 9 de depósito de mezcla maestra junto con el regulador de elución que contiene ADN se bombea a través del bucle 14 de medición dentro de una de las cámaras 10 de reacción de PCR. En la realización presentada, se utilizan reactivos líquidos para el PCR, aunque otras formulaciones (encapsuladas, secadas por congelamiento, secadas al aire, etcétera) son igualmente adecuadas y se pueden preferir debido a su estabilidad prolongada, incluso a temperaturas elevadas (por ejemplo, durante almacenamiento o transporte del dispositivo de punto de cuidado) en este caso los volúmenes de la sexta cámara 5 de depósito y los bucles 14 de medición puede necesitar ser ajustados con el fin asegurar una rehidratación adecuada de reactivos.

50 El proceso como se describió en la figura 12 y 13 se repite hasta que todas las cámaras 10 de reacción de PCR (de las cuales se muestran solo dos en los dibujos) se cargan con las sustancias.

Como se muestra en la figura 14, el segundo 18 elemento de soporte gira luego en dirección horaria hasta que los conductos que conducen a las cámaras 10 de reacción de PCR en el tercer elemento 19 de soporte se desconectan de los conductos del segundo elemento 18 de soporte.

55 Para la amplificación basada en secuencia de los ácidos nucleicos, se pueden aplicar diversos métodos, por ejemplo, PCR, LCR (reacción de cadena de ligasa), NASBA (amplificación Basada en Secuencia de Acido Nucleico), TMA (Amplificación Media por Transcripción), HDA (amplificación dependiente de Helicasa), etcétera.

60 En la realización presentada, se emplea un método PCR que permite una identificación cuantitativa en tiempo real de agentes infecciosos en la muestra del paciente. Es posible una evaluación óptica y/o visual cuando el tercer elemento 19 de soporte, que comprende las cámaras 10 de reacción PCR, están hechas por lo menos parcialmente de un polímero transparente. Un perfil de temperatura adecuado para el proceso PCR se alcanza al deslizarse en diferentes zonas de temperatura, que se crean en la estación base, a lo largo del dispositivo. Algunas características de diseño del dispositivo facilitan el ajuste rápido de temperatura dentro de las cámaras 10 de reacción PCR. Estas incluyen el uso de material de polímero de baja capacidad térmica para el dispositivo, alta conductividad térmica de las paredes de las cámaras de reacción PCR que entran en contacto con los medios de calefacción, así como la



## ES 2 625 940 T3

5 forma plana y la alta relación de superficie volumen de las cámaras 10 de reacción de PCR. Adicionalmente, los medios de calefacción pueden contener por lo menos dos zonas de temperatura adicionales que se fijan a temperaturas, respectivamente, mayores y menores que las temperaturas proporcionadas en el protocolo de ciclo térmico dado. Esto permite un acortamiento considerable de los tiempos de rampa durante el PCR y hace al sistema adecuado para llevar a cabo pruebas PCR cuantitativas rápidas.

La figura 15 muestra una estación base para uso con el dispositivo de acuerdo con las figuras 1 a 14. La estación base implementa todas las funciones que el dispositivo propiamente dicho no proporciona, que incluye:

