

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 688 281**

51 Int. Cl.:

B01L 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.07.2007 PCT/GB2007/002854**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.01.2008 WO08012550**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.07.2007 E 07766370 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.07.2018 EP 2049261**

54 Título: **Dispositivo, sistema y método para procesar una muestra**

30 Prioridad:

28.07.2006 GB 0615110
28.07.2006 GB 0615109

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
31.10.2018

73 Titular/es:

DIAGNOSTICS FOR THE REAL WORLD, LTD
(50.0%)
845 Embedded Way, Suite 150
San José, CA 95138, US y
CAMBRIDGE ENTERPRISE LIMITED (50.0%)

72 Inventor/es:

LEE, HELEN, HWAI-AN;
DINEVA, MAGDA, ANASTASSOVA;
WISNIEWSKI, CRAIG, ALAN y
STANKUS, PHILLIP, JOHN

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 688 281 T3

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

DESCRIPCIÓN

Dispositivo, sistema y método para procesar una muestra

- 5 La invención se refiere a dispositivos, sistemas y métodos para el procesamiento de una muestra. En particular, la invención se refiere a pruebas, sobre el terreno e in situ, de ácido nucleico en una muestra biológica.

Antecedentes

- 10 La importancia de la prueba de ácido nucleico (NAT) ha resultado ser cada vez más evidente durante la última década para muchos fines como cribado y diagnóstico de enfermedades infecciosas y trastornos genéticos, pruebas de susceptibilidad a enfermedades, supervisión de terapia, y mejora de la seguridad de los suministros de sangre. NAT combina las ventajas de la detección directa y altamente específica de secuencia del genoma de un agente infeccioso con una sensibilidad analítica que es varios órdenes de magnitud mayor que la de las pruebas de base inmuno, o los métodos de aislamiento de virus y cultivo de células. Debido a la alta sensibilidad de NAT, su uso en bancos de sangre reduce el riesgo de transmisión de agentes infecciosos durante el período entre la infección y la seroconversión, de infección con virus inmunovariantes, de un portador inmunosilente u oculto. Los ensayos a base de NAT constan de tres pasos básicos: extracción de ácido nucleico, amplificación de genoma mediada por procedimientos como (RT)-PCR; amplificación por desplazamiento de la hebra (SDA) y sistema de amplificación basada en transcripción TAS (Guatelli y colaboradores., Proc. Natl. Acad. Sci. 87: 1874-1878 (1990); Compton, Nature 350: 91-92 (1991)), y detección de amplicones. WO9119567 describe un dispositivo y un método para procesar una muestra con una cámara de procesamiento y cámara de reactivo. Los documentos no muestran un sistema cerrado durante el procesamiento. Los ensayos NAT actualmente disponibles son complejos y comportan procedimientos de pasos múltiples que requieren personal altamente cualificado e instalaciones especializadas. Requieren transporte en cadena de frío y almacenamiento de reactivos, un alto costo de inversión para instrumentos, altos costos corrientes para reactivos, y soporte de mantenimiento regular. Todo ello restringe el uso de NAT solamente a laboratorios especializados bien equipados y técnicamente avanzados. Correspondientemente, el diseño actual de los ensayos NAT es inadecuado para pruebas cerca del paciente e in situ, por ejemplo, clínicas médicas, clínicas comunitarias, salas de emergencia, unidades de cirugía de campo de batalla o puntos de atención sanitaria, hospitales de distrito y clínicas entre ciudades en los entornos con recursos limitados de países en vías de desarrollo. Estos incluyen predominantemente países de África, Asia y América Latina con una alta prevalencia de enfermedades infecciosas. Un requisito esencial de los ensayos en base a amplificación de ácido nucleico es la protección contra la contaminación de amplicones, actualmente resuelta trabajando en laboratorios especializados que utilizan espacios dedicados para preparación de muestras, amplificación y detección. Este acercamiento no es aplicable a pruebas in situ, pruebas cerca de los pacientes y en entornos con recursos limitados.

Resumen de la invención

- 40 La invención proporciona dispositivos, sistemas y métodos según las reivindicaciones independientes anexas, a las que ahora se hará referencia. Elementos preferidos o ventajosos de la invención en sus varias realizaciones y aspectos se definen en las reivindicaciones secundarias dependientes.

