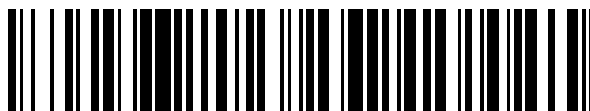


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 678 423**

51 Int. Cl.:

C12M 1/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.12.2009** **PCT/FR2009/052458**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.06.2010** **WO10067019**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.12.2009** **E 09804201 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.04.2018** **EP 2356210**

54 Título: **Sistema automatizado para la lisis de microorganismos presentes en una muestra, de extracción y de purificación de los ácidos nucleicos de dichos microorganismos para análisis**

30 Prioridad:

10.12.2008 FR 0858420

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

10.08.2018

73 Titular/es:

**BIOMÉRIEUX (100.0%)
Chemin de l'Orme
69280 Marcy L'etoile, FR**

72 Inventor/es:

**BROYER, PATRICK;
DUPONTFILLIARD, AGNÈS;
GALDIERO, MASSIMO;
GUY, MICHEL;
KREUWEL, HERMANUS, JOHANNES, MARIA;
MAIONE, EMILIANO y
VERWIMP, EMIEL, GEREBERN, MARIA**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 678 423 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 la lisis de microorganismos presentes en una muestra, de extracción y de purificación de los ácidos nucleicos de dichos microorganismos para análisis

El campo técnico de la presente invención es el del análisis biológico. Más particularmente, la presente invención se refiere en primer lugar a un dispositivo para la lisis de los microorganismos presentes en una muestra medioambiental o clínica, de extracción y purificación de los ácidos nucleicos de los microorganismos. La invención se refiere además a un sistema automatizado para la lisis de microorganismos de extracción y de purificación de ácidos nucleicos de los microorganismos, para el análisis.

Se observa, desde hace varios años, un recrudecimiento de las infecciones nosocomiales dentro de los hospitales. Estas infecciones se explican por la contaminación de las personas hospitalizadas, y, por lo tanto, por definición, inmunodeprimidas, por los microorganismos patógenos presentes en la esfera del entorno hospitalario y no destruidos a pesar del cuidado siempre importante aportado por la desinfección de las herramientas y de las superficies y del tratamiento del aire. Con respecto a estos casos cada vez más frecuentes de contaminaciones microbiológicas medioambientales, la elaboración de los dispositivos y los métodos que permiten mejorar y facilitar los controles medioambientales se ha vuelto un objetivo principal para los profesionales de la salud.

Más allá del problema de las infecciones nosocomiales, el control de las condiciones medioambientales se ha vuelto también, desde hace varios años, una preocupación recurrente en el medio industrial, en particular las industrias agro-alimentarias, las industrias farmacéuticas o cosméticas. En las industrias agro-alimentarias, se conocen las consecuencias desastrosas sobre la salud de los consumidores que pueden tener la contaminación de los productos, incluso de las materias primas, por un microorganismo patógeno. En efecto, las toxi-infecciones alimentarias, debidas a las bacterias tales como del género *Listeria* o *Salmonella* son, en la actualidad, un asunto común. El control de la calidad del aire es también un proceso clave en el proceso de la calidad de las industrias farmacéuticas o cosméticas.

Por otra parte, estos controles deben responder a un nivel de exigencia siempre más importante, por una reglamentación siempre más estricta.

Entre las herramientas que están a disposición de los profesionales de la salud o de las industrias para la realización de controles medioambientales, los aerobiocolectores son las soluciones de elección para la detección de los microorganismos del aire. Estos dispositivos se colocan en los lugares apropiados de los sitios donde se desea medir la aerobio-contaminación. Están constituidos generalmente de un colector del aire acoplado a un medio de cultivo. El aire recogido por el colector de aire entra en contacto con el medio de cultivo; medio de cultivo sobre el cual se depositarán los microorganismos eventualmente contenidos en el aire recogido. El medio de cultivo se recupera después y se coloca en estufa para favorecer el crecimiento de los microorganismos. Así, es posible detectar e identificar dichos microorganismos mediante técnicas tradicionales de microbiología.

Estos dispositivos presentan, sin embargo, el inconveniente principal que está relacionada con la tecnología utilizada. Este inconveniente es el tiempo necesario para obtener el resultado del análisis. En efecto, la utilización de las técnicas tradicionales de microbiología, en particular de la bacteriología, implica el respeto de los tiempos de incubación necesarios para el crecimiento celular, incluso de las fases de re-sembrado sobre los medios de cultivo específicos para permitir la identificación. Se deduce que el tiempo necesario para obtener un resultado es relativamente largo, incluso demasiado largo, cuando se busca detectar e identificar un organismo patógeno, responsable de una infección nosocomial o de una toxi-infección alimentaria.

Otro inconveniente de este tipo de dispositivo es la utilización de medios de cultivo, aunque permite discriminar entre los géneros y las especies bacterianas, no permite generalmente discriminar las cepas de una misma especie bacteriana. Ahora bien, se sabe que la patogenicidad de un microorganismo puede variar de manera significativa según la cepa considerada.

Por otra parte, este tipo de dispositivo presenta como inconveniente no permitir la puesta en evidencia de los microorganismos presentes en el aire, viables pero no cultivables.

Existen por otra parte dispositivos destinados a la recuperación de las partículas presentes en el aire, en particular de los microorganismos. El documento GB-2 254 024 describe así un dispositivo para recoger las partículas contenidas en el aire cuyo principio está basado sobre el efecto de un ciclón. Si tal dispositivo es adecuado para la recogida de las partículas contenidas en el aire, incluyendo los microorganismos, no se estudia de ninguna manera tratar la muestra así obtenida, en particular para realizar la extracción del material genético destinado a utilizarse para el análisis.

De manera más general, las técnicas más pertinentes en términos de la identificación de los microorganismos y/o de rapidez de obtención de resultados, ya sea frente a muestras clínicas o medioambientales, son indudablemente las técnicas de diagnóstico molecular. Estas técnicas basadas en el análisis del material genético de los microorganismos, y en particular de ciertas secuencias específicas de interés, permiten obtener una identificación muy avanzada de los organismos en un tiempo record, ya que permiten eliminar las etapas de cultivo.

Sin embargo, la utilización de tales técnicas presenta un cierto número de límites, entre los cuales el más importante es la cantidad potencialmente limitada de microorganismos presentes en el aire y por lo tanto recuperables para realizar el análisis. En efecto, se sabe que las muestras medioambientales, pero también algunas muestras clínicas, son relativamente pobres en microorganismos. Esto da como resultado que la cantidad del material genético obtenido a partir de esta materia prima es reducida. Los rendimientos de la técnica utilizada para extraer los ácidos nucleicos, en términos del rendimiento, se convierten entonces en un parámetro crucial.

Por otra parte, la mayor parte de las técnicas existentes de lisis de los microorganismos, no son genéricas frente al conjunto de los microorganismos y/o, necesitan la intervención de personal calificado para encargarse de las etapas manuales.

El documento WO-A-2005/038025 describe un método de extracción de ácidos nucleicos de los microorganismos extraídos en particular del aire. Este método consiste en la realización de tres métodos diferentes de lisis, es decir una lisis química, una lisis por choque térmico y una lisis mecánica. Si tal método permite, indudablemente, optimizar el rendimiento de extracción de los ácidos nucleicos y por lo tanto aumentar la cantidad del material genético disponible para el análisis, el hecho es que este rendimiento sigue dependiendo de la cantidad de microorganismos recuperados. Ahora bien, nada se describe en este documento para optimizar la recuperación de los microorganismos.

El documento US-5,707,861 describe un dispositivo que permite desintegrar células vivas del tipo de los microorganismos. Este dispositivo permite lisar las células utilizando al mismo tiempo unas esferas de vidrio, pero también el efecto de vibración debido al espacio existente entre los tubos que contienen los microorganismos y los orificios del soporte que lleva dichos tubos. Así, tal dispositivo permite optimizar la lisis de células y por lo tanto optimizar la extracción del material genético. Tal dispositivo y el método utilizado para este último presentan los mismos límites que aquellos expuestos anteriormente, a saber que permanecen dependientes de la cantidad de microorganismos recuperados. Por otra parte, presentan como inconveniente suplementario tener que efectuar posteriormente una etapa de concentración de los ácidos nucleicos para aislar los desechos celulares. Necesitan por último recuperar manualmente los ácidos nucleicos, al final de la etapa de concentración.

Estos problemas se plantean también con el dispositivo descrito en el documento US-5,567,050.

El documento EP 0 303 791 describe un sistema y un método que permiten lisar unas células mediante un dispositivo constituido por un triturador de bolas. El triturador está esencialmente constituido de un rotor 3 y de un estator 4, entre los cuales se sitúa un espacio anular en el que interviene la lisis de las células. Sin embargo, tal sistema no es propicio para la recuperación de los microorganismos, en particular que provienen de una extracción de aire.

También se han descrito unos sistemas más integrados. Así, el documento WO-A-2004/018704 describe un dispositivo, y un método asociado que utiliza la tecnología de amplificación de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), para recoger los microorganismos en el aire e identificarlos. Este sistema está especialmente adaptado para la lucha contra los intentos de atentados por contaminación biológica en los centros de clasificación postal. Este sistema se compone de un dispositivo de recogida del aire colocado a lo largo del circuito de transporte del correo, un dispositivo de filtración/separación de las partículas por un efecto ciclónico, un dispositivo de concentración/recuperación de las partículas en una muestra líquida, un dispositivo de transferencia de una fracción de la muestra en un cartucho de análisis por PCR GeneXpert™ de la compañía Cepheid. El cartucho se transfiere después manualmente en un mecanismo de análisis biológico independiente para la identificación del o de los microorganismos recogidos en el aire.

Si este sistema permite resolver un buen número de problemas técnicos relacionados con los dispositivos y procedimientos descritos anteriormente, éste presenta no obstante inconvenientes principales. El primero de estos inconvenientes es que el sistema de tratamiento de la muestra (recogida, separación, concentración/recuperación) previamente a la transferencia en el cartucho de análisis es relativamente complejo y costoso. Otro inconveniente es que no existe cartucho GeneXpert™ que pueda hacer a la vez la lisis y la purificación de los ácidos nucleicos. Un segundo inconveniente es que los microorganismos recogidos se recuperan en una muestra líquida cuya única fracción se analiza. Lo que significa que el riesgo de no recuperar la totalidad de los microorganismos y por lo tanto la totalidad de los ácidos nucleicos es muy importante, limitando fuertemente la pertinencia del análisis. Por otra parte, a pesar de su complejidad, este sistema necesita la transferencia manual del cartucho en el mecanismo de análisis GeneXpert™.

Así, un primer objetivo de la presente invención es proporcionar un dispositivo, un sistema y un método de lisis universal, al mismo tiempo eficaces para las muestras medioambientales y clínicas, para una gran diversidad de microorganismos, ya se trate de bacterias, de virus o también de hongos, eventualmente en estado vegetativo o en la forma de esporas.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un dispositivo apto para lisar eficazmente los microorganismos contenidos en una extracción ambiental tal como el aire, o en una muestra clínica, a fin de extraer los ácidos nucleicos y recuperar los ácidos nucleicos para el análisis, de manera integrada.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un dispositivo capaz de recoger la integridad de los microorganismos contenidos en una muestra de aire.

- 5 Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un dispositivo simple de diseño y que minimiza el número y la complejidad de las etapas manuales.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un dispositivo excesivamente compacto.

- 10 Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un dispositivo cerrado en el cual las diferentes etapas enunciadas anteriormente se desarrollan sin riesgo de contaminación exterior.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un dispositivo en el que dichas etapas se desarrollen sin transferencia de la muestra por el operador, impidiendo por lo tanto la contaminación de esta última.

- 15 Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un dispositivo y un sistema que limita la intervención humana y que mejora la trazabilidad del tratamiento de la muestra.

- 20 Finalmente, otro objetivo de la presente invención es proporcionar un dispositivo y un sistema automatizado capaz de proporcionar ácidos nucleicos dianas en un tampón apto para utilizarse directamente en las etapas de diagnóstico molecular que comprenden por ejemplo etapas de amplificación y de detección y esto, sin etapas de pretratamiento adicionales tales como una centrifugación o una filtración.

- 25 Estos objetivos, entre otros, se alcanzan por la presente invención que se refiere, en primer lugar, a un dispositivo de recogida de los microorganismos contenidos en el aire, comprendiendo dicho dispositivo:

- un módulo de recogida del aire, que comprende:

- 30 i. un elemento superior que comprende un conducto de admisión del aire que permite la entrada de un flujo de aire hacia el interior de dicho módulo, disponiendo dicho conducto en su base de medios de perturbación del flujo de aire, ii. un elemento inferior que tiene medios de evacuación del aire que permiten la salida del flujo de aire creado,

- 35 pudiendo los elementos superior e inferior ser solidarizados entre sí de tal modo que el flujo de aire pueda crearse en el interior de dicha molécula de recogida del aire;

- un cartucho, de forma sustancialmente cilíndrica, que comprende una zona de retención de los microorganismos, comprendiendo dicha zona de retención unos medios de lisis de microorganismos, colocándose dicho cartucho en el interior de dicho módulo de recogida del aire.

- 40 De manera preferida, la zona de retención de los microorganismos del cartucho del dispositivo de recogida de los microorganismos comprende, además, un material capaz de retener los microorganismos, para mantener los medios de lisis en su lugar y para que se disuelvan en presencia de un líquido.

- 45 En el dispositivo según la invención, los medios de perturbación del flujo de aire comprenden un cono en forma de ojiva colocado en el centro de la lumbrera del conducto de admisión del aire y al menos un álabe que conecta la pieza en forma de ojiva con la cara interna del conducto de admisión del aire.

- 50 Ventajosamente, el módulo de recogida del aire está destinado a conectarse a un circuito de reciclaje del aire o a un dispositivo de aspiración del aire.

Otro objeto de la presente invención se refiere a un dispositivo de lisis de los microorganismos, comprendiendo dicho dispositivo:

- 55 - un cartucho, de forma sustancialmente cilíndrica, que comprende una zona de retención de los microorganismos, comprendiendo dicha zona de retención unos medios de lisis de microorganismos y un material apto para retener dichos microorganismos, para mantener los medios de lisis en su lugar y en disolverse en presencia de líquido dicho cartucho, teniendo dicho cartucho el papel de estator;

- 60 - un rotor, apto para colocarse en el cartucho, comprendiendo dicho rotor medios para puesta en rotación.

Según un modo de realización preferido, este dispositivo comprende además una sobrecubierta destinada a mantener el rotor solidario con el cartucho.

- 65 Ventajosamente, los medios de puesta en rotación están constituidos por ranuras dispuestas en la pared de un conducto ciego, estando dichas ranuras diametralmente opuestas y destinadas a recibir el extremo de un eje de

transmisión de un medio de accionamiento del rotor en rotación.