- 10 - girar el primer elemento 17 y el segundo elemento 18 de soporte;
- mover el elemento 23 de rodillo para la manguera elástica;
- 15 - posicionar el imán 20 permanente externo;
- girar el imán 20 permanente externo;
- posicionar los bloques 30 de temperatura para calentar el proceso PCR;
- 20 - controlar la calefacción de los bloques 30 de temperatura para las etapas de proceso PCR (hibridación de cebador, alargamiento y desnaturalización);
- calentamiento controlado de la cámara 6 de muestra (el calentador integrado en la placa 28 de cubierta) a 55 °C a 95 °C;
- 25 - proporcionar una fuente de luz para excitación de fluorescencia;
- detección de fluorescencia con un fotodiodo (unidad 27 óptica).
- 30 Para un movimiento circular del primer y segundo elemento 17, 18 de soporte, utiliza una caja 25 de velocidades accionada por un motor 26 eléctrico. Para conectar una caja 25 de velocidades y a los elementos 17, 18 de soporte, existen dos momentos de tres pasadores 31, 32 de portador fijados en la caja 25 de velocidades. Tres agujeros respectivos (no mostrados) en los elementos 17, 18 de soporte se ajustan en los pasadores 31, 32 de portador. Por lo tanto, el movimiento giratorio de la caja 25 de velocidades se transmite a los elementos 17, 18 de soporte.
- 35 En una rueda montada existe un montaje para el elemento 23 de rodillo de la bomba de la manguera, de tal manera que el elemento 23 de rodillo se moverá en forma circular alrededor del eje central del dispositivo a lo largo de la manguera elástica.
- 40 Con el fin de girar el agitador 33 magnético dentro de la cámara 7 de proceso, la estación base comprende un dispositivo de mezcla (véase figura 16). Dicho dispositivo de mezcla comprende un imán 20 permanente externo, que se acciona giratoriamente mediante un motor 21 eléctrico pequeño. El imán 20 permanente externo está unido al eje del motor 21 eléctrico. El imán 20 permanente externo se une al eje del motor 21 eléctrico. La orientación norte sur del imán 20 permanente externo está en un nivel horizontal, mientras que el eje del motor 21 eléctrico es vertical.
- 45 De esta manera el agitador 33 magnético dentro de la cámara 7 de proceso del primer elemento 17 de soporte sigue la orientación del imán 20 permanente externo.
- Para controlar la eficiencia de agitación, la distancia entre el imán 20 externo y la cámara 7 de proceso se puede cambiar a través de un brazo 22 de elevación móvil (véase figura 15A). El motor 21 se monta sobre el brazo de elevación. De esta manera la distancia y posición del imán 20 permanente externo se puede controlar al mover el
- 50 brazo de elevación.
- Por lo menos dos y actualmente tres bloques 30 de temperatura alternan durante el procesamiento por debajo de las cámaras 10 de reacción. Para esto, los bloques 30 de temperatura se montan secuencialmente sobre una placa 29 de deslizamiento. Un motor 24 eléctrico los puede mover con el fin de colocar un bloque de temperatura adecuado bajo las cámaras 10 de reacción PCR. Los controladores de temperatura aseguran que las temperaturas se mantengan en niveles constantes. Las zonas de temperatura consisten de bloques 30 calentadas con los elementos de calefacción y temperatura controlados con los sensores de temperatura.
- 55 Por lo menos dos y actualmente tres bloques 30 de temperatura alternan durante el procesamiento por debajo de las cámaras 10 de reacción. Para esto, los bloques 30 de temperatura se montan secuencialmente sobre una placa 29 de deslizamiento. Un motor 24 eléctrico los puede mover con el fin de colocar un bloque de temperatura adecuado bajo las cámaras 10 de reacción PCR. Los controladores de temperatura aseguran que las temperaturas se mantengan en niveles constantes. Las zonas de temperatura consisten de bloques 30 calentadas con los elementos de calefacción y temperatura controlados con los sensores de temperatura.
- 60 Se pueden aplicar métodos de calefacción alternos. Por ejemplo, es posible calefacción por medio de fluidos calientes o elementos "Peltier".
- El dispositivo se monta en la estación base en una alineación inclinada. Debido a la fuerza gravitacional, esto ayuda a evitar que la sustancia ingrese por ejemplo el proceso de la cámara 7 para que salga inintencionalmente de la
- 65 cámara 7 de proceso e ingrese la bomba de manguera.

La figura 17 muestra una realización adicional de un dispositivo de acuerdo con la invención. Este dispositivo comprende tres elementos de soporte que se pueden mover con respecto al otro. A diferencia de la primera realización mostrada en la figura 1 a figura 14, los tres elementos de soporte se pueden mover linealmente con respecto al otro. La disposición de las cámaras y los componentes funcionales adicionales son similares, pero no idénticos a la disposición dentro del dispositivo de acuerdo con la primera realización. El primer elemento 117 de soporte comprende la cámara de muestra y la cámara de proceso. El segundo elemento 118 de soporte comprende diferentes cámaras de depósito, así como la cámara de elución de dos puertos 112 para una manguera elástica (no mostrada) como parte de un elemento de bomba. Incorporado en el tercer elemento 119 de soporte que tiene cámaras de reacción PCR y bucles de medición. Los elementos de soporte se pueden hacer parcialmente o completamente de un material transparente para permitir la visibilidad de las cámaras y conductos como se muestra en la figura 17 para el segundo elemento 118. de soporte

Un elemento adicional de un dispositivo de acuerdo con la invención se muestra en la figura 18 y figura 19. El dispositivo comprende tres elementos 217, 218, 219, de soporte anular, que se unen a una barra 220 de soporte en una forma móvil (que permite un movimiento giratorio, así como un movimiento en la dirección longitudinal de la barra de soporte). Los tres elementos de soporte pueden girar adicionalmente con respecto al otro. Incorporado en la barra 220 de soporte se encuentra un dispositivo de calefacción (no mostrado) que crea diferentes zonas T1 a T5 de temperatura. La disposición de las diferentes cámaras y componentes funcionales en el primer, segundo y tercer elemento 217, 218, 219 de soporte corresponde a la disposición dentro del dispositivo de acuerdo con la figura 17.