- 45 Por lo tanto, la invención puede proporcionar ventajosamente un aparato y método adecuado para procesar una muestra, especialmente adecuada para amplificar ácidos nucleicos de una muestra en condiciones donde hay falta de instalaciones y un número reducido de personal experto.

- 50 Consiguientemente, en un primer aspecto, la invención proporciona un dispositivo o aparato para el procesamiento de una muestra. El dispositivo incluye una cámara de procesamiento para recibir la muestra y una pluralidad de cámaras de reactivo adecuadas para contener reactivos de procesamiento. El dispositivo también incluye una cámara de analizador para contener un analizador o medio de análisis adecuado, y un aparato de colocación o cuerpo para poner la cámara de procesamiento secuencialmente en comunicación con las cámaras de reactivo y con la cámara de analizador para mezclar reactivos con la muestra y así implementar un protocolo o método de procesamiento. El dispositivo también incluye un aparato de sellado para sellar la cámara de procesamiento con respecto al entorno externo. Tal dispositivo de sellado puede ayudar a evitar la contaminación de la muestra durante el procesamiento y también puede evitar, ventajosamente, la contaminación del punto de uso, por ejemplo, una clínica, con la muestra procesada.

- 60 La cámara de procesamiento tiene, ventajosamente, una abertura de cámara de procesamiento para introducción de la muestra y para comunicación con las cámaras de reactivo como se describe más adelante. En una realización alternativa, la cámara de procesamiento puede tener opcionalmente aberturas separadas para estas dos funciones.

- 65 En una realización preferida, cada cámara de reactivo tiene un asociado abertura de cámara de reactivo que se define en el aparato de colocación del dispositivo de tal manera que cada cámara de reactivo pueda comunicar con la cámara de procesamiento cuando su abertura asociada respectiva esté dispuesta en relación de solapamiento con la abertura de cámara de procesamiento. La cámara de procesamiento se puede mover con relación a las

aberturas de cámara de reactivo de tal manera que haya una comunicación secuencial entre la cámara de procesamiento y cada cámara de reactivo, por orden.

5 En implementaciones diferentes, el aparato de colocación puede emplear diferentes geometrías. Por ejemplo, la cámara de procesamiento puede moverse en un recorrido circular entre sus posiciones diferentes, o estaciones, o puede moverse en un recorrido lineal o de cualquier otra manera adecuada.

10 Ventajosamente, el dispositivo puede ser un dispositivo no reutilizable, desechable, de un solo uso. En este caso, el dispositivo se puede construir de materiales baratos y desecharse simplemente después de usarlo. Esto puede ser una ventaja cuando el dispositivo se usa para realizar procesamiento y análisis en regiones del mundo con recursos limitados, por ejemplo, si el dispositivo se usa para pruebas médicas en países del tercer mundo.

15 El dispositivo puede emplearse ventajosamente en el procesamiento y análisis de muestras biológicas, por ejemplo, muestras de sangre o muestras de materiales genéticos. Tales pruebas biológicas son difíciles de realizar actualmente sin usar equipo caro y personal experimentado. Durante el procesamiento de una muestra, el contenido de la cámara de procesamiento está sellado con respecto al entorno externo, es decir, el dispositivo proporciona un sistema cerrado y la muestra no puede escapar del dispositivo. El sistema cerrado ayuda a eliminar la contaminación producida por fuentes externas, y al mismo tiempo protege el entorno externo contra la contaminación con el producto amplificado de la muestra procesada, lo que puede producir resultados falsos. Esto es especialmente importante donde el procesamiento de la muestra implica la amplificación de ácido nucleico, puesto que una cantidad pequeña de ácido nucleico inestable podría ser amplificada fácilmente proporcionando un resultado falso. Como resultado, también se prefiere que el aparato de sellado sirva para sellar las cámaras de reactivo con respecto al entorno externo.