Según una característica destacable de este dispositivo de lisis de microorganismos, el diámetro interno del cartucho es superior al diámetro externo del rotor, de tal modo que cuando el rotor esté encajado en el cartucho, la distancia que separa la pared interna del cartucho de la pared externa del rotor es suficientemente importante para permitir a los medios de lisis posicionarse en este espacio intersticial y suficientemente reducido para que los medios de lisis estén en contacto con una u otra de dichas paredes.

Otro objeto de la presente invención se refiere a un sistema de lisis de microorganismos y de purificación de los ácidos nucleicos de dichos microorganismos, que comprende:

- un medio de posicionamiento del dispositivo de lisis de microorganismos según la invención; un dispositivo de recogida según la invención;

- un medio de accionamiento del rotor en rotación, cuando el dispositivo de lisis se coloca sobre el medio de posicionamiento;

- al menos un contenedor de recepción de los ácidos nucleicos;

- al menos un medio de aspiración/expulsión del líquido;

- una válvula multivías, en comunicación fluidica con el dispositivo de lisis de microorganismos, un contenedor de recepción de los ácidos nucleicos purificados y el medio de aspiración/expulsión del líquido.

Preferentemente, este sistema de lisis según la reivindicación anterior, comprende además otros medios de imantación. Puede también comprender medios de calentamiento.

Según un modo particular de la invención, la válvula multivías comprende un medio de aspiración-expulsión.

Otro objeto de la invención se refiere a un procedimiento de recogida de los microorganismos contenidos en el aire, comprendiendo dicho procedimiento las etapas que consisten en:

- a) colocar el cartucho según la invención en el interior de un módulo de recogida del aire, según la invención, para obtener el dispositivo de recogida de los microorganismos según la invención, estando la zona de retención en el interior de dicho cartucho en comunicación con el conducto de admisión del aire del módulo de recogida del aire,

- b) provocar la entrada de aire en el interior de dicho módulo de recogida de aire por cualquier medio apropiado,

- c) recoger los microorganismos contenidos en el aire en la zona de retención del cartucho.

Otro objeto de la invención se refiere a un procedimiento de lisis de microorganismos contenidos en el aire, comprendiendo dicho procedimiento las etapas que consisten en:

- a) colocar un cartucho en el interior de un módulo de recogida del aire, para obtener el dispositivo de recogida de los microorganismos según la invención, estando la zona de retención en el interior del cartucho en comunicación con el conducto de admisión del aire del módulo de recogida del aire,

- b) provocar la entrada de aire en el interior de dicho módulo de recogida de aire por cualquier medio apropiado,

- c) recoger los microorganismos contenidos en el aire en la zona de retención del cartucho,

- d) sacar el cartucho del módulo de recogida del aire,

- e) colocar el rotor según la invención en el cartucho según la invención, para obtener el dispositivo de lisis de microorganismos según una de las reivindicaciones,

- f) colocar el dispositivo de lisis de los microorganismos en el sistema de lisis de los microorganismos y de la purificación de los ácidos nucleicos,

- g) introducir un líquido de elución en el cartucho, provocando la suspensión de los medios de lisis situados en la zona de retención de los microorganismos del cartucho, y

- h) lisar mecánicamente los microorganismos, por la puesta en rotación del rotor en el interior del cartucho gracias a un medio de puesta en rotación del rotor, accionando dicho rotor los medios de lisis de microorganismos.

Por líquido de elución, se entiende cualquier líquido apto para permitir la lisis, incluso la extracción y la recuperación de

los ácidos nucleicos en buenas condiciones. Tal líquido es generalmente un tampón. En el caso en el que el uso del procedimiento según la invención tiene por objeto extraer los ácidos nucleicos y recuperarlos para su análisis, tal tampón deberá permitir la conservación de dichos ácidos nucleicos. Tales líquidos son bien conocidos por el experto en la materia.

Otro objeto de la invención se refiere a un procedimiento de extracción de los ácidos nucleicos de los microorganismos contenidos en el aire, comprendiendo el procedimiento las etapas que consisten en:

a) colocar un según la invención en el interior de un módulo de recogida según la invención, para obtener el dispositivo de recogida de microorganismos según la invención, estando la zona de retención en el interior de dicho cartucho en comunicación con el conducto de admisión del aire del módulo de recogida del aire,

b) provocar la entrada de aire en el interior de dicho módulo de recogida de aire por cualquier medio apropiado,

c) recoger los microorganismos contenidos en el aire, en la zona de retención del cartucho,

d) sacar el cartucho del módulo de recogida del aire,

e) colocar el rotor en el cartucho,

f) introducir un líquido de elución en el cartucho con la ayuda de un medio de aspiración-expulsión, provocando la suspensión de los medios de lisis contenidos en el cartucho, y

g) lisar mecánicamente las células del tejido celular, por puesta en rotación del rotor, en el interior del cartucho gracias al medio de accionamiento en rotación del rotor, accionando dicho rotor en rotación los medios de lisis, y

h) aspirar el líquido de elución que contiene los ácidos nucleicos de dichos microorganismos liberados durante la lisis, y

i) distribuir el líquido de elución en un contenedor de recepción y de purificación de los ácidos nucleicos.

De manera preferida, los procedimientos de lisis de microorganismos y de extracción de ácidos nucleicos descritos anteriormente comprenden una etapa suplementaria d') que consiste en hacer crecer los microorganismos concentrados en la zona de retención del cartucho.

Ventajosamente, la puesta en crecimiento se obtiene por la incubación del cartucho en una estufa durante un tiempo que va desde 2 hasta 24 horas.

Preferentemente, las etapas f) a i) de los procedimientos de lisis de microorganismos y de extracción de ácidos nucleicos descritos anteriormente, se realizan en el sistema de lisis de los microorganismos y de purificación de los ácidos nucleicos.

Otro objeto de la invención se refiere a un procedimiento de lisis de los microorganismos, comprendiendo dicho procedimiento las etapas que consisten en:

a) obtener un cartucho en el que los microorganismos se concentran en la zona de retención de dicho cartucho,

b) colocar el rotor según la invención en el cartucho según la invención,

c) introducir un líquido de interés en el cartucho, generando la suspensión de los medios de lisis situados en la zona de retención de los microorganismos del cartucho, y

d) lisar mecánicamente los microorganismos, por puesta en rotación del rotor, en el interior del cartucho, accionando dicho rotor en rotación los medios de lisis de los microorganismos.

Otro objeto de la invención se refiere a un procedimiento de extracción de los ácidos nucleicos de los microorganismos, comprendiendo dicho procedimiento las etapas que consisten en:

a) obtener un cartucho en el que los microorganismos se concentran en la zona de retención,

b) colocar el rotor según la invención en el cartucho según la invención,

c) introducir un líquido de elución en el cartucho, generando la suspensión de los medios de lisis situados en la zona de retención de los microorganismos del cartucho, y

d) lisar mecánicamente los microorganismos, mediante la puesta en rotación del rotor, en el interior del cartucho,

accionando dicho rotor en rotación los medios de lisis de los microorganismos, y

e) aspirar el líquido de la elución que contiene los ácidos nucleicos de dichos microorganismos liberados durante la lisis, y

f) distribuir el líquido de elución en un contenedor de recepción y de purificación de los ácidos nucleicos.

Otro objeto de la presente invención se refiere a un procedimiento de lisis de los microorganismos contenidos en una muestra líquida, comprendiendo dicho procedimiento las etapas que consisten en:

a) introducir la muestra líquida que contiene dichos microorganismos en un cartucho, cerca de la zona de retención, para que dicha muestra líquida ocasione la puesta en suspensión de los medios de lisis situados en dicha zona de retención de los microorganismos del cartucho;

b) colocar el rotor según la invención en el cartucho según la invención,

c) lisar mecánicamente los microorganismos, mediante la puesta en rotación, en el interior del cartucho, provocando esta puesta en rotación la suspensión de los medios de lisis situados en dicha zona de retención de los microorganismos del cartucho, accionando dicho rotor en rotación los medios de lisis sobre los cuales se retienen los microorganismos.

Por muestra líquida, se entiende cualquier muestra líquida susceptible de contener los microorganismos. Puede tratarse de una muestra líquida de origen humano o animal. Esta muestra puede ser, por ejemplo, de orina, de sangre total, del plasma o de cualquier otro líquido corporal. La muestra líquida puede ser de origen alimentario tal como una bebida. Ésta puede ser también de origen medioambiental, tal como agua. Por otra parte, la muestra líquida puede ser también un líquido llamado de transferencia, en el cual los microorganismos eventuales contenidos sobre un dispositivo de extracción superficial, del tipo escobillón tales como aquellos comercializados por la compañía COPAN, bajo la denominación *flockedSWABS*, se han resuspendido por agitación de dicho escobillón en el líquido de transferencia.

Otro objeto de la invención se refiere a un procedimiento de extracción de los ácidos nucleicos de los microorganismos contenidos en una muestra líquida, comprendiendo dicho procedimiento las etapas que consisten en:

a) introducir una muestra líquida que contiene dichos microorganismos en un cartucho, cerca de la zona de retención, de tal modo que dicha muestra líquida provoque la suspensión de los medios de lisis situados en dicha zona de retención de los microorganismos del cartucho;

b) colocar el rotor según la invención en el cartucho según la invención,

c) lisar mecánicamente los microorganismos, mediante la puesta en rotación del rotor, en el interior del cartucho, provocando esta puesta en rotación la suspensión de los medios de lisis situados en la zona de retención de los microorganismos de dicho cartucho, accionando el rotor en rotación los medios de lisis sobre los cuales se retienen los microorganismos,

d) aspirar la muestra líquida que contiene los ácidos nucleicos de dichos microorganismos liberados durante la lisis, y

e) distribuir la muestra líquida en un contenedor de recepción de los ácidos nucleicos.

Otro objeto de la presente invención se refiere a un procedimiento de extracción de los ácidos nucleicos de una muestra de tejido celular, comprendiendo dicho procedimiento las etapas que consisten en:

a) introducir la muestra de tejido celular en el cartucho en la presencia de un líquido de elución,

b) colocar el rotor según la invención en el cartucho según la invención,

c) lisar mecánicamente las células del tejido celular, mediante la puesta en rotación del rotor, en el interior del cartucho, accionando el rotor en rotación los medios de lisis contenidos en el cartucho,

d) aspirar el líquido de elución que contiene los ácidos nucleicos de las células, liberados durante la lisis, y

e) distribuir el líquido de elución en un contenedor de recepción de los ácidos nucleicos.

Por muestra tisular, se entiende cualquier muestra de tejido de origen humano o animal a partir del cual es posible extraer los ácidos nucleicos. Tal muestra puede obtenerse por biopsia, por ejemplo de un órgano, un músculo, de la piel. Estos tejidos son sanos o patológicos, especialmente tumorales.

Se debe señalar que todos los procedimientos de extracción de los ácidos nucleicos según la solicitud pueden presentar, según una variante ventajosa, una etapa suplementaria de purificación de estos ácidos nucleicos, para un tratamiento subsiguiente tal como una amplificación. Esta etapa de purificación permite la separación entre los ácidos nucleicos y los otros constituyentes celulares ampliados en la etapa de lisis. Esta etapa permite generalmente concentrar los ácidos nucleicos, y puede ser adecuada para la purificación de ADN o ARN. Ésta puede realizarse con la ayuda de partículas magnéticas. A título de ejemplo, se pueden utilizar las partículas magnéticas eventualmente revestidas de oligonucleótidos, por adsorción o covalencia (véanse en este caso las patentes US 4,672,040 y US 5,750,338), y así purificar los ácidos nucleicos que se fijan sobre estas partículas magnéticas, por una etapa de lavado. Esta etapa de purificación de los ácidos nucleicos es particularmente interesante si se desea amplificar posteriormente dichos ácidos nucleicos. Un modo particularmente interesante de estas partículas magnéticas se describe en las solicitudes de patente WO-A-97/45202 y WO-A-99/35500. Otro ejemplo interesante del método de purificación de los ácidos nucleicos es la utilización de sílice, ya sea en forma de una columna, o bien en forma de partículas inertes (Boom R. *et al.*, J. Clin. Microbiol., 1990, nº 28(3), p. 495-503) o magnéticas (Merck: MagPrep® Silica, Promega: Magnesil™ Paramagnetic partióles). Otros métodos muy difundidos radican en las resinas intercambiadoras de iones en una columna o en un formato particular paramagnético (Whatman: DEAE-Magarose) (Levison PR *et al.*, J. Chromatography, 1998, p. 337-344). Otro método muy pertinente pero no exclusivo para la invención es el de la adsorción sobre un soporte de óxido metálico (compañía Xtrana: Matrice Xtra-Bind™).

Por otra parte, en los diferentes procedimientos descritos anteriormente, todas las etapas posteriores a la reconstitución del dispositivo de lisis de microorganismos, a saber una vez que el rotor se coloque en el cartucho, pueden realizarse ventajosamente en el sistema de lisis de microorganismos y de purificación de los ácidos nucleicos.

Otro objeto de la presente invención se refiere a la utilización del dispositivo de lisis de microorganismos según la invención, para lisar las células de una muestra de tejido celular.

Otro objeto de la presente invención se refiere a la utilización del sistema de lisis de microorganismos y de purificación de los ácidos nucleicos de dichos microorganismos según la invención, para lisar las células de una muestra de tejido celular y purificar los ácidos nucleicos de las células con el fin de analizarlas.

Los microorganismos son seleccionados del grupo que comprende las bacterias, los virus, las levaduras, los mohos, los parásitos.

Las muestras a partir de las cuales están aislados los microorganismos son de origen medioambiental. Así, puede tratarse de una muestra de aire o de líquido, tal como el agua; muestreo de superficie. Las muestras pueden ser también de origen clínico, es decir cualquier muestra de origen humano o animal, apta para ser objeto de un análisis para la investigación y la identificación de un microorganismo, eventualmente patógeno.

La presencia de los ácidos nucleicos dianas puede ponerse en evidencia por la visualización de las reacciones de hibridación. Se entiende por reacción de hibridación cualquier reacción entre un ácido nucleico de captura y un ácido nucleico objetivo aislado o generado por una etapa de transcripción, de transcripción inversa, o de amplificación del tipo de NASBA (por Nucleic Acid Sequence Based Amplification en inglés) o PCR (por Polymerase Chain Reaction en inglés).

Se entiende por ácido nucleico, los oligonucleótidos, los ácidos desoxirribonucleicos y los ácidos ribonucleicos, así como sus derivados. El término oligonucleótido designa una cadena de al menos dos nucleótidos (desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, o los dos), naturales o modificados, susceptibles de hibridarse, en las condiciones apropiadas de hibridación, con un oligonucleótido al menos parcialmente complementario. Por nucleótido modificado, se entiende por ejemplo un nucleótido que comprende una base modificada y/o que comprende una modificación al nivel del enlace internucleotídico y/o al nivel del esqueleto. A título de ejemplo de una base modificada, se puede citar la inosina, la metil-5-desoxicitidina, la dimetilamino-5-desoxiuridina, la diamino-2,6-purina y la bromo-5-desoxiuridina.