Reivindicaciones

- 5 1. Un dispositivo para analizar una muestra, dicho dispositivo comprende por lo menos una cámara de depósito y por lo menos una cámara (7) de proceso, mientras que la cámara (7) de proceso se integra en por lo menos un primer elemento (17; 117; 217) de soporte y la cámara de depósito se integra en por lo menos un segundo elemento (18; 118; 218) de soporte, mientras que los elementos de soporte se disponen de tal manera que la cámara (7) de proceso se puede conectar con la cámara de depósito mediante un movimiento relativo de la primera (17; 117; 217) y segundos elementos (18, 118; 218) de soporte con respecto al otro, dicho dispositivo adicional comprende conductos, que se integran en los elementos de soporte, y un elemento de bomba que se integra en uno de los
- 10 elementos de soporte para trasferir las sustancias dentro del dispositivo desde una cámara a la otra caracteriza porque dichos conductos y dicho elemento de bomba se proporcionan con el fin de formar un bucle de circuito de fluido cerrado con la cámara de proceso y la cámara de depósito, cuando se conectan las cámaras.
- 15 2. El dispositivo de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque el elemento de bomba comprende una manguera elástica.
3. El dispositivo de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque el movimiento relativo de los elementos de soporte es lineal, circular, arqueado o diagonal.
- 20 4. El dispositivo de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque el primer elemento (17) de soporte se forma como un elemento circular y el segundo elemento (18) de soporte se forma como un elemento anular, mientras que los elementos circulares y anulares se disponen concéntricamente entre sí.
- 25 5. El dispositivo de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque un tercer elemento (19; 119; 219) de soporte se proporciona de tal manera que se puede mover con respecto al segundo elemento de soporte.
- 30 6. El dispositivo de acuerdo con la reivindicación 5, caracterizado porque el tercer elemento de soporte se forma como un disco anular que se dispone concéntricamente y puede girar con respecto al segundo elemento (18) de soporte.
- 35 7. El dispositivo de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque el dispositivo es al menos parcialmente transparente para permitir la observación visual y/o óptica del análisis.
- 35 8. Un sistema que comprende:
- un dispositivo de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes y
  - una estación base, dicha estación base, comprende por lo menos una unidad de bomba que actúa sobre el
- 40 elemento de bomba del dispositivo con el fin de crear una presión de bombeo.
- 45 9. El sistema de acuerdo con la reivindicación 8, caracterizado porque el elemento de bomba comprende una manguera elástica y la unidad de bomba comprende un elemento (23) de rodillo, que se mueve a lo largo de la longitud de la manguera elástica, deformando por lo tanto localmente la manguera elástica.
- 50 10. El sistema de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, caracterizada porque por lo menos una unidad para mover los elementos de soporte con respecto al otro y/o una unidad de evaluación y control.
- 50 11. El sistema de acuerdo con una de las reivindicaciones 8 a 10, caracterizado porque por lo menos unos medios de calefacción, mientras que dichos medios de calefacción generan diferentes zonas de temperatura, y el sistema comprende adicionalmente preferiblemente una unidad mediante la cual dichas zonas de temperatura se pueden mover con respecto al dispositivo.
- 55 12. Uso del dispositivo de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 7 o del sistema de acuerdo con una de las reivindicaciones 8 a 11 en el campo de aplicaciones de punto de cuidado, en particular en el campo de análisis de ácidos nucleicos.