25 El aparato de sellado incluye cualquier medio adecuado para sellar la cámara de procesamiento con respecto al entorno externo permitiendo al mismo tiempo que reactivos de procesamiento contenidos en las varias cámaras de reactivo accedan a la cámara de procesamiento, por ejemplo, cuando la cámara de procesamiento es movida a una posición predeterminada dentro del dispositivo en el que está en comunicación con una cámara de reactivo concreta. En realizaciones preferidas de la invención, el aparato de sellado puede incluir elementos de un cuerpo, bastidor, guía o elemento de soporte del dispositivo o un alojamiento para la cámara de reactivo. El sellado en tales casos puede lograrse simplemente por el tope de la abertura de cámara de procesamiento y una porción del aparato de colocación o cuerpo, incorporando opcionalmente el sellado un elemento de sellado.

35 Aunque el sellado del contenido de la cámara de procesamiento es importante, el aparato de sellado solamente tiene que servir para sellar la cámara durante el procesamiento de la muestra, cuando es muy probable que la muestra quede afectada por contaminación. Preferiblemente, sin embargo, el aparato de sellado también sirve para sellar la cámara de procesamiento con respecto al entorno externo durante cualquier paso de análisis.

40 Se prefiere que el dispositivo incluya además un orificio de acceso que pueda abrirse o alinearse con la abertura de la cámara de procesamiento para proporcionar acceso inicial a la cámara de procesamiento. Esto es ventajoso porque la muestra pueda introducirse después en la cámara de procesamiento sin necesidad de sacar la cámara de procesamiento del dispositivo o de abrir el dispositivo. Tal disposición también reduce los riesgos de contaminación de la muestra y la corrupción del paso de procesamiento en la muestra.

45 Ventajosamente, cualquier orificio de acceso puede estar protegido por una junta estanca extraíble, por ejemplo, una lámina de sellado extraíble. Esto ayuda a asegurar que el dispositivo esté libre de contaminación antes de la introducción de la muestra. La muestra puede introducirse en la cámara de procesamiento después de la extracción de la junta estanca y la cámara de procesamiento puede moverse entonces de tal manera que el aparato de sellado selle la cámara de procesamiento con respecto al entorno.

50 Ventajosamente, la cámara de procesamiento puede ser móvil entre una pluralidad de posiciones discretas, o estaciones. En algunas de estas posiciones, la abertura de cámara de procesamiento está dispuesta ventajosamente en relación de solapamiento con una abertura de cámara de reactivo. Esto permite la comunicación entre las cámaras y así la transferencia de reactivo desde la cámara de reactivo a la cámara de procesamiento.

55 Puede ser deseable que haya posiciones para la cámara de procesamiento en las que la abertura de cámara de procesamiento no esté en relación de solapamiento con ninguna de las aberturas de cámara de reactivo. Tales posiciones pueden usarse ventajosamente para etapas de incubación o mezcla durante el procesamiento, si es preciso para un protocolo de procesamiento para el que el dispositivo esté diseñado.

60 Pueden definirse aberturas de cámara de reactivo en o a través del cuerpo de dispositivo o aparato de colocación y puede ser ventajoso que las cámaras de reactivo propiamente dichas se formen integralmente con tal cuerpo o aparato de colocación. Los reactivos pueden precargarse en las cámaras de reactivo en tal construcción, en una instalación limpia, por ejemplo, minimizando por ello la oportunidad de contaminación antes del uso. Cada cámara podría estar formada por un blíster o burbuja que se extienda desde el cuerpo o puede ser una estructura más

65

compleja, tal como un tubo que suba desde el cuerpo. Una cámara integral puede ser especialmente ventajosa para uso con reactivos secos, por ejemplo, reactivos congelados en seco o liofilizados.

5 Puede ser preferible que al menos una de las cámaras de reactivo pueda acoplarse al cuerpo o aparato de colocación en su abertura de cámara de reactivo asociada. Tal construcción del dispositivo puede ser ventajosa donde se usan reactivos líquidos puesto que puede ser más difícil cargar reactivos líquidos en cámaras integrales y almacenar reactivos líquidos en cámaras integrales antes del uso del dispositivo. Las cámaras acoplables o extraíbles también pueden ser especialmente ventajosas donde el dispositivo está diseñado para usarse para un amplio rango de pruebas diferentes, cada una de las cuales requiera reactivos diferentes. En tal situación, los reactivos específicamente requeridos podrían añadirse al dispositivo acoplando la(s) cámara(s) de reactivo apropiada(s) al cuerpo.