Para ilustrar un enlace internucleotídico modificado, se pueden mencionar los enlaces de fosforotioato, N-alquilfosforamidato, alquilfosfonato o alquilfosfodiéster.

Los alfa-oligonucleótidos tales como aquellos descritos en FR-A-2 607 507, los LNA tales como el fosforotioato-LNA y el 2'-tio-LNA descritos en Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, Volumen 8, expedida 16, 18 de agosto de 1998, páginas 2219-2222, y los PNA que son el objeto del artículo de M. Egholm *et al.*, J. Am. Chem. Soc. (1992), 114, 1895-1897, son ejemplos de oligonucleótidos constituidos de nucleótidos cuyo esqueleto está modificado.

La visualización de las reacciones de hibridación puede efectuarse por cualquier medio de detección, tales como los medios directos o indirectos.

En el caso de la detección directa, es decir sin intermedio de marcado, se observan las reacciones de hibridación por resonancia del plasmón o por voltametría cíclica sobre un electrodo que comprende un polímero conductor.

En el caso de la detección indirecta, es decir por medio de un marcado, el marcado puede efectuarse bien directamente sobre los ácidos nucleicos diana, o bien por medio de una pareja de enlace específico de dichos ácidos nucleicos previamente marcados.

5 Se entiende por pareja de enlace específica los ácidos nucleicos dianas, cualquier pareja capaz de unirse con el ácido nucleico diana y se darán a título de ejemplo los ácidos nucleicos, los oligonucleótidos o los polinucleótidos y los sustratos enzimáticos.

10 Por marcado, se entiende la fijación de un marcador capaz de generar directamente o indirectamente una señal detectable. Una lista no limitativa de estos marcadores consiste en: las enzimas que producen una señal detectable por ejemplo por electroquímica, colorimetría, fluorescencia, luminiscencia, enzimas como la peroxidasa de Raifort (HRP), la fosfatasa alcalina (PAL), la α -galactosidasa, la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; los inhibidores de las enzimas; los cofactores de las enzimas, las partículas tales como las partículas de oro, los látex magnéticos, los liposomas; los cromóforos como los compuestos luminiscentes, colorantes, las moléculas radioactivas como el ^{32}P , el ^{35}S o el ^{125}I , las moléculas fluorescentes tales como la fluoresceína, la rodamina, los Alexa®, la umbeliferona, el luminol o las ficocianinas. En el caso de la fluorescencia, se puede tratar el producto fluorescente de un sustrato-enzima de la reacción, de una combinación del fluoróforo-extintor, de una extinción de fluorescencia o de cualquier otro sistema basado en las propiedades de la fluorescencia.

20 Los sistemas indirectos también pueden utilizarse, como por ejemplo por medio de otra pareja de ligando/anti-ligando. Los pares de ligandos/antiligandos son bien conocidos por el experto en la materia, y se pueden citar por ejemplo las parejas siguientes: biotina/estreptavidina, sucrosa/lectina, polinucleótido/complementario del polinucleótido. En este caso, es el ligando el que comprende el agente de enlace. El antiligando puede ser detectable directamente por los marcadores descritos en el párrafo anterior o puede ser detectable en sí mismo por un ligando/anti-ligando.

25 Estos sistemas de detección indirectos pueden conducir, en ciertas condiciones, a una amplificación de la señal. Esta técnica de amplificación de la señal es bien conocida por el experto en la materia, y se podrá hacer referencia a las solicitudes de patente anteriores FR-A-2 781 802 o WO-A-95/08000 de la solicitante o el artículo de J. Histochem. Cytochem 45: 481-491, 1997.

30 El marcado previo de los ácidos nucleicos dianas puede efectuarse por la incorporación directa o indirecta del marcador por una polimerasa, por una quinasa, a fin de elevarla o específica, en los extremos o por la incorporación "en el interior" de la molécula.

35 El marcado de las parejas de enlace específicas de los análisis diana es ampliamente conocida por el experto en la materia y se describe por ejemplo por Greg T. Hermanson en Bioconjugate Techniques, 1996, Academic Press Inc, 525B Street, San Diego, CA92101 USA.

40 Según el tipo de marcado del conjugado utilizado, como por ejemplo utilizando una enzima, el experto en la materia agregará los reactivos que permiten la visualización del marcado. Esta etapa corresponde al revelado. Está precedida por la utilización de un tampón de lavado que permite eliminar las fracciones de los analitos o de los elementos no introducidos en la reacción, o débilmente o no específicamente unidos, para limitar el ruido del fondo.

45 Los objetos y ventajas del dispositivo según la presente invención se comprenderán mejor a la luz del ejemplo de ninguna manera limitativo siguiente, con referencia a las figuras, en las que:

La figura 1 representa una vista en corte longitudinal del cartucho utilizado para recoger y lisar los microorganismos.

50 La figura 2 representa una vista en corte longitudinal del dispositivo de recogida de los microorganismos contenidos en el aire, según un modo particular de realización.

La figura 3 representa una vista parcial de una ampliación en corte longitudinal del dispositivo de recogida de los microorganismos tal como el representado en la figura 1.

55 La figura 4 representa una vista en perspectiva del interior del elemento superior del dispositivo de recogida de los microorganismos.

La figura 5 representa una vista parcial en perspectiva del interior del elemento superior del dispositivo de recogida en los microorganismos tal como el representado en la figura 3.

60 La figura 6 representa una vista en corte longitudinal del dispositivo de lisis de los microorganismos.

La figura 7 representa una vista en corte longitudinal del conjunto constituido del dispositivo de lisis de microorganismos y de la válvula multivías.

65 La figura 8A representa una vista en corte longitudinal parcial del sistema de lisis de microorganismos a nivel de la

válvula multivías, en una primera configuración de esta última.

La figura 8B representa una vista en corte longitudinal parcial del sistema de lisis de microorganismos a nivel de la válvula multivías, en una segunda configuración de esta última.

Un cartucho 10 representado en la figura 1 en corte longitudinal, con la forma general de un cilindro de sección transversal sustancialmente circular. El extremo superior del cilindro está libre, mientras que el extremo inferior está constituido por una pared, que presenta en su centro un orificio, en la prolongación del cual se encuentra un conducto 12 que se extiende hacia el interior de un cartucho 10. Se constata que la sección interior del conducto tiende a reducirse a medida que se aproxima a su extremidad superior.

Como se puede observar en la figura 1, la cara interna de la pared inferior 14 del cartucho 10 está inclinada, el punto más bajo de la pendiente se encuentra en contacto con el conducto 12 y el punto más elevado en contacto con la pared vertical 16 del cartucho 10. Esta pared 14 sirve de soporte a los medios de lisis 18 y constituye la zona de retención de los microorganismos. Estos medios de lisis están constituidos aquí por esferas de tamaño idéntico. Según un modo de realización preferido, estas esferas son de vidrio. Sin embargo, podrían estar constituidas de cualquier otro material equivalente, tal como el hierro. Estas esferas presentan un diámetro comprendido ventajosamente entre 200 y 800 micrómetros (μm).

Según una variante ventajosa, las esferas pueden ser de tamaños diferentes. Puede ser así particularmente apropiado utilizar una mezcla de esferas de diámetro comprendido entre 200 y 300 μm con unas esferas cuyo diámetro está comprendido entre 400 y 600 μm . Tales esferas son comercializadas por ejemplo por la compañía SIGMA bajo la referencia de Acid-washed glass beads, de 425-600 μm , Ref: G8772.

Las esferas son mantenidas en su lugar bajo la forma de una o varias capas superpuestas por medio de una capa de material gelificado 19, dispuesta preferentemente sobre las esferas. El material gelificado debe responder a varias restricciones. La primera es que debe ser inerte, para que no influya en los procedimientos que se utilizan en el interior del cartucho. La segunda es que debe tener la capacidad de disolverse en un líquido, por la utilización de lisis de los microorganismos. Tal material puede ser, por ejemplo, un gel de agarosa (Sigma Aldrich, Agarose - tipo I-B Low EEO, Ref.: A0576-25G). El material gelificado puede contener también glicerol.

Alternativamente, el material gelificado puede ser ventajosamente un medio de cultivo para los microorganismos. En efecto, los medios de cultivo gelificados se utilizan clásicamente en el campo del diagnóstico *in vitro* y esto desde hace mucho tiempo. La utilización de tal medio de cultivo presenta varias ventajas. La principal es permitir una fase de crecimiento de los microorganismos antes de realizar la lisis de estos últimos. Incluso si el dispositivo según la invención busca responder a una necesidad relacionada con la detección rápida de los microorganismos patógenos, permanece el hecho de que una fase de crecimiento de algunos minutos hasta algunas horas permitiría una multiplicación de los microorganismos, lo que tiene por efecto directo disponer de una cantidad más grande de ácidos nucleicos (lo que permite aprovecharse de los tiempos inherentes a la recuperación y a la transferencia de las muestras de aire recolectadas en las salas que deban ser controladas justo hasta el inicio del análisis propiamente dicho. Una segunda ventaja de la utilización de medios de cultivo es que estos últimos pueden ser selectivos para una o varias especies dadas. Da como resultado que la utilización de tales medios puede permitir un crecimiento y por lo tanto una detección selectiva de ciertos microorganismos patógenos en detrimento de otros microorganismos sin interés, que pueden interferir eventualmente en el análisis. Así, se puede considerar disponer de varios cartuchos diferenciados, estando cada uno adaptado a la detección de una especie específica de microorganismo.

Las dimensiones del cartucho 10 pueden ser, por ejemplo, de 8 a 16 mm para lo que es el diámetro interno, preferiblemente de 12 mm. El espesor total de las capas de las esferas está comprendido típicamente entre 1 y 2 mm, lo que corresponde a una cantidad de esferas de vidrio comprendida entre 0,1 y 1 gramo, preferentemente 0,3 gramo.

El cartucho 10 está realizado ventajosamente utilizando una técnica de moldeo por inyección. El material utilizado es por ejemplo el polipropileno, poliestireno, policarbonato, ciclo-olefinas cíclicas (CoC) o PMMA; siendo preferido el policarbonato.

El dispositivo de recogida de los microorganismos 20 se representa en la figura 2. Este dispositivo está constituido de un módulo de recogida del aire en el inferior del cual se coloca el cartucho 10. Este módulo de recogida del aire está compuesto de un elemento superior 22 y un elemento interior 24.

El elemento superior 22 es de forma generalmente cilíndrica. Se representa también en las figuras 4 y 5, en perspectiva. El extremo inferior de este cilindro está libre, mientras que el extremo superior está parcialmente obturado por una pared horizontal 26. Esta pared 26 presenta en su centro un orificio que se prolonga hacia el interior del elemento superior 22, por un conducto 28. Esta parte constituye en efecto, el conducto de admisión de aire hacia el interior del módulo de recogida del aire 20. Según un modo particular, este conducto de admisión del aire puede conectarse a una canalización del circuito de reciclaje del aire por cualquier medio apropiado. En la base de este conducto y en el centro de este último se encuentra colocado un cono 30 en forma de ojiva. Este cono 30 es solidario con la pared del conducto 28 mediante los álabes 32. Estos álabes 32 son muy visibles en las figuras 4 y 5. En el modo

tal como se presenta en estas figuras, están en un número de tres. Su número sin embargo puede variar. Tal como se representa en la figura 2, el papel desempeñado por el conjunto del cono 30 - álabes 32 es el de crear en la base del conducto 28, una perturbación del nuevo flujo de aire que penetra en el dispositivo de recogida de los microorganismos, de tal modo que este flujo perturbado entre en contacto con el material gelificado de la zona de retención de los microorganismos, provocando un ahuecamiento de esta última. El ahuecamiento permite mejorar de manera significativa la captura de los microorganismos contenidos en el aire.

Tal como se representa en las figuras 2 y 4, el elemento superior 22 comprende también tres pasadores centradores 34 y tres pasadores de bloqueo 38. Los pasadores centradores 34 están destinados a asegurar un centrado correcto del cartucho 10 con respecto al elemento superior 22. Los pasadores de bloqueo 38 aseguran un bloqueo del cartucho en la posición centrada, sobre el elemento superior 22. Esto está bien representado en la figura 2.

El elemento superior 22 comprende en su parte baja un saliente y una ranura realizados sobre todo el perímetro de la pared vertical y destinados a facilitar la solidarización del elemento superior 22 y del elemento inferior 24.

El elemento interior 24 es también de forma generalmente cilíndrica. El extremo superior de este cilindro está libre, mientras que el extremo inferior está parcialmente obturado, por una pared horizontal 40 que comprende en su parte central aberturas de evacuación 42 del aire, sustancialmente cilíndricas. El elemento inferior 24 comprende además un pasador 44 de soporte y de posicionamiento del cartucho 10. El elemento inferior 24 se posiciona entonces sobre el elemento superior 22. El cartucho 10 se encuentra colocado en apoyo sobre el elemento inferior 24, por el intermedio del pasador 44. En efecto, cuando el cartucho 10 se colcoa en el elemento bajo 24, el elemento 44 entra en el interior del conducto 12 del cartucho, colocando y bloqueando así este último en una buena posición.

El extremo superior de la pared circular vertical del elemento inferior 24 puede comprender, sobre su cara inferior, un borde realizado sobre todo el perímetro de esta pared. Este borde provoca la cooperación con el saliente y la ranura llevados en el elemento superior 22 de manera que se asegure el bloqueo entre el elemento superior 22 y el elemento inferior 24. El intercalamiento entre los elementos superior 22 e inferior 24 está permitido por una forma complementaria de sus extremos respectivamente inferior y superior. Es importante que esta solidarización sea reversible.

Un medio de solidarización alternativo de los elementos 22 y 24 puede ser una solidarización por enroscado de un elemento sobre otro. Para este fin, el extremo de la pared de uno de los elementos 22 o 24 puede llevar un roscado y el extremo de la pared del segundo elemento un aterrajado correspondiente.

Lo importante es que el medio de recogida este cerrado de manera hermética, para evitar que entre cualquier parásito del aire.

Según un modo particular de utilización del medio de recogida del aire, el extremo inferior del conducto de evacuación del aire 22 puede conectarse a una bomba de aspiración del aire (no representada) o cualquier medio de bombeo equivalente. Esta bomba permite aspirar el aire ambiente en el interior del medio de recogida del aire, cuando se desea por ejemplo realizar un análisis del aire ambiente en un medio ambiente determinado, tal como una instalación hospitalaria, una pieza de producción de los productos farmacéuticos o de productos agroalimentarios. Para este fin, puede ser preferible colocar un medio de bombeo que funcione a fin deudónoma o continua.

El módulo de recogida del aire 22 y 24, puede tener por ejemplo un diámetro exterior comprendido entre 10 y 40 mm, preferentemente 20 mm. El diámetro interno del conducto de admisión del aire es por ejemplo de 6 mm.