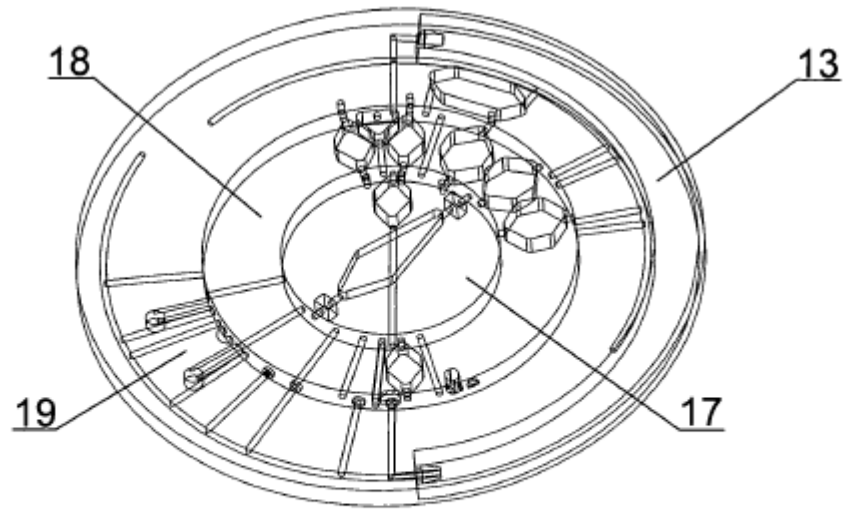


Fig. 1

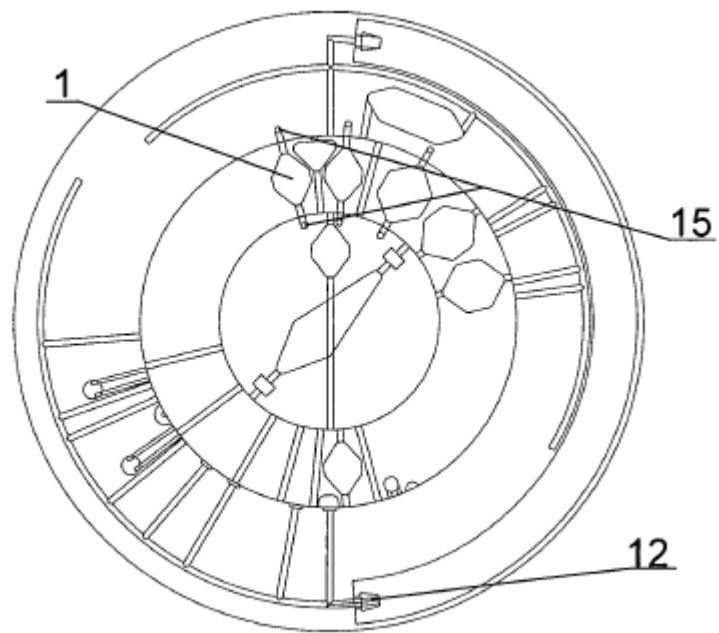


Fig. 2

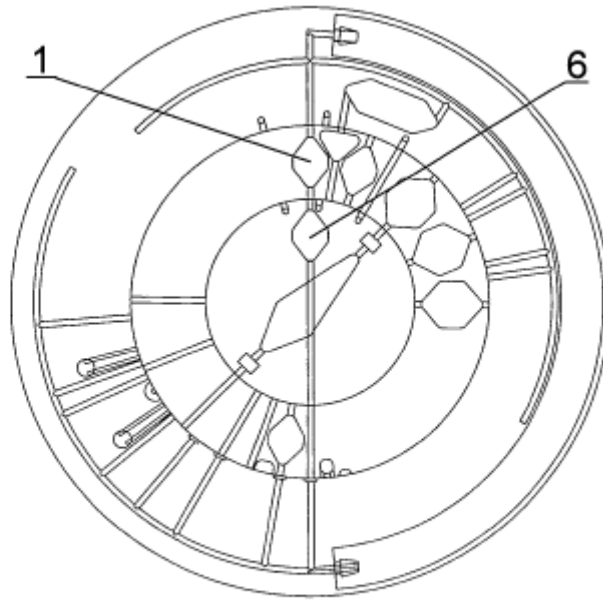


Fig. 3

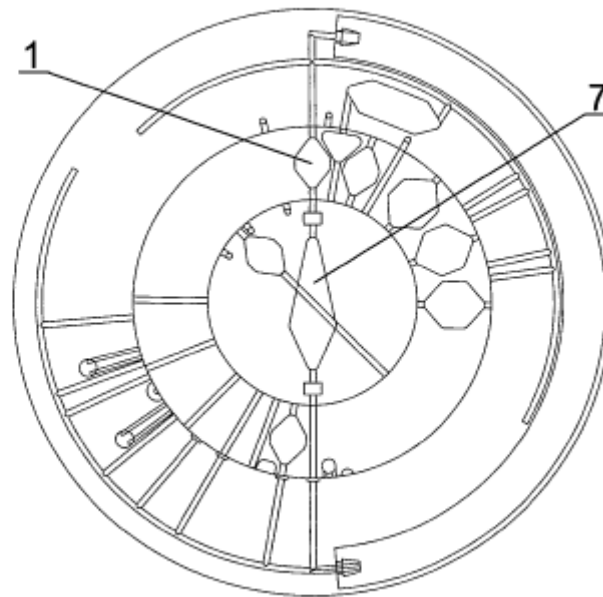


Fig. 4