10 Se prefiere que cualesquiera cámaras apropiadas formen una junta estanca cuando estén acopladas al dispositivo. El acoplamiento puede lograrse por cualquier medio adecuado, por ejemplo, utilizando un tornillo o encaje de bayoneta que alinee la cámara de reactivo con su abertura asociada, o puede ser un encaje a presión.

15 Puede ser especialmente ventajoso que el dispositivo incluya tanto una o más cámaras integrales para contener reactivos secos como una o más cámaras acoplables para contener reactivos líquidos, si el dispositivo está diseñado para un protocolo de prueba que implica reactivos tanto sólidos como líquidos.

20 Preferiblemente, durante el uso del dispositivo, los reactivos o cualquier analizador se introducen en la cámara de procesamiento bajo la influencia de gravedad. Esto minimiza los elementos mecánicos requeridos en el dispositivo y simplifica su uso. Un ejemplo de esto sería cuando se mantiene un reactivo dentro de su cámara por una barrera y la barrera se quita temporalmente cuando la cámara de procesamiento pasa por debajo de la abertura que va desde la cámara de reactivo. La gravedad podría actuar entonces en el reactivo, si el dispositivo se mantiene en una orientación apropiada, para empujarlo a la cámara de procesamiento. Alternativamente, en el caso de reactivos líquidos, la cámara de reactivo puede estar provista de un tapón o válvula, que, cuando se quita o abre, permite que el reactivo fluya a la cámara de procesamiento. Si la gravedad es el medio por el que un reactivo se introduce en la cámara de procesamiento, es importante utilizar el dispositivo en la orientación correcta.

25 Opcionalmente, puede usarse al menos un dispensador, tal como un émbolo, en el dispositivo para facilitar la introducción de un reactivo desde su cámara de reactivo a la cámara de procesamiento. El uso de émbolos puede ser especialmente aplicable a la introducción de reactivos líquidos.

30 Aunque puede ser posible cargar reactivos en las cámaras de reactivo apropiadas en el punto de uso, se prefiere que el dispositivo se cargue o llene con los reactivos correctos antes de llegar al punto de uso. Esto ayuda a evitar la contaminación, que puede proporcionar resultados falsos en cualquier análisis, y también elimina la necesidad de que un técnico experto maneje y mida cantidades correctas de reactivos en el punto de uso.

35 El analizador o medio de análisis, cuando está presente, puede contenerse en una cámara con una abertura asociada. Tal cámara puede denominarse una cámara de analizador, y puede funcionar según el mismo principio que las cámaras de reactivo descritas anteriormente. Donde se requiere contacto entre el analizador y la muestra procesada, puede no importar que el analizador pase a la cámara de procesamiento, o que el contenido de la cámara de procesamiento pase a la cámara de analizador. Es especialmente ventajoso que el analizador sea una tira de prueba o varilla graduada que proporcione un resultado visual. La tira de prueba puede bajarse a la cámara de procesamiento para contactar la muestra biológica procesada. La muestra procesada puede subir entonces por la tira de prueba para realizar el análisis requerido.

40 Una tira de prueba tiene de ordinario una dimensión de longitud más grande que el grosor y la anchura, y así puede estar alojada en una cámara de dimensiones similares del analizador. En tal caso puede ser preferible que la tira de prueba se coloque en una cámara que esté horizontalmente sobre la superficie del dispositivo en uso, por ejemplo, con el fin de hacer que el dispositivo sea más compacto, en cuyo caso todo el dispositivo puede tener que girarse para permitir la comunicación entre la tira de prueba y la muestra procesada. Ventajosamente, donde el analizador da un resultado visual, la pared de la cámara de análisis puede ser sustancialmente transparente de modo que el resultado del análisis se puede ver sin necesidad de abrir el dispositivo.

45 Alternativamente, el analizador puede incluir un reflectómetro o un densitómetro.

50 El dispositivo puede incluir un aparato de trinquete o medio de indexación para contribuir a la posición de la cámara de procesamiento. Tal aparato o medio puede permitir que la cámara de procesamiento se desplace a posiciones fijas discretas dentro del dispositivo y también puede evitar ventajosamente que la cámara de procesamiento se desplace en una dirección inversa a través del dispositivo.