Este módulo de recogida del aire 10 puede realizarse ventajosamente de un material capaz de esterilizarse, en particular por tratamiento en autoclave. Puede ser así un metal, tal como de aluminio o de acero. Puede también ser de polímero tal como el policarbonato, las ciclo-olefinas cíclicas (CoC) o el PMMA.

Cuando la circulación del aire en el dispositivo de recogida de los microorganismos se pone en funcionamiento, el camino seguido por estos últimos se representa por las flechas en la figura 2. Así, se constata que el aire entra en el dispositivo de recogida de los microorganismos por el conducto de admisión del aire 28. El conducto 12 del cartucho 10 se inserta parcialmente en el interior del conducto de admisión del aire 28, más particularmente en el cono 30. El flujo de aire en la base del conducto 28 se transforma, en el vértice del cono 30, en un flujo periférico. Por otra parte, la presencia del cono 30 impide también que el aire penetre en el conducto 12. Como se ha descrito anteriormente, un flujo de aire alterado llega sobre el material gelificado 19 (esferas 18 no representadas), generando en este lugar la retención por el impacto de los microorganismos transportados en el flujo de aire. Tal proceso es así relativamente similar a aquel que se desarrolla en los aerobiocoletores.

Por su parte, el aire sigue su ruta aspirado por el medio de bombeo. Sube a lo largo de la cara interna de la pared vertical 16 del cartucho 10. Vuelve a bajar a lo largo de la cara externa de esta misma pared y se escapa del módulo de recogida del aire 20 por las aberturas de evacuación 42.

El caudal del aire recogido en el módulo de recogida del aire 10 puede estar comprendido, por ejemplo, entre 20 y 100

litros/minuto (l/min). Ventajosamente, es de 50 l/min.

Una vez que la etapa de retención/concentración de los microorganismos en el interior del cartucho se haya realizado, esta última se extrae del módulo de recogida del aire por la desolidarización de los elementos superior 22 e inferior 24 de dicho medio, ya sea por desencajamiento, o por desenroscado.

En esta etapa, se ofrece la oportunidad de incubar el cartucho en una estufa a 37°C, si se desea proceder al cultivo de los microorganismos concentrados en el cartucho. Como ya se ha explicado antes, esta incubación dura generalmente algunas decenas de minutos hasta algunas horas, para no alargar de manera muy importante la duración del análisis. Sin embargo, si la obtención de un resultado de análisis no tiene nada de urgente, puede contemplarse incubar el cartucho por una duración más larga y más adecuada con las restricciones del crecimiento bacteriano, es decir aproximadamente veinticuatro horas.

De manera similar, se puede considerar también almacenar el cartucho en un entorno adaptado para este almacenamiento, tal como una cámara de refrigeración, si se desea aplazar el análisis.

Según una variante de la invención, el cartucho 10 puede proporcionarse directamente colocado en el módulo de recogida del aire. Este tipo de presentación tiene la ventaja de evitar al usuario tener que colocar el cartucho en el módulo de recogida de aire y así reducir también los riesgos de contaminación durante esta etapa. Es particularmente ventajoso en el caso de esta figura, que el módulo de recogida del aire sea producido del mismo material que el cartucho, es decir de polipropileno, policarbonato o PMMA. Una fabricación por moldeo de inyección está entonces particularmente adaptada.

Cuando se realiza la recogida de los organismos, incluso la incubación, el cartucho 10 está solidario con un rotor 50 a fin de constituir el dispositivo de lisis de los microorganismos, tal como se representa en la figura 6. Para este fin, el rotor 50 se inserta en el cartucho 10 por el extremo libre de este último, según un movimiento de traslación vertical.

El rotor 50, representado en un corte longitudinal en la figura 6, comprende un cuerpo generalmente de forma cilíndrica de sección circular. El cuerpo presenta en la parte superior de su pared exterior, un collarín 52 que tiene por función asegurar la estanqueidad líquida del conjunto de cartucho 10 - rotor 50 cuando este último se inserta completamente en el cartucho 10, viniendo e apoyo sobre el extremo superior de la pared vertical del cartucho 10.

Para reforzar la estanqueidad, una sobrecubierta 54 puede fijarse sobre el cartucho 10 por cualquier medio apropiado de manera que se mantenga al rotor 50 solidario con el cartucho. Por ejemplo, la sobrecubierta 54 puede fijarse por encajamiento o por enroscado. La cubierta es de una forma sustancialmente anular y se encaja sobre la parte alta del rotor que constituye el conducto ciego 56, dispuesto en el rotor. En el extremo superior de este conducto ciego, están realizadas en la pared dos ranuras 57, diametralmente opuestas. Estas ranuras tienen por función recibir el extremo de un eje de transmisión 90 de un medio de accionamiento 92 del rotor en rotación, tales como se representan en las figuras 8A y 8B. El extremo de este eje presenta así una forma complementaria de estas ranuras, en forma de una nervadura que se insertará en estas ranuras. El eje de accionamiento puede ser aquel de un motor eléctrico. Alternativamente, puede ser una parte de un dispositivo de puesta en rotación manual.

Como se representa en la figura 6, el rotor 50 presenta, en su parte inferior, unas formas exteriores perfectamente complementarias de las formas interiores del cartucho 10. Da como resultado que el rotor 50 se posiciona perfectamente en el interior del cartucho 10, el conducto 12 desempeña un papel de una guía que se inserta en una cavidad 58, dispuesta en la base del rotor 50. Esta cavidad 58 es de forma sustancialmente cilíndrica de sección cilíndrica y presenta un extremo superior de forma sustancialmente cónica. El posicionamiento del rotor 50 se produce hasta que su pared inferior 59 se encuentre apoyada sobre el conjunto constituido por las esferas 18 y el material gelificado 19.

El rotor 50 y la sobrecubierta 54 se realizan ventajosamente del mismo material polimérico que el cartucho, es decir de polipropileno, policarbonato o PMMA. De manera preferible, estas piezas se realizan por moldeo de inyección de policarbonato transparente (Makrolon® 2858, Bayer).

El conjunto de cartucho 10 - rotor 50 - sobrecubierta 54 constituye por lo tanto el dispositivo de lisis de microorganismos 60 según la invención y será denominado dispositivo de lisis *infra*.

Una vez que el dispositivo de lisis está constituido, se coloca sobre una válvula de 4 vías, tal como la representada en la figura 7. Esta válvula 70 comprende una primera vía 701 destinada a recibir el dispositivo de lisis 60. La conexión de dicho dispositivo sobre la válvula se hace por la base del conducto 12 del cartucho 10. La segunda vía comprende un orificio de conexión 702, destinado a conectarse a un primer medio de aspiración-expulsión, parte del sistema de lisis de los microorganismos y de purificación de ácidos nucleicos, según la invención. Ventajosamente, este medio de aspiración/expulsión es una bomba, conectada también al recipiente que contiene la solución tampón de elución. Tal bomba se representa esquemáticamente en las figuras 8A y 8B. Su funcionamiento será explicado a continuación. La tercera vía comprende un orificio de conexión 703 sobre el cual está fijado un cono desechable 72. Por último, la cuarta vía está constituida por un segundo medio de aspiración-expulsión 704. Este segundo medio es una jeringa que forma

un bloque con la válvula. Esta jeringa 704 cooperará con un medio de accionamiento de traslación que forma parte del sistema de lisis de los microorganismos y de purificación de los ácidos nucleicos según la invención y destinado a mover el pistón de dicha jeringa. Por último, la válvula 70 comprende un eje central 74 que comprende dos vías fluidicas. Tal como se representa en la figura 7, estas dos vías aseguran la conexión respectivamente entre, por una parte el dispositivo de lisis 60 y el orificio de conexión 702; y por otra parte, entre la jeringa 704 y el orificio de conexión 703 sobre el cual está fijado el cono desechable 72. El eje 74 puede ser movido en rotación de un cuarto de la vuelta, de tal modo que las conexiones fluidicas se cambien. El orificio de conexión 702 se encuentra conectado al orificio de conexión 703 y el dispositivo de lisis 60 se encuentra conectado a la jeringa 704.

El conjunto constituido por el dispositivo de lisis 60 y la válvula 70 constituye la parte consumible. Se coloca después sobre el sistema de lisis de microorganismos y de purificación de los ácidos nucleicos. Se trata de un mecanismo que comprende tres funciones principales distintas: una función de lisis, una función de transferencia del líquido y una función de purificación. Estas funciones se describen a continuación.

La colocación del conjunto del dispositivo de lisis 60 - válvula 70 en el sistema de lisis de microorganismos y de purificación de los ácidos nucleicos, se realiza de la siguiente manera. En primer lugar, un sitio está destinado para la colocación de este conjunto. Este sitio se caracteriza por el hecho de que comprende medios de fijación de la válvula 70. Estos medios pueden estar constituidos por ejemplo por el brazo o mandíbulas entre las cuales la válvula se inserta de manera forzada.

Una vez que el conjunto del dispositivo de lisis 60 - válvula 70 se coloque, se realizan las diferentes conexiones con la válvula. Esto se representa esquemáticamente en las figuras 8A y 8B. Así, la primera conexión se hace por el orificio de conexión 702 de la válvula 70. Se trata de una conexión *in fine* con el medio de aspiración-expulsión 80 que se encuentra permanentemente sobre el mecanismo que se conecta al orificio de conexión 702. Como se ha explicado antes, este medio de aspiración-expulsión 80 se presenta preferentemente bajo la forma de una bomba fija, parte integrante del mecanismo no representado en su totalidad en las figuras 8A y 8B. De manera más precisa, la bomba 80 se conecta a su vez a una válvula 82 colocada también permanentemente sobre el mecanismo. Esta válvula fija 82 está por otra parte en conexión fluidica, por una parte con la válvula 70 a través del orificio de conexión 702, y por otra parte con un depósito 84 que contiene una solución tampón denominada de elución. La válvula fija 82 permite así conectar la bomba fija 80, ya sea a la válvula 70, o bien al depósito 84, según su posición.

El conjunto de dispositivo de lisis - válvula se conecta también al árbol de transmisión 90 del medio de accionamiento en rotación 92 del rotor del dispositivo de lisis. Cabe señalar que una vez que esta conexión se realiza, el árbol de transmisión 90 ejerce sobre el rotor una presión según un componente vertical conforme a la flecha A en la figura 8A, de tal manera que esta presión se transmite desde el rotor sobre el conjunto constituido por las esferas 18 y el material gelificado 19.

La tercera conexión entre el conjunto del dispositivo de lisis - válvula y el mecanismo consiste en la conexión entre la jeringa 704 de la válvula 70 y el medio de accionamiento 94 de la jeringa. Este medio de accionamiento es un medio de accionamiento de traslación, tal como un conjunto constituido por un motor paso a paso y un tornillo sin fin y que permite así extraer, o bien empujar el pistón de la jeringa 704, y así, o bien aspirar un líquido hacia el interior de la jeringa, o bien expulsar un líquido contenido en la jeringa.

Por último, la cuarta conexión entre el conjunto del dispositivo de lisis - válvula y el mecanismo se refiere al medio de accionamiento en rotación con el eje 74 de la válvula 70. Este medio no está representado en las figuras 8A y 8B. Se trata de un motor capaz de hacer girar un eje de transmisión sobre sí mismo, este eje de transmisión se conecta al eje 74 de la válvula 70.

Durante la utilización del protocolo de lisis de microorganismos recogidos en el cartucho 10, la válvula 70 está configurada de tal manera que el dispositivo de lisis 60 esté en conexión fluidica con el conjunto constituido por la bomba 80 y la válvula fija 82. La jeringa 704 está entonces en conexión fluidica con el orificio de conexión 703 sobre el cual está fijado el cono desechable. La válvula 82 está configurada inicialmente de tal manera que la bomba 80 este en conexión fluidica con el depósito 84 de la solución tampón de elución. La bomba 80 aspira entonces una cantidad determinada de la solución tampón de elución. La válvula fija 82 es cambiada entonces de configuración de tal modo que la bomba 80 llegue a conectarse fluidicamente con el dispositivo de lisis 60 a través de la válvula 70. La bomba 80 expulsa entonces el volumen de la solución tampón de elución extraída, que se desplaza justo al dispositivo de lisis 60 y más particularmente en el espacio intersticial entre la pared interna del cartucho 10 y la pared externa del rotor 50 (véase la figura 6). La solución tampón de la elución humedece entonces el material gelificado 19 y las esferas 18. El material gelificado 18 se disuelve entonces por la acción conjugada de la solución tampón de elución y la colocación en rotación lenta del rotor 50. Las esferas se encuentran entonces en suspensión en este último. Esta colocación en suspensión, acoplada con el efecto de la presión ejercida por el rotor y la puesta en rotación de este último, provoca el desplazamiento de una fracción de las esferas 18 en el espacio intersticial entre la pared interna vertical del cartucho 10 y la pared externa vertical del rotor 50. Se debe señalar que este espacio intersticial presenta preferiblemente una longitud comprendida entre 600 y 800 μm . Esta anchura está relacionada directamente con el diámetro de las esferas 18 utilizadas. Para este efecto, las esferas, a su vez, deben poder circular fácilmente en este espacio y poder ser puestas en rotación por la puesta en rotación del rotor 50. Para este fin, la pared vertical externa del rotor puede

presentar una superficie rugosa, lo que facilita la puesta en rotación de las esferas.

Una vez que las esferas están repartidas en la zona de retención del cartucho y a lo largo de la pared vertical del rotor, este último puede entonces insertarse completamente en el cartucho.

5 Por supuesto, los microorganismos retenidos tanto sobre el material gelificado como sobre las esferas se transfieren hacia los espacios intersticiales del mismo modo que las esferas 18, por el flujo de la solución tampón de elución.

10 Una vez que las esferas 18 están repartidas a lo largo de la pared vertical externa del rotor 50, se inicia la etapa de lisis propiamente dicha. El rotor 50 es entonces puesto en rotación gracias al medio de accionamiento de la rotación/motor 92 y por medio del árbol de transmisión 90. Sin embargo, se puede considerar poner en rotación el rotor de manera manual, en un protocolo simplificado que no utiliza el sistema de lisis de los microorganismos y de la purificación de los ácidos nucleicos.

15 A título de ejemplo, los valores de la velocidad de rotación pueden estar comprendidos entre 200 y 3000 rpm. Preferiblemente, el rotor se pone inicialmente en rotación a una velocidad lenta de 200 rpm para los fines de distribución y de homogeneización de las esferas y de la solución tampón de elución hacia el espacio intersticial. Esta colocación en rotación lenta dura aproximadamente 15 segundos.

20 Después, la velocidad de rotación aumenta para alcanzar un valor comprendido entre 1000 y 3000 rpm durante un período de tiempo comprendido entre 1 y 5 minutos. Es durante este período que se efectúa la lisis de los microorganismos recogidos eventualmente en el aire.

25 Es muy evidente que la elección de la velocidad y el tiempo de rotación del rotor depende del tipo de los microorganismos que se desea lisar.