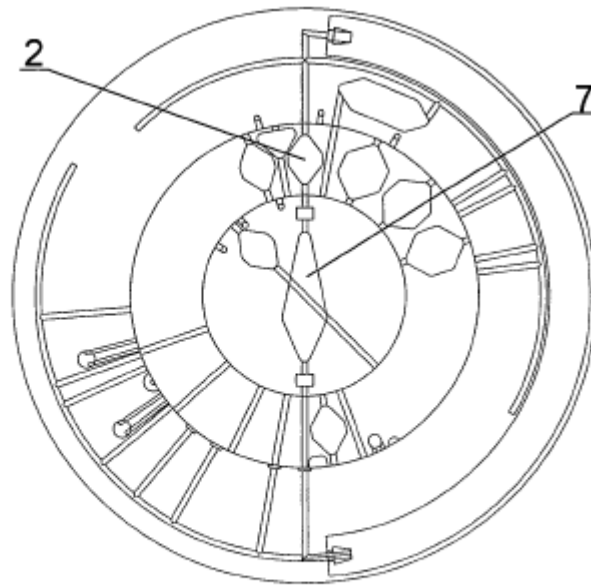


Fig. 5

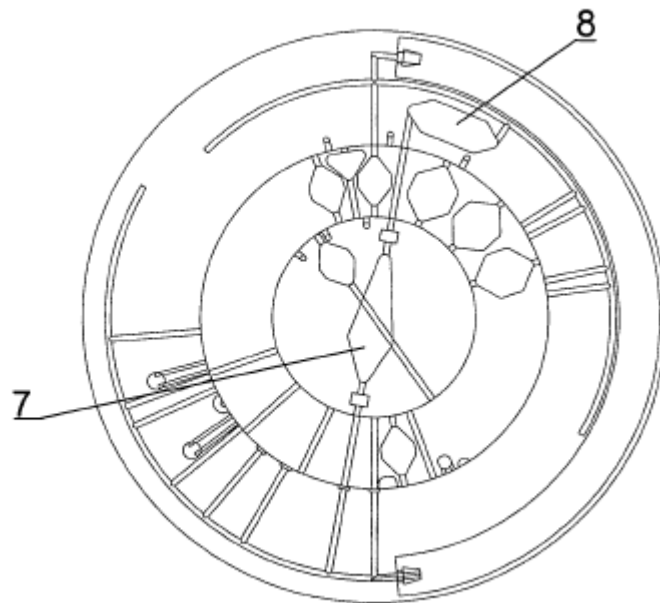


Fig. 6

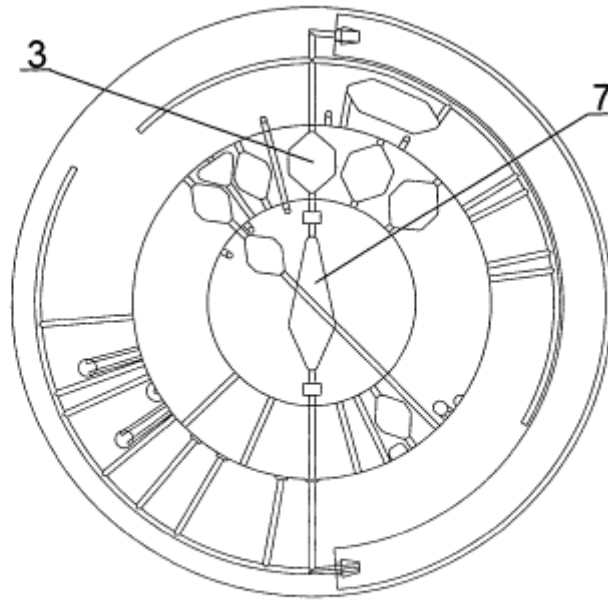


Fig. 7

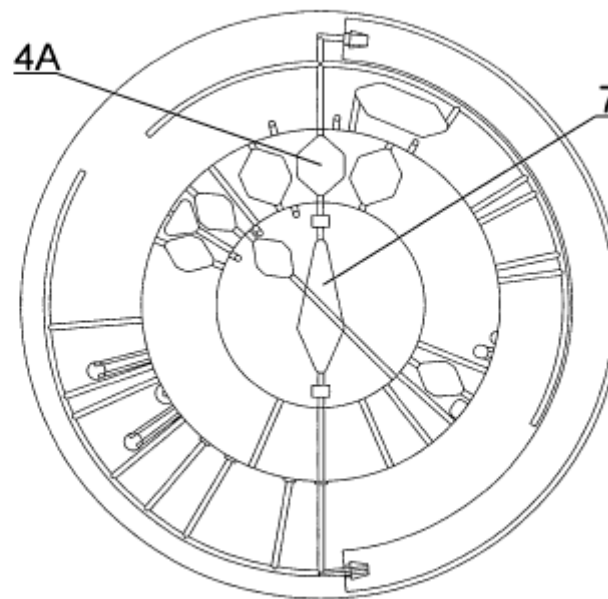


Fig. 8