55 En otro aspecto, la invención puede proporcionar un sistema para el procesamiento de una muestra biológica incluyendo un dispositivo como se ha descrito previamente o como se define en cualquier reivindicación y una fuente de calor externa o medio de calentamiento adaptado para enganchar con el dispositivo. Muchos pasos de

procesamiento biológico requieren condiciones térmicas controladas con esmero y así una fuente de calor adaptada para enganchar con el aparato puede ser deseable para el uso exacto del dispositivo. Preferiblemente, la fuente de calor está adaptada para enganchar con la cámara de procesamiento del dispositivo, así puede ser ventajoso que la porción exterior de la cámara de procesamiento sobresalga del dispositivo de manera que sea accesible.

5 Para facilitar la mezcla, el sistema puede incluir además un vibrador o medio de vibración para hacer vibrar el dispositivo, o la fuente de calor externa puede incorporar un vibrador. Preferiblemente, la fuente de calor externa es un simple bloque de calentamiento conformado para recibir el dispositivo o al menos para recibir la cámara de procesamiento.

10 El sistema puede incluir adicionalmente una o más cámaras de reactivo acoplables. Tales cámaras pueden estar precargadas con reactivo y pueden almacenarse ventajosamente por separado del dispositivo, por ejemplo, en un refrigerador, si es necesario.

15 En otro aspecto, la invención proporciona un método de procesar una muestra en un dispositivo que tiene una cámara de procesamiento, un aparato de colocación y una pluralidad de cámaras de reactivo. El método incluye los pasos de cargar la muestra en la cámara de procesamiento y operar el aparato de colocación primero para sellar la cámara de procesamiento con respecto al entorno externo, y luego para mover la cámara de procesamiento con relación a la pluralidad de cámaras de reactivo con el fin de introducir, en secuencia, una pluralidad correspondiente de reactivos a la cámara de procesamiento desde las cámaras de reactivo.

20 Cada reactivo puede añadirse o introducirse a la cámara de procesamiento por la acción de gravedad, o se puede usar un dispensador, tal como un émbolo.

25 La muestra procesada resultante puede ser analizada usando un analizador. Tal analizador puede contenerse ventajosamente en una cámara de analizador del dispositivo.

30 Ventajosamente, el método antes descrito puede aplicarse a un dispositivo con cualquier número de cámaras de reactivo, modificándose los pasos de mover la cámara de procesamiento y de añadir reactivos para cualquier número de cámaras de reactivo y reactivos asociados.

35 Ventajosamente, la cámara de procesamiento pasa secuencialmente por cada una de varias cámaras de reactivo, por orden. El número y el contenido de las cámaras de reactivo puede adaptarse a cualquier procesamiento requerido para análisis de la muestra. In situ, el usuario final solamente tiene que seguir un conjunto de instrucciones sencillas y no tiene que ocuparse de los detalles de la ciencia implicados en cada paso. Así, el procesamiento de la muestra no tiene que ser realizado por un usuario experto.

40 Opcionalmente, se pueden añadir pasos adicionales tanto antes como después de cada adición de reactivo a la cámara de procesamiento. Tales pasos pueden incluir pasos de mezcla e incubación y tales pasos adicionales dependerán del tipo de procesamiento deseado para la muestra.

45 Donde el protocolo de procesamiento usa un reactivo líquido puede ser ventajoso suministrar el dispositivo al usuario final en dos partes. Una parte del dispositivo puede incluir la cámara de procesamiento y cámaras de reactivo cargadas con reactivos secos liofilizados y un medio de análisis, por ejemplo, una tira de prueba. Esta primera parte del dispositivo puede estar herméticamente sellada con desecante. La segunda parte puede ser una cámara de reactivo acoplable, por ejemplo, como se ha descrito anteriormente, conteniendo un reactivo líquido. Las dos partes del dispositivo se unirían después antes del uso.