30 Durante esta etapa, las esferas 18 se colocan en rotación alrededor de su eje de simetría por fricción contra la superficie externa vertical del rotor y la superficie interna vertical del cartucho. Esta doble rotación provoca la lisis mecánica de los microorganismos que se encuentran capturados entre las esferas 18 y las superficies respectivas del rotor o del cartucho. Esto conduce a una liberación de los ácidos nucleicos en la solución tampón de elución.

35 Una vez terminada la etapa de lisis y liberados los ácidos nucleicos, la solución tampón de elución que contiene los ácidos nucleicos debe aspirarse. La válvula 70 cambia entonces de configuración por la puesta en rotación de su eje 74, de tal modo que el dispositivo de lisis 60 y la jeringa 704 se encuentran en comunicación fluidica, tal como se representa en la figura 8B. El pistón de la jeringa 704 se pone entonces en traslación gracias al medio de accionamiento 94, para aspirar la solución tampón de la elución que contiene los ácidos nucleicos hacia el interior de la jeringa 704. Esta etapa de aspiración se desarrolla entonces de modo que el rotor 50 se mueva siempre en rotación, pero a una velocidad baja (aproximadamente 200 rpm).

40 La válvula 70 vuelve a pasar entonces en su configuración inicial, tal como se representa en la figura 8A, de tal modo que la jeringa 704 esté en comunicación fluidica con el orificio de conexión 703. El tampón de elución que contiene los ácidos nucleicos está entonces listo para colocarse en un tubo a través del cono 72, para los fines de purificación de los ácidos nucleicos. En efecto, el lisado contenido dentro de la solución tampón de elución contiene efectivamente los ácidos nucleicos pero también todos los desechos celulares.

45 Para ello, un tubo de análisis 96 es llevado cerca del cono 72. Ventajosamente, el mecanismo dispone de un soporte para recibir uno de tales tubos. En este caso, tal soporte puede unirse a un brazo que puede moverse entre una posición baja o a una posición de reposo, en la cual el tubo puede insertarse en el soporte y una posición elevada o una posición de trabajo en la cual el tubo está cerca del cono 72 (tal como se representa en las figuras 8A y 8B). Por supuesto, es preferible que el cono 72 penetre en el tubo 96. El tubo 96 comprende un tampón denominado de lisis y de partículas de sílice magnético, necesarias para la purificación de los ácidos nucleicos. Tales partículas tienen un diámetro comprendido entre 1 y 3 μm . Por otra parte, un tabique pre-perforado (no representado) se coloca a nivel del orificio del tubo 96 para evitar cualquier contaminación de este último. Durante el montaje del tubo 96, el cono 72 atraviesa el tabique por la pre-perforación. El tampón de elución con el lisado se distribuye entonces en el tubo de análisis. En esta etapa, es preferible utilizar la jeringa 704 para realizar varias aspiraciones/expulsiones, y esto para homogeneizar el lisado con la solución tampón de lisis y las partículas magnéticas. La función de la solución tampón de lisis es la de estabilizar los ácidos nucleicos (protección contra las nucleasas) y ajustar el pH a un valor óptimo para la fase de captura.

60 Si la mezcla es homogeneizada correctamente, el tubo puede colocarse entonces en reposo para permitir la captura pasiva de los ácidos nucleicos por las partículas magnéticas. El tiempo de la colocación en reposo puede ser por ejemplo de 2 minutos. En el caso en donde la homogeneización no sea correcta o en la ausencia de la homogeneización, la captura de los ácidos nucleicos va a ser realizada a fin delectiva. En efecto, el tubo y las partículas magnéticas que el mismo contiene, van a someterse a los campos magnéticos de orientaciones diferentes. Para hacer esto, el tubo se coloca en su posición baja luego se pone en contacto con los imanes a través del brazo que lo lleva. Estos imanes pueden colocarse sobre dos placas paralelas solidarias con el brazo que comprende el tubo. Estas dos

placas son movibles en traslación horizontal a través de un medio de desplazamiento ad hoc y se desplazan así de manera que el tubo se encuentre entre dichas placas. El número de imanes sobre cada placa es variable. Es ventajoso que los imanes estén a alturas diferentes sobre las placas. De la misma manera, es importante que los imanes sobre una placa no se coloquen en el frente de los imanes sobre la otra placa, sino que se desplacen relativamente en el sentido del desplazamiento del tubo según una secuencia determinada. Así, en el momento del desplazamiento de las placas, el tubo se somete más y más de manera gradual, ya sea al campo magnético de un imán sobre la primera placa, o al campo magnético de un imán sobre la segunda placa. Estos campos pueden colocarse a una altura inferior diferente relativamente en la ruta seguida por las placas. En seguida que las partículas magnéticas, que se encuentran atraídas por estos imanes, se ponen en grupos, y que estos grupos se llevan para que se desplacen hacia el tubo, en función de la atracción ejercida por los imanes y sobre todo de su posición con respecto al tubo. Se debe señalar que esta colocación relativa de los imanes con respecto al tubo de análisis puede obtenerse también por un desplazamiento del tubo según un eje vertical; en tal caso, los imanes se colocan todos a la misma altura y según una secuencia determinada. En el caso de una captura activa de los ácidos nucleicos, el tiempo destinado a la captura será más importante (entre 4 y 6 minutos).

Una vez que la captura de los ácidos nucleicos ha sido efectuada, una o varias etapas sucesivas de lavado son llevadas a cabo. Para este fin, el tubo se coloca enfrente de un imán en su posición elevada a fin de que se acumulen las partículas magnéticas que comprenden los ácidos nucleicos en la parte elevada del tubo contra la pared vertical. El tubo es llevado entonces hacia la posición elevada de tal modo que el cono 72 entre en contacto con el líquido contenido en el tubo. La aspiración del líquido contenido en el tubo se hace entonces en la jeringa 704, por el accionamiento de su pistón. La jeringa 704 sirve entonces de recipiente de almacenamiento de los desechos líquidos aspirados en el tubo. Para proceder al lavado de los ácidos nucleicos, la válvula 74 se coloca en la configuración de la cual el orificio de conexión 702, y por tanto la bomba 80, esté en comunicación fluidica con el orificio de conexión 703. La válvula 82 cuando se coloca en su posición permite la aspiración de la solución tampón de elución por la bomba 80. El volumen de la solución tampón de elución aspirada es por ejemplo de 300 µl. La posición de la válvula 82 se modifica enseguida para permitir que la bomba 80 distribuya la solución tampón de la elución en el tubo 96. Para asegurar un lavado óptimo, el tubo se vuelve a bajar hacia su posición baja y un desplazamiento de las placas que comprenden los imanes es de nuevo realizada para optimizar los intercambios entre las partículas y la solución tampón de la elución. Las placas son susceptibles de efectuar varias idas y venidas y por esto, a una velocidad de paso variable según las necesidades. La aspiración de la solución tampón de elución contenida en el tubo se realiza enseguida por medio de la jeringa 704, tal como se describió anteriormente. Las nuevas etapas de lavado pueden ser realizadas eventualmente de manera idéntica. Se debe señalar que el pistón de la jeringa 704 se acciona como una compensación, de tal modo que la jeringa 704 se llene más y más de manera gradual con el líquido aspirado hacia el tubo de análisis, que cuando se trata de la solución tampón de lisis o de la solución tampón de elución utilizada para los lavados. Una vez que los ácidos nucleicos han sido transferidos hacia el tubo de análisis, la jeringa 704 es devuelta enseguida al papel únicamente de almacenamiento de los desechos líquidos, lo que representa un interés considerable. Por otra parte, se va a señalar que la bomba 80 no sirve más que para la distribución de la solución tampón de la elución y que no está jamás en contacto con la materia "contaminado": Este aspecto es también importante particularmente sabiendo que la bomba 80 y la válvula 82 descansan permanentemente sobre el mecanismo, contrariamente a la jeringa 704 que es una parte integrante de la válvula 74, que para una aptitud de uso único.

Una vez que el lavado de los ácidos nucleicos ha sido realizado, la última aspiración de la solución tampón de elución en el tubo 72 no es más que parcial. En efecto, un volumen determinado de la solución tampón de elución es conservada en el tubo y constituye el volumen de elución en el cual los ácidos nucleicos van a eluirse, es decir disociados de las partículas magnéticas. El volumen de elución puede variar entre 5 y 150 µl, el mismo es preferentemente de 25 o de 40 µl. Para esta última aspiración, un grupo de partículas magnéticas es formado en la parte baja del tubo, poniendo este último enfrente de un imán en una posición baja. La aspiración se hace por el contrario sobre la superficie del líquido y esto para evitar cualquier aspiración de las partículas.

En el volumen restante, se procede entonces a la elución de los ácidos nucleicos. Para hacer esto, el tubo se calienta a 75°C con la ayuda de un módulo de calentamiento, integrado al soporte del tubo, hasta lograr una temperatura de 65°C en el líquido durante 5 minutos aproximadamente. De manera simultánea a la etapa de calentamiento, el tubo se somete a los imanes situados en su posición baja, para favorecer la elución.

Una vez que los ácidos nucleicos han sido purificados y eluidos en el volumen de elución, los mismos pueden amplificarse para el análisis. Para esto, todo o una parte del volumen de elución debe ponerse en contacto con la solución tampón llamada de acondicionamiento de la amplificación (40 mM Tris HCl, pH 8.5, 12 mM MgCl₂, 70 mM KC1, 5 mM ditiotritol, 15 % v/v DMSO, 1 mM de dNTP, 2 mM de cada NTP, 0,2 µM de cebadores (primers), 0,1 µM de balizas moleculares (beacons molecular). Esta puesta en contacto se puede efectuar según dos protocolos diferentes en función de las funcionalidades disponibles sobre el mecanismo.

Según un primer protocolo, la elución y el acondicionamiento de la amplificación se hace en dos tubos diferentes. En este caso, es necesario extraer, en el tubo de análisis, una fracción determinada del volumen de la elución que contiene los ácidos nucleicos purificados. Esta fracción se distribuye enseguida hacia un segundo tubo en el cual se va a realizar el acondicionamiento de la amplificación y que contiene previamente, la cantidad necesaria de la solución

tampón de acondicionamiento de la amplificación. Este tubo será transferido enseguida hacia el instrumento en el cual se va a desarrollar la amplificación de los ácidos nucleicos. La extracción de la fracción del volumen de la reacción es efectuada entonces a través de la bomba fija 80. En este caso, las válvulas 70 y 82 podrían haber sido configuradas de manera que permitan la comunicación fluidica entre la bomba 80 y el orificio de conexión 703. El tubo de análisis se coloca en su posición elevada de tal modo que el cono se remoje en el volumen de elución. La fracción es aspirada entonces por la bomba 80. Se requiere que esta bomba 80, y más generalmente el circuito del fluido utilizado por la fracción del volumen de elución extraído, no haya sido puesto en contacto durante todo el protocolo de lisis y de purificación más que con la solución tampón de elución. Ninguna contaminación de la fracción que va a servir para la amplificación de los ácidos nucleicos, es posible así. Una vez que esta fracción ha sido extraída, el tubo de análisis puede ser reemplazado por el tubo para el acondicionamiento de la amplificación. Para este fin, el tubo de análisis se hace bajar hacia su posición baja, de manera que se permita su retracción del soporte y la puesta en su lugar del tubo de acondicionamiento de la amplificación. Este tubo es montado entonces en su posición elevada de tal modo que el cono penetre en el tubo y la fracción del volumen de elución se distribuya entonces a través de la bomba 80.

Alternativamente, puede ser provisto en el mecanismo, un módulo específico para la gestión y el transporte del tubo de acondicionamiento de la amplificación.

Este último protocolo presenta la ventaja de evitar que las partículas de sílice entren en contacto con la solución tampón de acondicionamiento de la amplificación. En efecto, ya se sabe que tales partículas pueden inhibir las reacciones de amplificación de los ácidos nucleicos.

Según un segundo protocolo, la puesta en contacto de la solución tampón de acondicionamiento de la amplificación y del volumen de elución se hace directamente en el tubo de análisis, en tal caso, la solución tampón de acondicionamiento de la amplificación se añade en el tubo de análisis. Esta adición se puede hacer ya sea manualmente, o a fin deautomática. En este caso, el mecanismo debe estar provisto permanentemente en un segundo sistema de distribución, es decir un recipiente que contiene la solución tampón de acondicionamiento de la amplificación, una jeringa que permite la aspiración y la expulsión de dicha solución tampón, una válvula equivalente a la válvula 82 y una aguja o cono aptos para atravesar el tapón colocado sobre el tubo de análisis.

Sea cual sea el protocolo utilizado, puede ser ventajoso hacer salir previamente los grupos de partículas de sílice hacia el exterior ya sea del volumen de elución solo, o de la mezcla del volumen de elución solución tampón de acondicionamiento de la amplificación contenido en el tubo de análisis, antes de extraer la fracción que servirá *in fine* para hacer la amplificación. Esto se puede hacer sometiendo el tubo a una imantación por un imán situado en una posición elevada.

Por otra parte, el conjunto de los sistemas y dispositivos según la invención y descritos antes están adaptados para permitir un rastreo completo a lo largo de los protocolos de lisis de los microorganismos y de la purificación de los ácidos nucleicos. En efecto, en primer lugar, todos los elementos consumibles (el cartucho, el rotor, la válvula multivías, los tubos) son identificados con medios de identificación *ad hoc* (códigos de barras ID o 2D, etiquetas RFID, etc.). Por otra parte, en el caso en donde la recogida de los microorganismos se hace a través de un medio de aspiración del aire, este último debe poder disponer de un medio de comunicación inalámbrico que permite comunicar con el sistema de lisis de los microorganismos y de purificación de los ácidos nucleicos. Tales medios de comunicación inalámbricos son por ejemplo sistemas Wifi (norma 802.11b), Bluetooth (norma 802.15) o ZigBee (norma 802.15.4). Los datos susceptibles de ser transferidos por estos sistemas de conexión inalámbricos pueden conectarse, por ejemplo, en los lugares (pieza/punto de recogida), a las condiciones de extracción (tiempo, caudal, higrometría, temperatura, presión atmosférica), para la identificación del operador y por supuesto de los elementos de identificación de los elementos consumibles.

El dispositivo y los sistemas según la invención se hace que se adapten también para el análisis de las muestras clínicas, tales como las muestras de sangre entera o de las biopsias de tejido. En este caso, el cartucho se utiliza sin un módulo de recogida del aire. En el caso de una muestra líquida tal como la de la sangre entera, la misma se coloca en el cartucho, luego este último es combinado por el rotor con la cubierta para constituir el dispositivo de lisis de los microorganismos. Estos últimos se colocan enseguida sobre el mecanismo, para asegurar la lisis de los microorganismos y la recuperación de los ácidos nucleicos. En el caso de las biopsias de los tejidos, los cuales se cortan previamente en cortes de algunos milímetros luego se colocan en el cartucho, que después se combinan con el rotor con la tapa para constituir el dispositivo de lisis de los microorganismos. Estos últimos se colocan después en el mecanismo, para asegurar la lisis de las bacterias y la recuperación de los ácidos nucleicos.