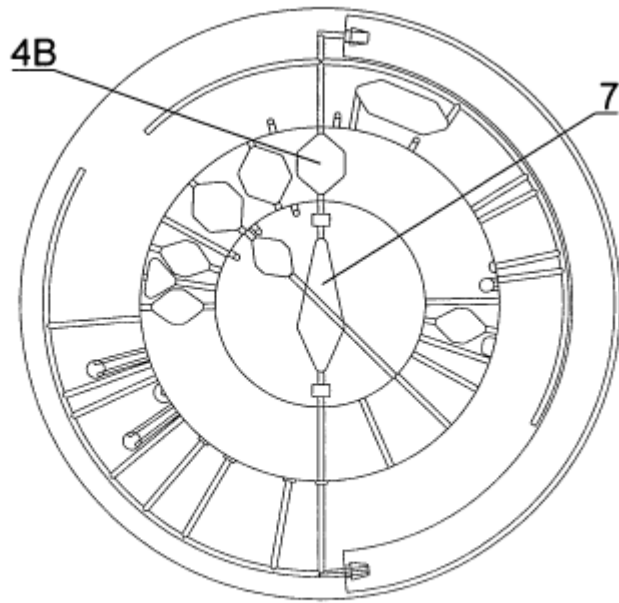


Fig. 9

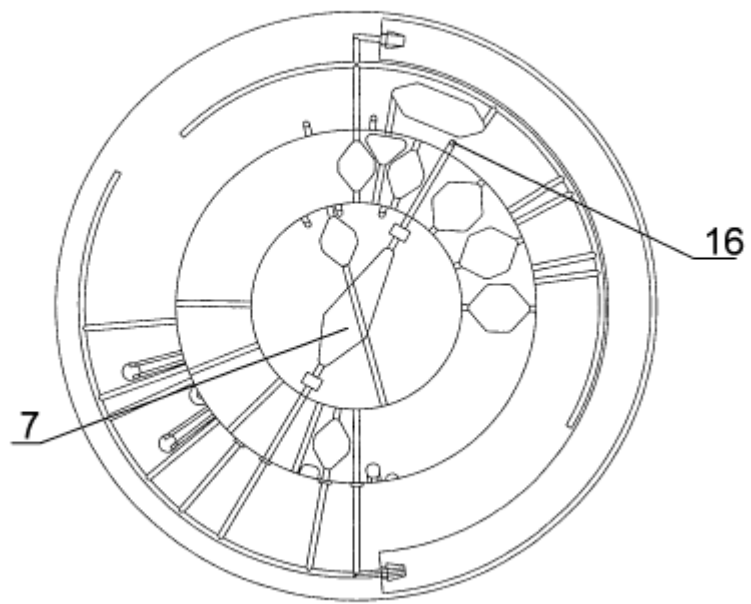


Fig.10



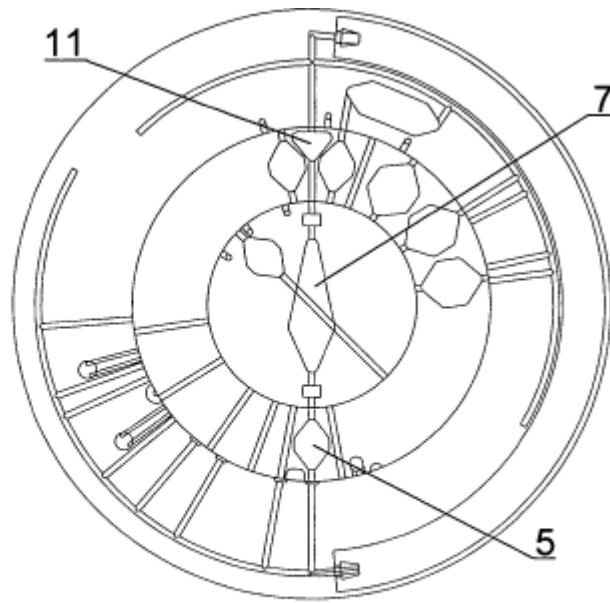


Fig. 11

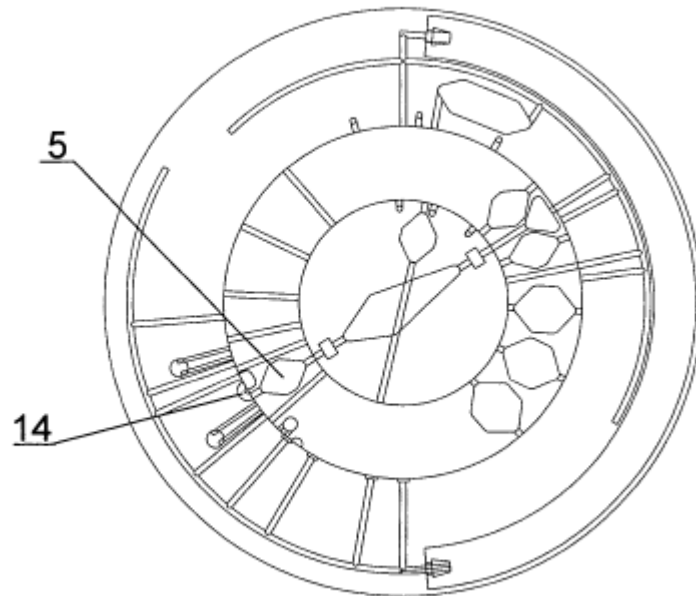


Fig. 12