50 En términos amplios, la invención puede ser un dispositivo para el procesamiento y análisis de una muestra biológica incluyendo el dispositivo al menos una cámara de procesamiento que, en el uso, está sellada con respecto al entorno externo. Así, el procesamiento de una muestra biológica se puede llevar a cabo con bajo riesgo de contaminación del entorno o al entorno. Preferiblemente, el dispositivo está adaptado para usar reactivos de procesamiento tanto sólidos como líquidos. Es especialmente preferible que los reactivos liofilizados estén precargados en el dispositivo antes de su envío a un usuario. Así, los reactivos liofilizados pueden cargarlos en el dispositivo operarios expertos en una instalación limpia y el dispositivo puede enviársele a un usuario in situ que puede no tener acceso a tal instalación limpia.

60 En una realización, la invención puede proporcionar un dispositivo para el procesamiento y análisis de una muestra incluyendo una pluralidad de cámaras de procesamiento acopladas en serie por conductos, por ejemplo, por tubos capilares. Tal dispositivo incluiría un orificio acoplado, mediante un conducto, a una primera cámara de la serie para la introducción de una muestra y una cámara de análisis acoplada, mediante un conducto, a una última cámara de procesamiento de la serie. El dispositivo puede incluir medios para crear presiones diferenciales en los conductos de modo que la muestra pueda pasar de una cámara a otra.

65 Pueden producirse presiones diferenciales por un vacío parcial aplicado a los conductos. Un medio conveniente para crear una presión diferencial puede ser el uso de accionadores de émbolo. Tales accionadores de émbolo podrían

ser accionados por un usuario humano in situ o, alternativamente, pueden ser accionados por una máquina adecuada.

5 La invención puede incluir así un sistema incluyendo un dispositivo que tiene una pluralidad de cámaras de procesamiento acopladas en serie por conductos, como se ha descrito anteriormente, y una máquina, en la que encaje el dispositivo, que sea adecuada para operar automáticamente el dispositivo.

10 Un método de procesar una muestra dentro de un dispositivo según una cuarta realización de la invención incluye los pasos de introducir la muestra en una primera cámara de procesamiento de la serie, realizar un primer paso de procesamiento, mover la muestra a una segunda cámara de la serie, realizar un segundo paso de procesamiento en el que el movimiento de la muestra dentro del dispositivo es efectuado por presiones diferenciales.

15 Ventajosamente, una muestra puede mezclarse durante el procesamiento por la turbulencia que se produce moviéndola repetidas veces hacia atrás y hacia delante a través de conductos entre cámaras adyacentes. Tal mezcla puede ser útil donde un protocolo de procesamiento concreto requiere agitación de una muestra.

Puede ser ventajoso desechar el dispositivo después de completar el análisis en la muestra procesada.

20 Donde el protocolo de procesamiento implica amplificación y detección de ácido nucleico, puede ser ventajoso realizar un tratamiento para neutralizar previas reacciones de procesamiento o para desactivar producto amplificado para la activación de nuevas reacciones de amplificación. Así, puede ser ventajoso tratar el dispositivo (por ejemplo, un dispositivo según cualquier realización o aspecto aquí descrito) y el post-análisis de la muestra usada para contribuir a evitar la contaminación del punto de uso. Por ejemplo, para contribuir a evitar la contaminación por transporte de amplicones, el amplicón que quede en el dispositivo después de un paso de detección podría ser tratado con agentes hidrolizantes o de modificación de ácido nucleico que eviten la inicialización de más reacciones de amplificación. La descontaminación puede ser especialmente deseable donde haya que comprobar lotes de muestras en el mismo lugar.

30 Tal tratamiento de descontaminación descrito en la Patente de Estados Unidos número 5.035.996 (Hartley, Life Technologies, Inc) implica la incorporación al producto amplificado de una base de ribo- o deoxi-nucleósido trifosfato (rN-TP o dNTP) que no se encuentra en general en la muestra a analizar: por ejemplo, dUTP en el caso de análisis de ADN. El producto amplificado tendrá así una secuencia que tendrá uracil en múltiples posiciones. La enzima uracil ADN glicosilasa (UDG) se añade a la muestra antes de la amplificación. Esto producirá hidrólisis de enzima de cualquier producto de reacción contaminante (conteniendo Uracil) sin afectar al ADN natural de la muestra.