Ejemplos

Ejemplo 1: Protocolo de referencia:

- Preparación de consumibles:

- preparación del cartucho:

El cartucho se llena con una cantidad determinada de las esferas de vidrio y del gel de agarosa:

- 0,3 a 0,45 g de esferas de vidrio (diámetro: 420-600 μm)

5 - composición del gel: 1 % de agarosa - 1 % de glicerol.

El volumen de la solución tampón de elución utilizada para realizar la lisis de los microorganismos es de aproximadamente 300 μl .

10 * Preparación del tubo de análisis:

El tubo de análisis colocado en el mecanismo está destinado a recuperar el lisado, se llena con 30 μl de partículas de sílice magnéticas y de 200 μl de la solución tampón de lisis (tiocianato de guanidinio).

15 - Parámetros de lisis:

Tiempo de lisis: 4 minutos

Velocidad de rotación del rotor: 200 rpm (velocidad lenta); 2000 rpm (velocidad rápida).

20

- Parámetros de lisis:

Aspiración del lisado a partir del cartucho en la jeringa de la válvula multivías:

25 Volumen de aspiración de la jeringa = 1000 μl

Velocidad de aspiración de la jeringa = 70 mms^{-1}

Tiempo de rotación del rotor durante la aspiración = 9 s

30

Velocidad de rotación del rotor durante la aspiración = 200 rpm

Distribución del lisado de la jeringa de la válvula multivías hacia el tubo de análisis:

35 Volumen de aspiración de la jeringa de la válvula multivías = 1000 μl

Velocidad de aspiración de la jeringa = 70 mms^{-1}

- Parámetros de purificación de los ácidos nucleicos:

40

La purificación está compuesta de 3 etapas:

- el aislamiento de los ácidos nucleicos

45 el lavado con la solución tampón de elución (3 veces)

la elución en la solución tampón de elución (pH 8,5).

Después de la transferencia del lisado hacia el tubo de análisis (0,5 ml), este último contiene 30 μl de las esferas de sílice, 200 μl de la solución tampón de lisis y 120-150 μl del lisado.

50

Dos tipos de oscilaciones de las partículas de sílice se obtienen con la ayuda de los imanes:

• Las oscilaciones elevadas que se encuentran entre los imanes en la posición elevada

55

• Las oscilaciones bajas que se encuentran entre los imanes en la posición baja

Las oscilaciones elevadas se utilizan para realizar la captura de los ácidos nucleicos por las partículas magnéticas, pero también para las etapas de lavado (eliminación del sobrenadante). Las oscilaciones bajas se utilizan para la etapa de elución y se combinan durante el calentamiento del tubo.

60

Parámetros de captura de los ácidos nucleicos:

Velocidad de oscilación = 5 mms^{-1}

65

Número de oscilaciones = 112

Amplitud de la oscilación = 27 mms^{-1}

5 Parámetros de lavado:

Velocidad de oscilación = 5 mms^{-1}

Número de oscilaciones = 10

10 Amplitud de la oscilación = 27 mms^{-1}

Parámetros de eliminación del sobrenadante:

15 Aspiración por la jeringa de la válvula multivías = $600 \mu\text{l}$

Velocidad de la bomba = 100 mms^{-1}

Parámetros de distribución de la solución tampón de elución por la bomba fija hacia el tubo de análisis:

20 Volumen de distribución = $400 \mu\text{l}$

Velocidad de la bomba = 100 mms^{-1}

25 Parámetros de elución:

Velocidad de oscilación = 50 mms^{-1}

Amplitud de oscilación = 9 mms^{-1}

30 Temperatura objetivo = 75°C

Tiempo de calentamiento = 300 s

35 Volumen de la solución tampón de elución = $45 \mu\text{l}$

Ejemplo 2: Lisis mecánica del tejidos

40 Se ha realizado un estudio sobre la evaluación de los funcionamientos de lisis mecánica en el dispositivo de lisis según la invención con el objeto de romper las paredes de células vivientes de los tipos de microorganismos y así liberar los ARNt. Estos ensayos han sido llevados a cabo sobre muestras sólidas tumorales.

Protocolo de puesta a punto y probado:

45 • Reactivos y material:

- tumores de los cánceres de mama, pre-desgrasados y estabilizados con el material RNA/ater[®] comercializado por Qiagen,

50 - cajas de Petri,

- tubos de 2 mL estériles,

- pinzas de plástico y scalpels desechables,

55 - dispositivos de lisis según la invención (cartucho y rotor) descontaminados con Actrl,

- esferas de vidrio de $400\text{-}600 \mu\text{m}$,

60 Kit RNeasy Plus comercializado por Qiagen + mecanismo de extracción Qiacube.

• Preparación:

- limpiar la mesa de laboratorio y las pipetas con la ARNsa Zap antes de empezar la extracción,

65 - Dejar descongelar los tumores congelados a -80°C ,

- Colocar el tumor en una caja de Petri evitando coger el RNAlater[®],

- Efectuar 2 lavados con 300 µl de tampón de RLT (Qiagen) para eliminar el RNAlater restante.

• Trituración de los tumores:

- Recortar el tumor (diámetro de aproximadamente 4 mm) con el escalpelo,

- Recuperar los trozos del tumor con la ayuda de una pinza plástica y transferencia hacia un tubo de 2 ml que contiene 3 00 µl de RLT (+ 3 µl de β-mercaptoetanol) ,

- Trituración de los trozos del tumor con:

• El aparato Tissue Ruptor Qiagen: velocidad 2 durante 2 minutos, o

el dispositivo de lisis de los microorganismos según la invención: 0,4-0,5 gramos de esferas de vidrio (400-600 µm), 2000 rpm, 2 veces 20 segundos.

- Recuperar la muestra y ajustar el volumen con el tampón RLT para obtener un volumen de 300 µl antes de la purificación.

• Purificación de los ARNt con el kit Qiagen RNeasy Plus mini:

1. Poner los 300 µl del tampón de RLT recuperados después de la trituración sin los desechos de los tumores restantes en un tubo de 2 ml,

2. Preparar los 2 tipos de columnas para la purificación y la fijación de los ARN: columna gDNA Eliminator y ARN spin,

3. Preparar las soluciones tampones, las lanzaderas de extracción Qiagen así como los tubos de elución,

4. Preparar el ensayo Qiacube siguiendo las instrucciones dictadas por el robot e iniciar el "run".

5. Recuperar los 80 µl del eluyente y congelar a -80°C los ARNt purificados,

6. Dosificación: 1 µl del eluyente no diluido en Nanodrop,

7. Medición de la calidad del ARNt extraído: el análisis de la calidad se realiza según el protocolo RNA 6000 nano sobre un bioanalizador Agilent.

Así como en una electróforesis clásica, se observa la distribución de los transcritos con dos picos principales para los ARNr 18s y 28s.

Resultados:

Se han utilizado dos biopsias para este estudio, todas preparadas y conservadas de manera idéntica. Estas biopsias son circulares, de un diámetro de aproximadamente 4 mm y de espesor de 1,5 mm. Su masa es evaluada aproximadamente a una decena de mg. Estas biopsias han sido apartadas de manera burda en dos para llevar en paralelo los dos tipos de lisis mecánica (lisis de referencia Tissu Ruptor y PPM). Sin embargo, se va a señalar que la cantidad de tejido utilizado no es idéntica de un ensayo a otro, el objeto es el de asegurar el buen desarrollo del ensayo, más bien que hacer una comparación de los funcionamientos entre la técnica de referencia y el protocolo según la invención.

El análisis de la pureza es obtiene por la relación entre los valores de la absorbancia a diferentes longitudes de onda: 260 nm para los ácidos nucleicos, 230 nm para las sales y 280 nm para las proteínas. Un valor de la relación próximo a 2 refleja una buena pureza de los ácidos nucleicos.

Biopsia	Protocolo de extracción		ARNt (ng/μl)	Pureza	
	Lisis	Purificación		260/280	260/230
1	Tissue Ruptor (Qiagen) 2 min, velocidad 2	Kit: RNeasy plus Robot: Qiacube	3,4	0,86	0,19
1	Dispositivo según la invención 2 x 20 s a 2000 rpm 0,4 g de esferas de 420-600 μm	Kit: RNeasy plus Robot: Qiacube	2,2	0,42	0,11
2	Tissu Ruptor de Qiagen 2 min, velocidad 2	Kit: RNeasy plus Robot: Qiacube	31,7	2,09	0,56
2	Dispositivo según la invención 2 x 20 s a 2000 rpm 0,4 g de esferas de 420-600 μm	Kit: RNeasy plus Robot: Qiacube	81,1	2,10	1,70

En el caso de la biopsia 1, se constata que la cantidad del ARNt extraído es muy reducida. Esto se puede explicar por el hecho de que la biopsia ha sido degradada, provocando una pérdida del material.

- 5 En el caso de la biopsia 2, se constata que una cantidad significativa del ARNt ha sido extraída por las dos técnicas. Se constata por otra parte que la pureza es buena.

- 10 Se destaca así de estos ejemplos que el dispositivo según la invención es una herramienta que funciona para recoger las bacterias contenidas en - una muestra de aire, lisarlas y permitir la recuperación de los ácidos nucleicos de dichas bacterias para análisis. Para esto, el dispositivo utilizado estará constituido en primer lugar de un cartucho insertado en el interior del módulo de recogida del aire y, en segundo lugar, del cartucho que contiene las bacterias recogidas, combinadas por medio de la recuperación de los ácidos nucleicos.

REIVINDICACIONES

1. Dispositivo de recogida de microorganismos contenidos en el aire, comprendiendo dicho dispositivo:

5 - un módulo de recogida del aire, que comprende:

i. un elemento superior que comprende un conducto de admisión del aire que permite la entrada de un flujo de aire hacia el interior del módulo, disponiendo el conducto en su base, de medios de perturbación del flujo de aire,

10 ii. un elemento inferior que comprende medios de evacuación del aire que permiten la salida del flujo de aire creado, pudiendo dichos elementos superior e inferior ser solidarizados el uno al otro de tal modo que el flujo de aire pueda crearse en el interior del módulo de recogida del aire;

15 - un cartucho, de forma sustancialmente cilíndrica, que comprende una zona de retención de los microorganismos, comprendiendo dicha zona de retención medios de lisis de microorganismos, colocándose dicho cartucho en el interior del módulo de recogida del aire.

20 2. Dispositivo según la reivindicación anterior, en el que la zona de retención de los microorganismos del cartucho comprende, además, un material apto para retener los microorganismos, para mantener los medios de lisis en su lugar y para disolverlos en presencia de un líquido.

25 3. Dispositivo según las reivindicaciones 1 o 2, en el que los medios de perturbación del flujo de aire comprenden un cono 30 en forma de una ojiva posicionado en el centro de la lumbrera del conducto de admisión del aire y al menos un álabe que conecta la pieza en forma de ojiva con la cara interna del conducto de admisión del aire.

4. Dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el módulo de recogida del aire está destinado para conectarse a un circuito de reciclaje del aire o a un dispositivo de aspiración del aire.

30 5. Dispositivo de lisis de los microorganismos, comprendiendo dicho dispositivo:

35 - un cartucho, de forma sustancialmente cilíndrica, que comprende una zona de retención de los microorganismos, comprendiendo dicha zona de retención unos medios de lisis de microorganismos y un material apto para retener dichos microorganismos, para mantener los medios de lisis en su lugar y para disolverse en presencia de líquido, teniendo el papel dicho cartucho de estator;

- un rotor, apto para colocarse en el cartucho, comprendiendo dicho rotor unos medios de puesta en rotación.

40 6. Dispositivo según la reivindicación anterior, que comprende además una sobrecubierta destinada a mantener al rotor solidario con el cartucho.

45 7. Dispositivo según las reivindicaciones 5 o 6, en el que los medios de colocación en rotación están constituidos por ranuras llevadas en la pared de un conducto ciego, dichas ranuras están diametralmente opuestas y destinadas para recibir el extremo de un eje de transmisión de un medio de accionamiento de dicho rotor en la rotación.

50 8. Dispositivo según las reivindicaciones 5 a 7, en el que el diámetro interno del cartucho es superior al diámetro externo del rotor, de tal modo que cuando el rotor esté intercalado en el cartucho, la distancia que separa la pared interna del cartucho de la pared externa del rotor es suficientemente importante para permitir a los medios de lisis que lleguen a colocarse en este espacio intersticial y suficientemente reducido para que los medios de lisis estén en contacto con una u otra de las paredes.

9. Sistema de lisis de los microorganismos y de purificación de los ácidos nucleicos de dichos microorganismos, que comprende:

55 - un medio de colocación del dispositivo de lisis de los microorganismos según una de las reivindicaciones 5 a 8;

- un dispositivo de lisis de microorganismos según una de las reivindicaciones 5 a 8;

60 - un medio de accionamiento del rotor en rotación, cuando el dispositivo de lisis se coloca sobre el medio de colocación;

- al menos un contenedor de recepción de los ácidos nucleicos;

65 - al menos un medio de aspiración/expulsión del líquido;

- una válvula multivías, en comunicación fluídica con el dispositivo de lisis de los microorganismos, un contenedor de

recepción de los ácidos nucleicos purificados y el medio de aspiración/expulsión del líquido.

10. Sistema de lisis según la reivindicación anterior, que comprende además unos medios de imantación.

5 11. Sistema de lisis según la reivindicación 9 o 10, que comprende además unos medios de calentamiento.

12. Sistema de lisis según una de las reivindicaciones 9 a 11, en el que la válvula multivías comprende un medio de aspiración-expulsión.

10 13. Procedimiento de recogida de los microorganismos contenidos en el aire, comprendiendo dicho procedimiento las etapas que consisten en:

a) colocar un cartucho según las reivindicaciones 1 o 2, en el interior de un módulo de recogida del aire, según las reivindicaciones 1 o 3, a fin de obtener el dispositivo de recogida de los microorganismos según las reivindicaciones 1 a 3, estando la zona de retención en el interior del cartucho en comunicación con el conducto de admisión del aire del módulo de recogida del aire,

b) provocar la entrada de aire en el interior de dicho módulo de recogida de aire por cualquier medio apropiado,

20 c) recoger los microorganismos contenidos en el aire en la zona de retención del cartucho.