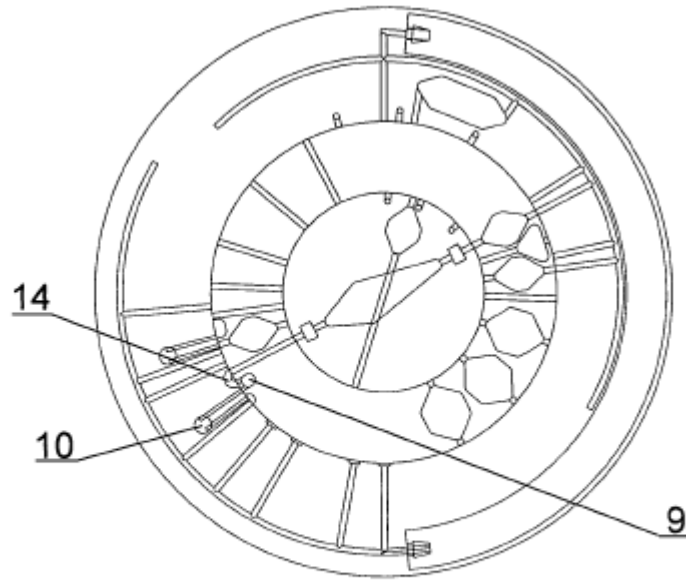


Fig. 13

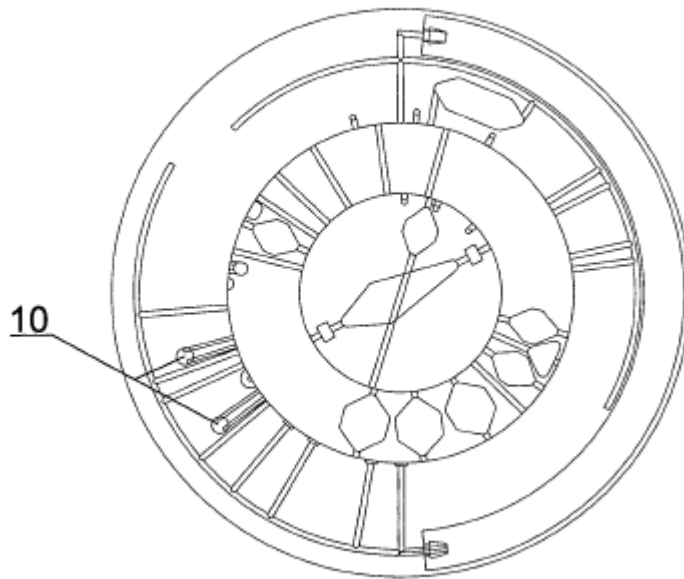


Fig. 14

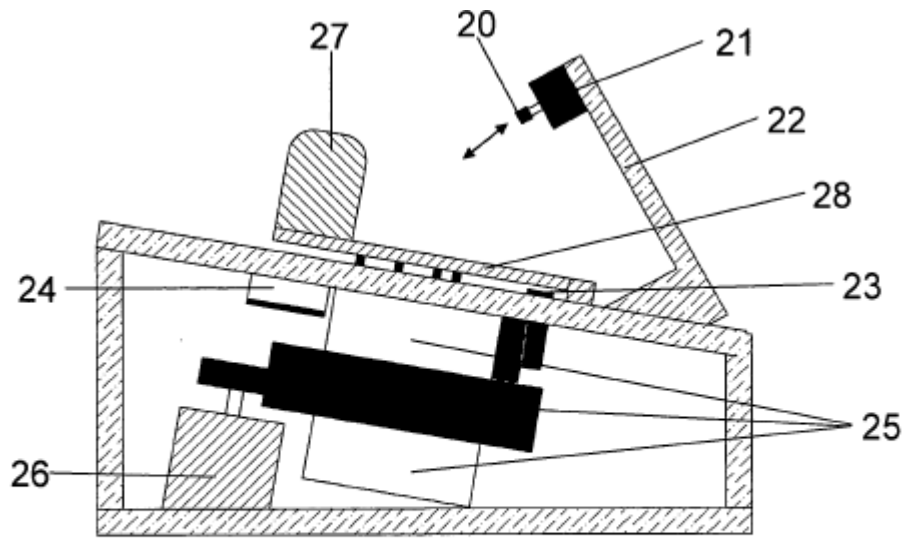


Fig. 15A

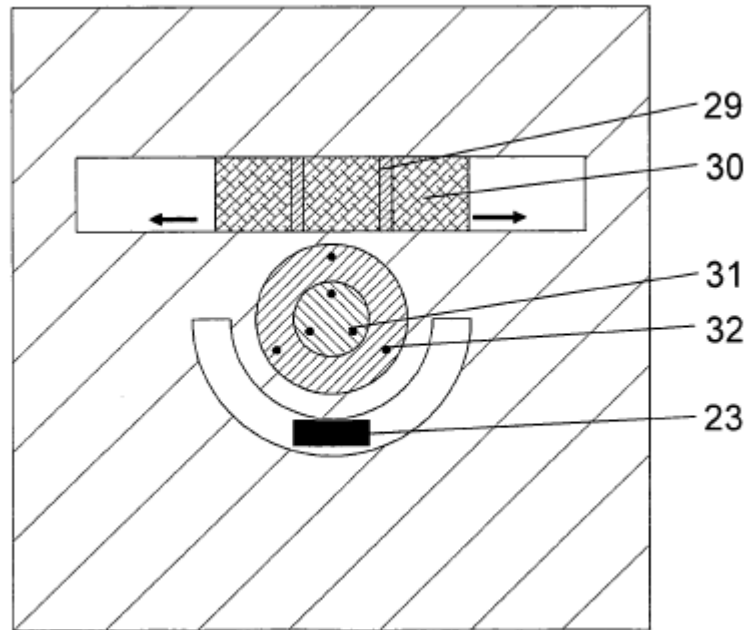


Fig. 15B