35 Preferiblemente, la descontaminación es un tratamiento químico o reactivo que no solamente modifica, sino que también degrada ácido nucleico, por ejemplo, degradación no enzimática de ácido nucleico con nucleasas químicas. Se conocen en la técnica ejemplos de nucleasas químicas, por ejemplo, complejos de quelatos metálicos divalentes, tales como fenantrolina de cobre-Cu (II) o desdoblamiento de ascorbato-Cu (II) como describen Sigman D. S. y colaboradores (J. Biol. Chem (1979) 254, 12269-12272) y Chiou S. (J. Biochem (1984) 96, 1307-1310).

40 Un reactivo de descontaminación podría ser distribuido convenientemente a la cámara de procesamiento del dispositivo, después del análisis de la muestra, usando una cámara de reactivo acoplable, como se ha descrito anteriormente. Por lo tanto, el dispositivo puede estar precargado tanto con reactivos de procesamiento como con un reactivo de tratamiento, o descontaminación, post-análisis. Los métodos alternativos para administración de reactivos de descontaminación incluyen la administración con jeringa Luer Lock o a través de un tabique.

Realizaciones específicas

50 Ahora se describirán realizaciones específicas de la invención a modo de ejemplo, con referencia a los dibujos en los que:

La figura 1A es un dispositivo según una primera realización de la invención visto desde arriba.

55 La figura 1B es un dispositivo según la figura 1A visto desde abajo.

La figura 1C es una vista en planta del dispositivo de la figura 1A.

60 La figura 1D es una vista en sección a lo largo de la línea A-A representada en la figura 1C.

La figura 1E es una vista de proyección de un elemento de sellado usado en el dispositivo de la figura 1A, que representa crestas de sellado de perfil de aro en v.

65 La figura 1F es una vista en planta del elemento de sellado de la figura 1E.

La figura 1G es una vista en sección a lo largo de la línea D-D representada en la figura 1F.

- La figura 2 es una vista despiezada del dispositivo según una primera realización de la invención.
- 5 La figura 3 es un diagrama de flujo que ilustra los pasos del método implicados al realizar un ensayo usando un dispositivo según la invención.
- La figura 4A es una vista tres cuartos de un dispositivo según una segunda realización de la invención con su cámara de procesamiento en una posición para recibir una muestra.
- 10 La figura 4B representa el dispositivo según la segunda realización de la invención con la cámara de procesamiento sellada dentro del alojamiento de dispositivo.
- La figura 4C representa el dispositivo según la segunda realización de la invención con la cámara de procesamiento colocada debajo de una abertura de una primera cámara de reactivo.
- 15 La figura 4D representa el dispositivo según la segunda realización de la invención con la cámara de procesamiento colocada en una posición de incubación entre las cámaras de reactivo primera y segunda.
- La figura 4E representa el dispositivo según la segunda realización de la invención con un medio de análisis de tira de prueba que entra en contacto con la muestra en la cámara de procesamiento.
- 20 La figura 5A ilustra una cámara acoplable de reactivo adecuado para contener un reactivo líquido.
- La figura 5B ilustra la cámara acoplable de reactivo de la figura 5A después del accionamiento para liberar su contenido.
- 25 La figura 6A es una vista tres cuartos de un dispositivo según una tercera realización de la invención.
- La figura 6B es una vista despiezada del dispositivo de la figura 6A.
- 30 La figura 7 es una vista en perspectiva de un dispositivo según una cuarta realización de la invención, visto desde el lado.
- La figura 8 es una vista en perspectiva del dispositivo según la cuarta realización de la invención que representa la placa de prueba y la placa de émbolo desacopladas.
- 35 La figura 9 es una vista lateral cortada del dispositivo de la figura 7, que representa cámaras de procesamiento y capilares en la placa de prueba.
- La figura 10 es una vista despiezada de la placa de prueba del dispositivo de la figura 7.
- 40 La figura 11 es una vista despiezada de la placa de émbolo del dispositivo de la figura 7.
- La figura 12 es una vista lateral cortada de una porción del dispositivo de la figura 7 que ilustra un método de usar el dispositivo de la figura 7.
- 45 La figura 13 es una vista lateral cortada de una porción del dispositivo de la figura 7 que ilustra un método de usar el dispositivo de la figura 7.
- La figura 14 es una vista lateral cortada de una porción del dispositivo de la figura 7 que ilustra un método de usar el dispositivo de la figura 7.
- 50 La figura 15 es una vista lateral cortada de una porción del dispositivo de la figura 7 que ilustra un método de usar el dispositivo de la figura 7.
- 55 La figura 16 es una vista lateral cortada de una porción del dispositivo de la figura 7 que ilustra un método de usar el dispositivo de la figura 7.
- La figura 17 es una vista lateral cortada de un dispositivo según una quinta realización de la invención.
- 60 La figura 18 es una vista lateral cortada de un dispositivo según una sexta realización de la invención.
- La figura 19 es una vista en perspectiva del dispositivo según la figura 18.
- 65 La figura 20 es una vista en perspectiva del dispositivo según la figura 18.