14. Procedimiento de lisis de los microorganismos contenidos en el aire, comprendiendo dicho procedimiento las etapas que consisten en:

25 a) colocar un cartucho según las reivindicaciones 1 o 2, en el interior de un módulo de recogida, según las reivindicaciones 1 o 3, a fin de obtener el dispositivo de recogida de los microorganismos según las reivindicaciones 1 a 3, estando la zona de retención en el interior del cartucho en comunicación con el conducto de admisión del aire del módulo de recogida del aire,

30 b) provocar la entrada de aire en el interior de dicho módulo de recogida de aire por cualquier medio apropiado,

c) recoger los microorganismos contenidos en el aire, en la zona de retención del cartucho,

35 d) sacar el cartucho del módulo de recogida del aire,

e) colocar el rotor en el cartucho, de tal modo que se obtenga el dispositivo de lisis de microorganismos según una de las reivindicaciones 5 a 8,

40 f) colocar el dispositivo de lisis de los microorganismos en el sistema de lisis de los microorganismos y de purificación de los ácidos nucleicos,

g) introducir un líquido de elución en el cartucho, provocando la suspensión de los medios de lisis situados en la zona de retención de los microorganismos del cartucho, y

45 h) lisar mecánicamente los microorganismos, mediante la puesta en rotación del rotor en el interior del cartucho gracias a un medio de accionamiento en rotación de dicho rotor, accionando dicho rotor en rotación los medios de lisis de los microorganismos.

50 15. Procedimiento de extracción de los ácidos nucleicos de microorganismos contenidos en el aire, comprendiendo dicho procedimiento las etapas que consisten en:

a) colocar un cartucho según las reivindicaciones 1 o 2, en el interior de un módulo de recogida del aire según las reivindicaciones 1 o 3, a fin de obtener el dispositivo de recogida de los microorganismos según una de las reivindicaciones 1 a 3, estando la zona de retención en el interior del cartucho en comunicación con el conducto de admisión del aire del módulo de recogida del aire,

b) provocar la entrada de aire en el interior del módulo de recogida de aire por cualquier medio apropiado,

60 c) recoger los microorganismos contenidos en el aire, en la zona de retención del cartucho,

d) sacar el cartucho del módulo de recogida del aire,

e) colocar el rotor según las reivindicaciones 5-8, el cartucho según las reivindicaciones 5-8, a fin de obtener el dispositivo de lisis de microorganismos según una de las reivindicaciones 5 a 8,

65 f) introducir un líquido de elución en el cartucho con la ayuda de un medio de aspiración-expulsión, provocando la

suspensión de los medios de lisis contenidos en el cartucho, y

g) lisar mecánicamente los microorganismos, mediante la puesta en rotación del rotor, en el interior del cartucho gracias al medio de accionamiento en rotación de dicho rotor, accionando dicho rotor en rotación los medios de lisis, y

h) aspirar el líquido de elución que contiene los ácidos nucleicos de dichos microorganismos liberados durante la lisis, y

i) distribuir el líquido de elución en un contenedor de recepción y de purificación de los ácidos nucleicos.

16. Procedimiento según la reivindicación anterior, que comprende una etapa suplementaria de lavado y de purificación de los ácidos nucleicos.

17. Procedimiento según las reivindicaciones 13 a 16, que comprende una etapa suplementaria d) que consiste en hacer crecer los microorganismos concentrados en la zona de retención del cartucho.

18. Procedimiento según la reivindicación anterior, en el que la puesta en crecimiento se obtiene por incubación del cartucho en una estufa durante un período de tiempo que va desde 2 hasta 24 horas.

19. Procedimiento según una de las reivindicaciones 15 a 18, en el que las etapas f) a i) se realizan en el sistema de lisis de microorganismos y de purificación de los ácidos nucleicos según una de las reivindicaciones 9 a 12.

20. Procedimiento de lisis de microorganismos, comprendiendo dicho procedimiento las etapas que consisten en:

a) obtener un cartucho en el cual los microorganismos se concentran en la zona de retención del cartucho,

b) colocar el rotor según las reivindicaciones 5-8 en el cartucho según las reivindicaciones 5-8, a fin de obtener el dispositivo de lisis de microorganismos según una de las reivindicaciones 5 a 8,

c) introducir un líquido de elución en el cartucho, provocando la suspensión de los medios de lisis situados en la zona de retención de los microorganismos del cartucho, y

d) lisar mecánicamente los microorganismos, por la puesta en rotación del rotor, en el interior del cartucho, accionando dicho rotor en rotación los medios de lisis de los microorganismos.

21. Procedimiento de extracción de los ácidos nucleicos de microorganismos, comprendiendo dicho procedimiento las etapas que consisten en:

a) obtener un cartucho en el cual unos microorganismos se concentran en la zona de retención,

b) colocar el rotor según las reivindicaciones 5-8 en el cartucho según las reivindicaciones 5-8, a fin de obtener el dispositivo de lisis de los microorganismos según una de las reivindicaciones 5 a 8,

c) introducir un líquido de elución en el cartucho, provocando la suspensión de los medios de lisis situados en la zona de retención de los microorganismos del cartucho, y

d) lisar mecánicamente los microorganismos, mediante la puesta en rotación del rotor, en el interior del cartucho, accionando el rotor en rotación los medios de lisis de los microorganismos, y

e) aspirar el líquido de la elución que contiene los ácidos nucleicos de dichos microorganismos liberados durante la lisis, y

f) distribuir el líquido de elución en un contenedor de recepción y de purificación de los ácidos nucleicos.

22. Procedimiento según la reivindicación anterior, que comprende una etapa suplementaria de lavado y purificación de los ácidos nucleicos.

23. Procedimiento de lisis de los microorganismos contenidos en una muestra líquida, comprendiendo dicho procedimiento las etapas que consisten en:

a) introducir la muestra líquida que contiene dichos microorganismos en un cartucho, cerca de la zona de retención, de tal modo que dicha muestra líquida ocasione la suspensión de los medios de lisis situados en dicha zona de retención de los microorganismos del cartucho;

b) colocar el rotor en el cartucho, a fin de obtener el dispositivo de lisis de los microorganismos según una de las reivindicaciones 5 a 8,

c) lisar mecánicamente los microorganismos, mediante la puesta en rotación del rotor, en el interior del cartucho, accionando el rotor en rotación los medios de lisis sobre los cuales se retienen los microorganismos.

5 24. Procedimiento de extracción de los ácidos nucleicos de los microorganismos contenidos en una muestra líquida, comprendiendo dicho procedimiento las etapas que consisten en:

10 a) introducir una muestra líquida que contiene dichos microorganismos en un cartucho cerca de la zona de retención, de tal modo que dicha muestra líquida ocasione la suspensión de los medios de lisis situados en la zona de retención de los microorganismos del cartucho;

b) colocar el rotor según las reivindicaciones 5-8 en el cartucho según las reivindicaciones 5-8, a fin de obtener el dispositivo de lisis de los microorganismos según una de las reivindicaciones 5 a 8,

15 c) lisar mecánicamente los microorganismos, mediante la puesta en rotación del rotor, en el interior del cartucho, el rotor provoca una rotación de los medios de lisis,

d) aspirar la muestra líquida que contiene los ácidos nucleicos de dichos microorganismos liberados durante la lisis, y

20 e) distribuir la muestra líquida en un contenedor de recepción y de purificación de los ácidos nucleicos.

25 25. Procedimiento de extracción de los ácidos nucleicos de una muestra de tejido celular, comprendiendo dicho procedimiento las etapas que consisten en:

a) introducir la muestra de tejido celular en el cartucho en la presencia de un líquido de elución,

b) colocar el rotor según las reivindicaciones 5-8 en el cartucho según las reivindicaciones 5-8,

30 c) lisar mecánicamente las células del tejido celular, mediante la puesta en rotación del rotor, en el interior del cartucho, accionando dicho rotor en rotación los medios de lisis contenidos en el cartucho,

d) aspirar el líquido de elución que contiene los ácidos nucleicos de las células, liberados durante la lisis, y

35 e) distribuir el líquido de elución en un contenedor de recepción y de purificación de los ácidos nucleicos.

26. Procedimiento según una de las reivindicaciones 24 o 25, que comprende una etapa suplementaria de lavado y de purificación de los ácidos nucleicos.

40 27. Utilización del dispositivo de lisis de los microorganismos según una de las reivindicaciones 5 a 8, para lisar las células de una muestra de tejido celular.

28. Utilización del sistema de lisis de los microorganismos y de purificación de los ácidos nucleicos de dichos microorganismos según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, para lisar las células de una muestra de tejido celular.

45

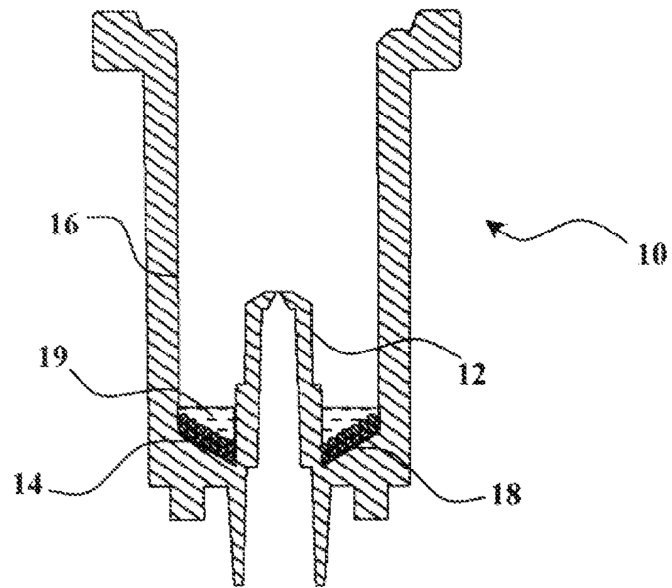
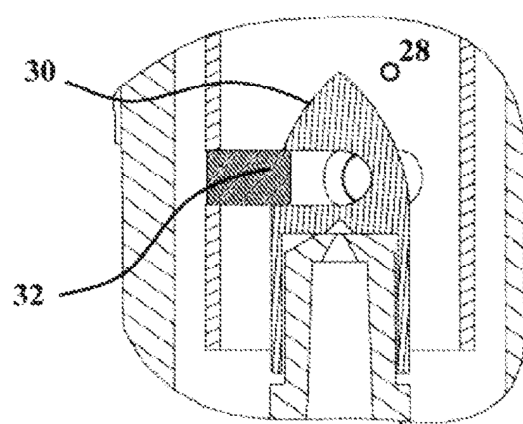
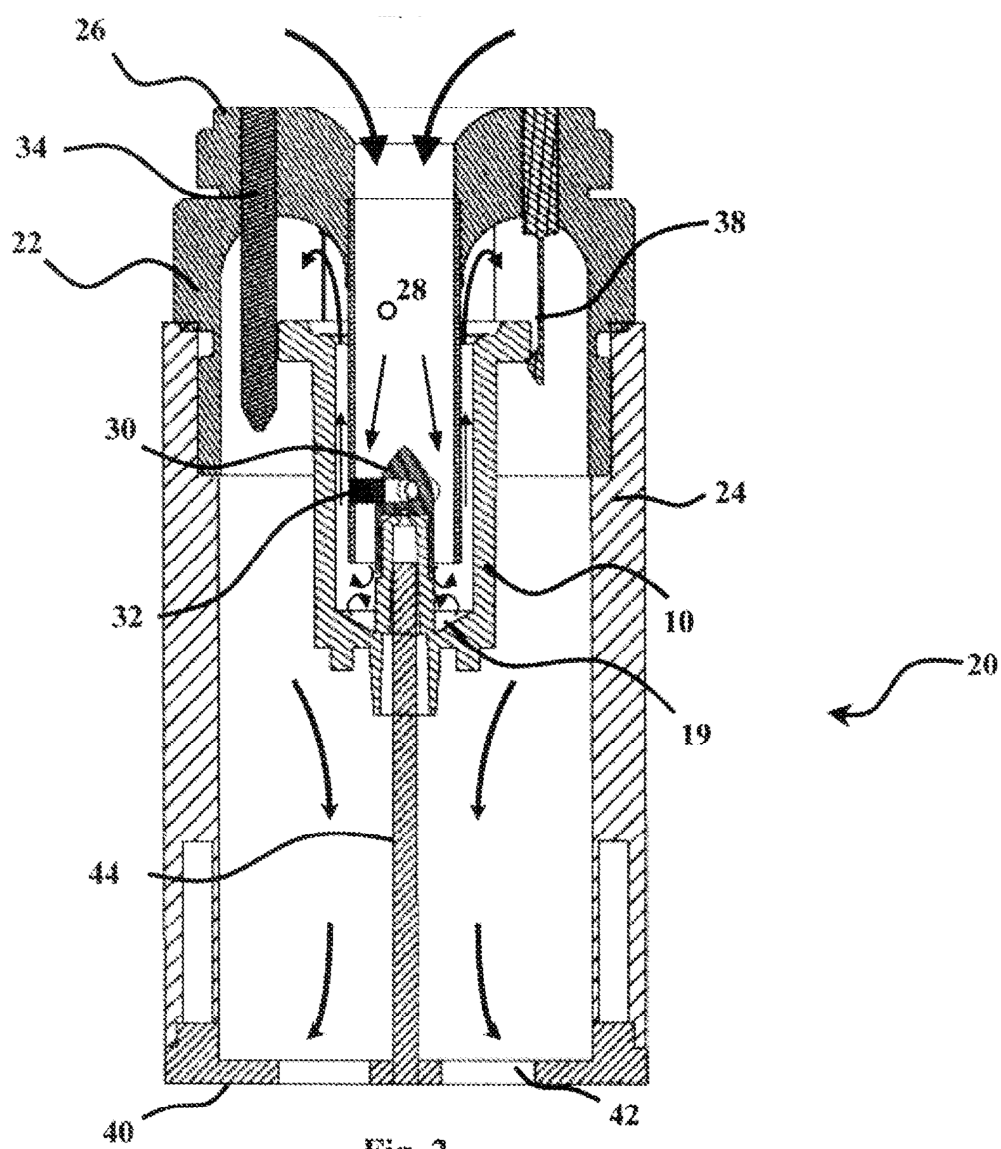