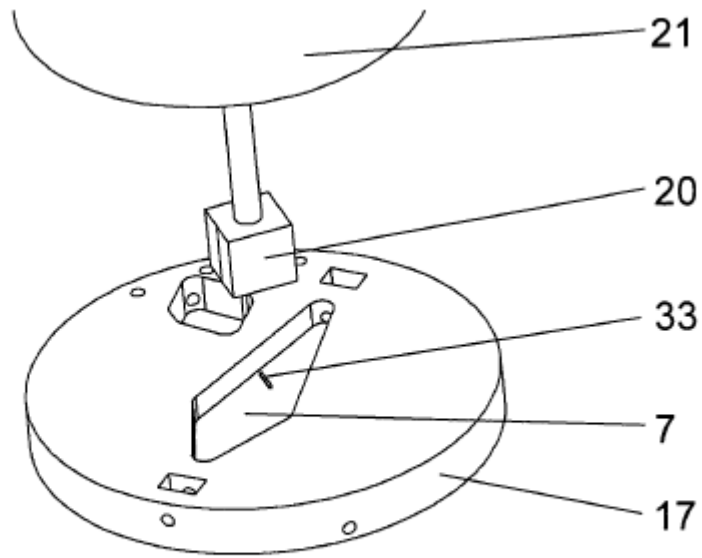


Fig. 16

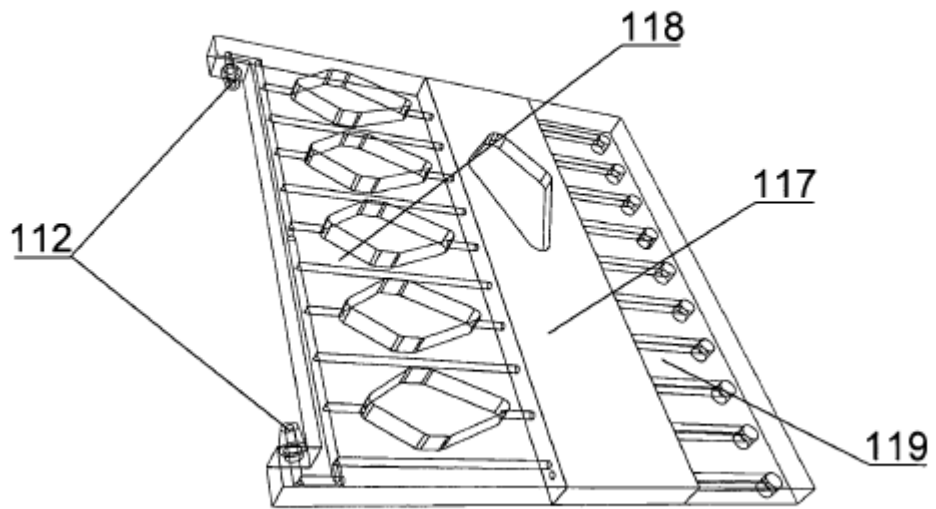


Fig. 17

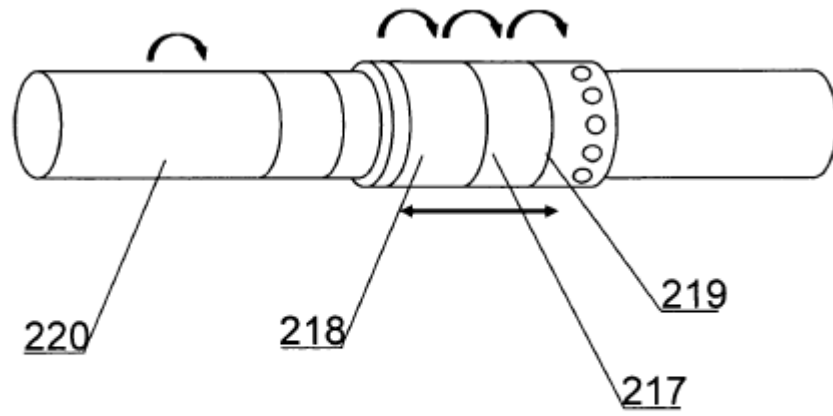


Fig. 18

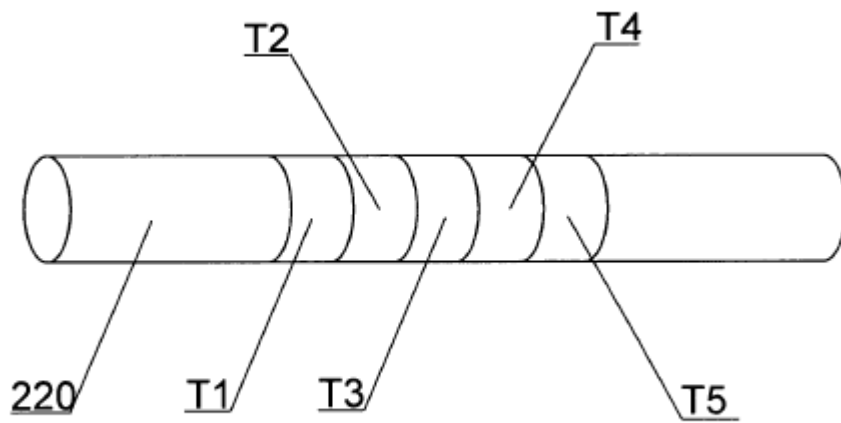


Fig. 19