Fig. 1



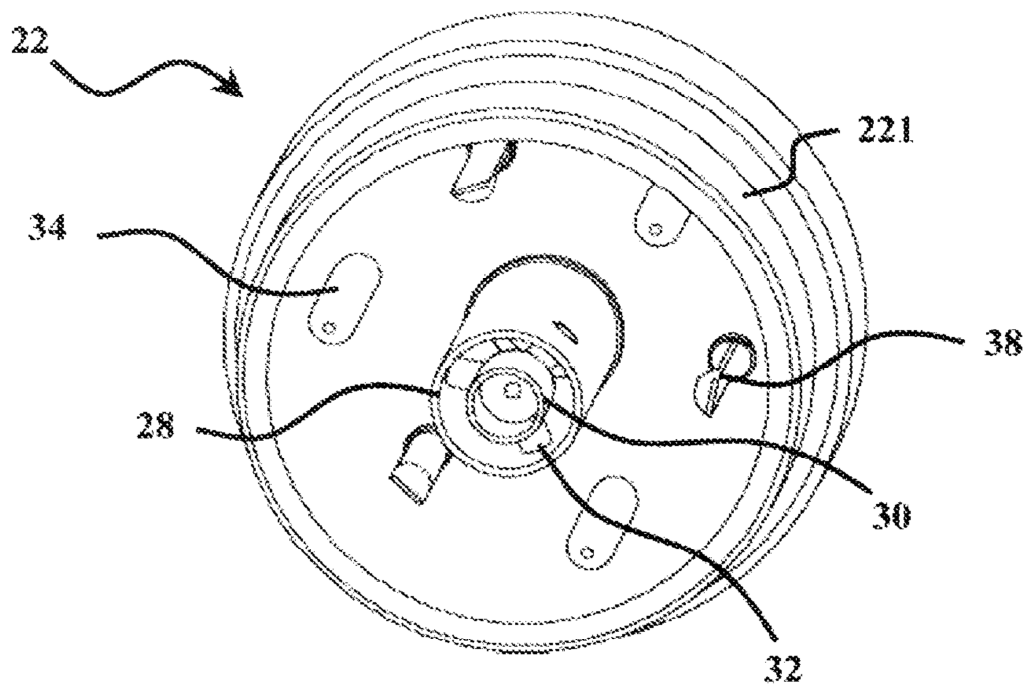


Fig. 4

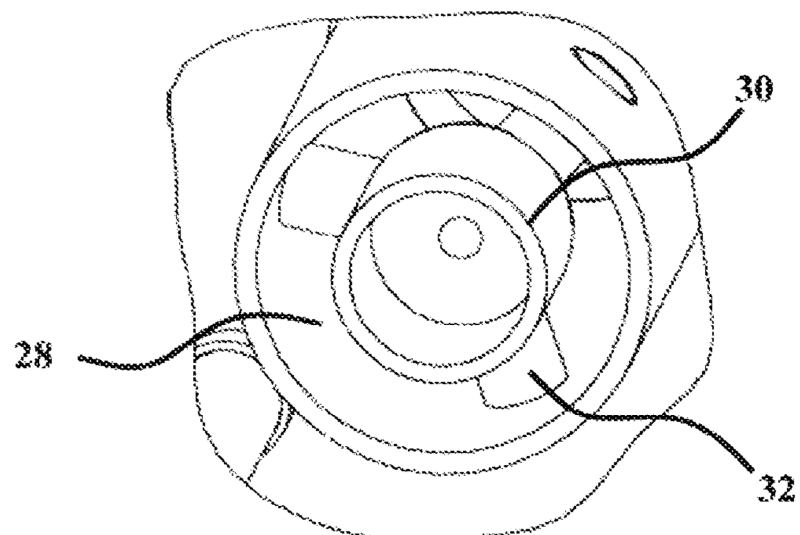


Fig. 5

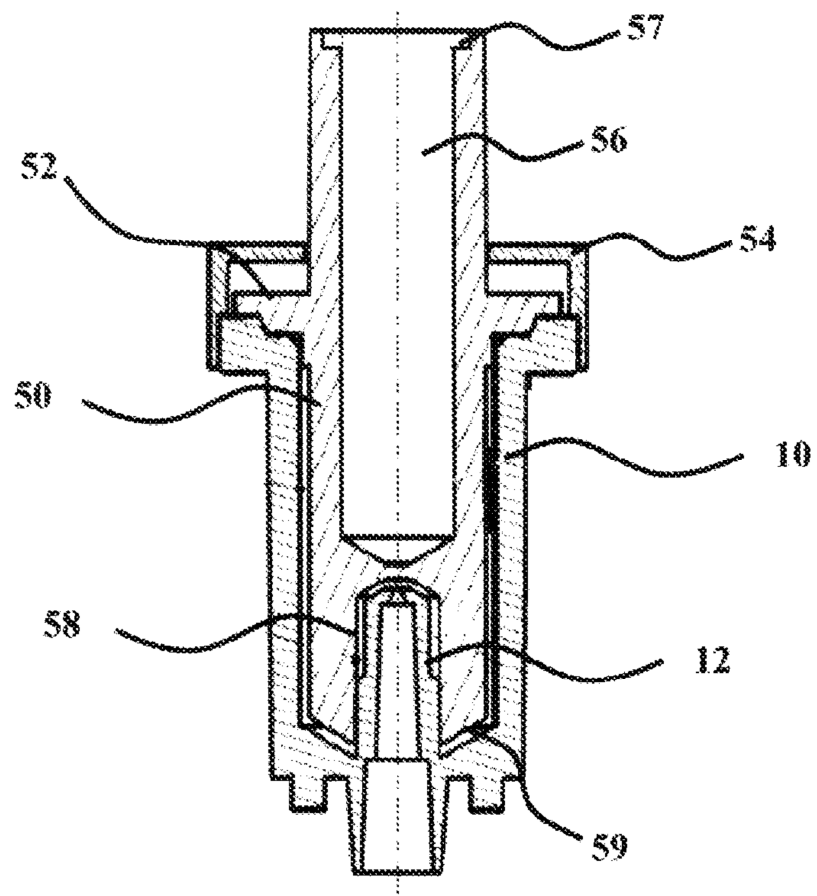


Fig. 6

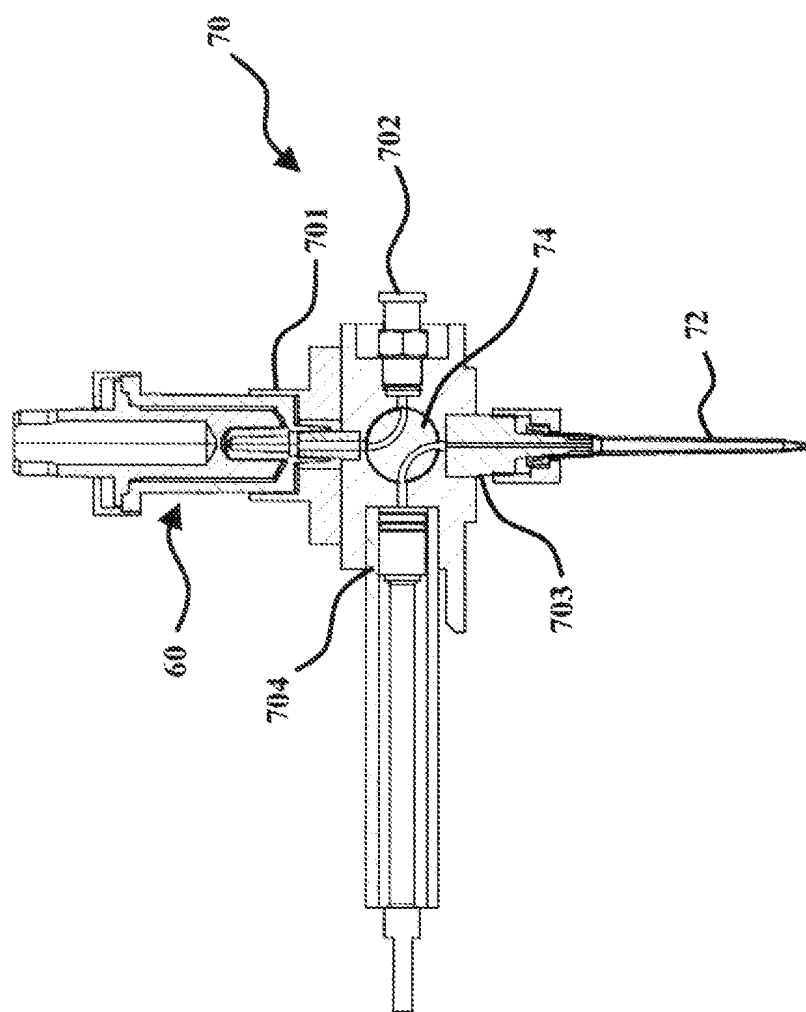
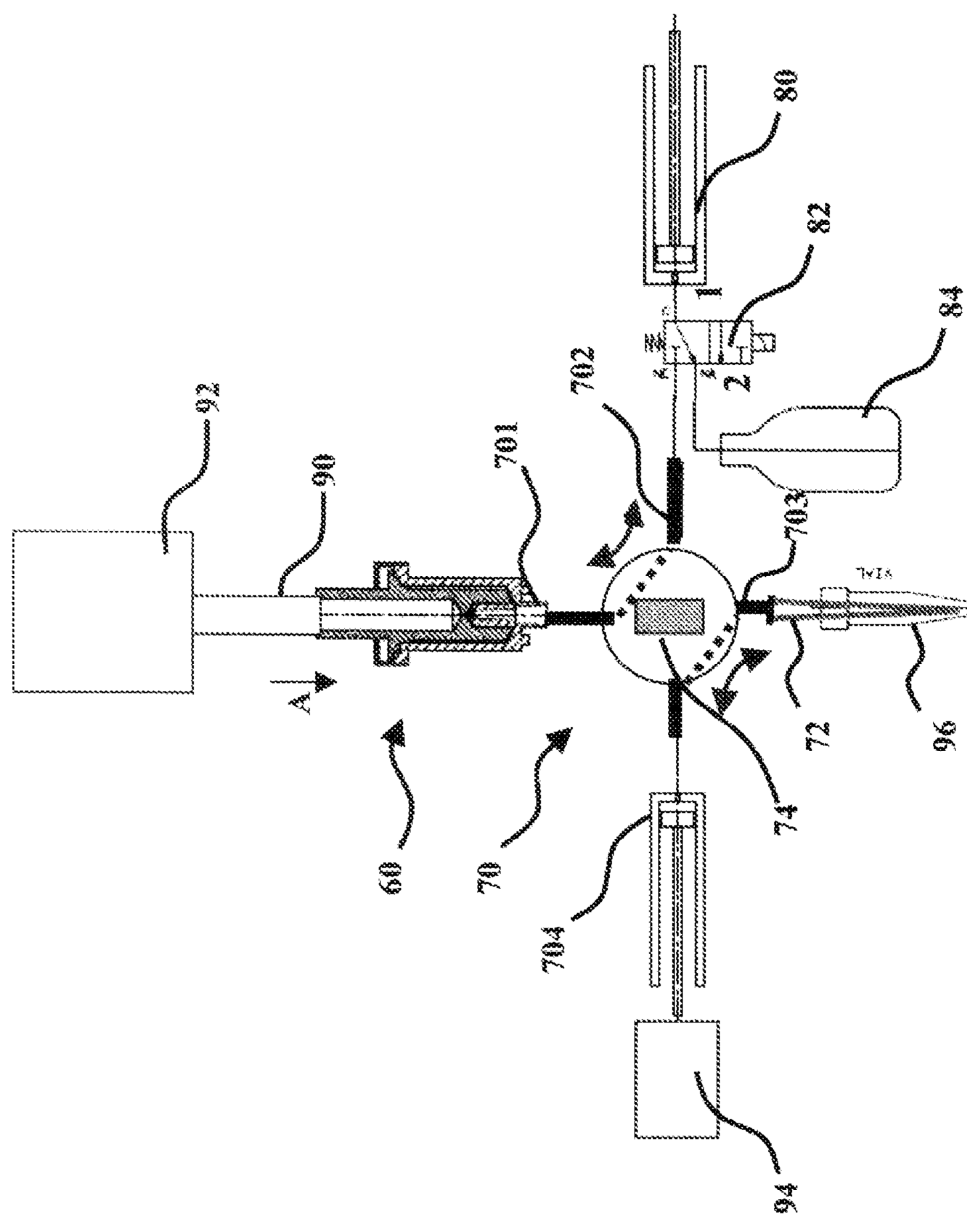


Fig. 7



158

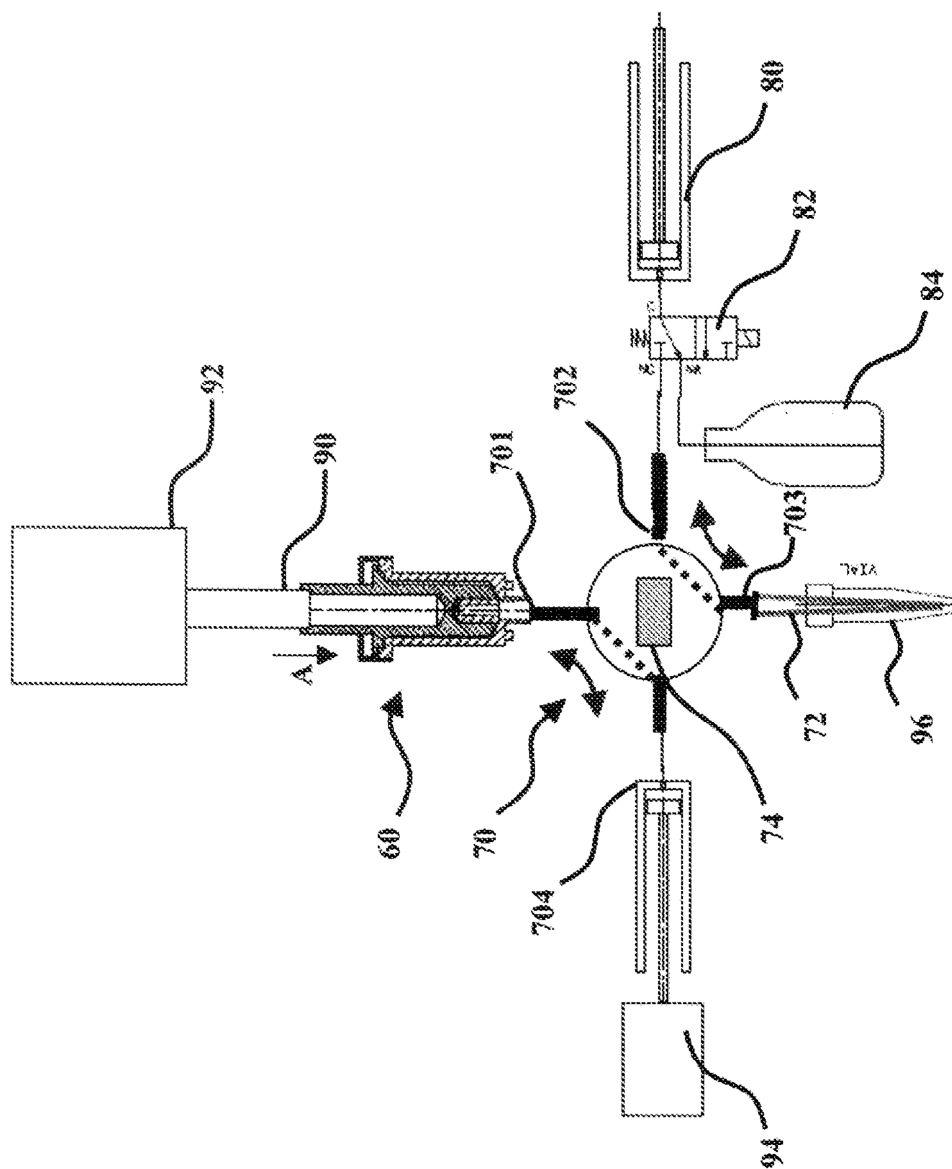


Fig. 8B