La figura 21 es una vista superior del dispositivo según la figura 18.

Una realización preferida de un dispositivo según la invención se ilustra en las figuras 1A, 1B, 1C, 1D, 1E, 1F, 1G y 2.

5 El dispositivo 10 incluye un cuerpo sustancialmente circular, o aparato de colocación 20. El aparato de colocación incluye dos porciones, una porción superior 21 y una porción inferior 22, de las que ambas son circulares y pueden enganchar rotativamente una con otra alrededor de un punto central común.

10 El dispositivo incluye además cámaras de reactivo primera 30, segunda 40 y tercera 50 y una cámara de analizador 100 que cuelga de la porción superior del aparato de colocación, y una cámara de procesamiento 60 que cuelga de la porción inferior del aparato de colocación.

15 La porción inferior tiene un labio circular circunferencial que se extiende hacia abajo 23, cuyo borde inferior actúa como un soporte para el dispositivo durante el procesamiento. La cámara de procesamiento está colocada en el labio circular en un radio fijo desde el punto central.

20 La porción superior tiene un diámetro ligeramente más grande que el labio circular de la porción inferior. La porción superior tiene una faldilla que cuelga hacia abajo alrededor de toda su circunferencia y que encaja sobre y engancha con el elemento de sellado y el labio circular de la porción inferior, permitiendo este enganche que la porción superior gire con relación a la porción inferior alrededor del punto central común de ambas porciones superior e inferior.

25 La cámara de procesamiento tiene una abertura 62 definida por una entrada 63. La entrada a la cámara de procesamiento 63 está dispuesta de manera que esté en el mismo plano que, es decir, a nivel con, el borde superior del labio circular. La cámara de procesamiento propiamente dicha cuelga de la porción inferior y se define por las paredes de la cámara de procesamiento. Un elemento de sellado está dispuesto de modo que esté fijado con relación a la porción superior y de esta manera se puede mover con relación a la porción inferior.

30 La porción superior soporta las cámaras de reactivo primera, segunda y tercera y la cámara de analizador. Cada una de estas cámaras está asociada con una abertura respectiva definida en la porción superior en un radio fijo desde el centro de la porción superior de tal manera que cada abertura, cuando la porción superior se haya girado apropiadamente con relación a la porción inferior, pueda solaparse con la abertura de cámara de procesamiento. Esto permite efectuar, por orden, la comunicación entre la cámara de procesamiento y cada una de las cámaras de
35 reactivo y la cámara de analizador.

Adicionalmente, la porción superior define una abertura de acceso, u orificio de acceso, 70 en un radio fijo desde el centro de la porción superior de tal manera que pueda solapar con la abertura de cámara de procesamiento. Esta
40 abertura de acceso u orificio de acceso está cubierta con una lámina de sellado extraíble 80 para evitar la contaminación del dispositivo por el entorno externo antes del uso. Cuando el dispositivo está preparado para uso, la abertura de acceso en la porción superior está alineada con la cámara de procesamiento en la porción inferior.

45 Un elemento de sellado 90 incluye un disco de material elástico, por ejemplo, caucho, que tiene una superficie superior y otra inferior. Se definen seis agujeros circulares a través del grosor del elemento de sellado y cada agujero está delineado en la superficie superior por una arista de colocación de perfil cuadrado 91 y en la superficie inferior por una arista de sellado de perfil en v, o aro en v 92. Toda la circunferencia de la superficie inferior del elemento de sellado también está delimitada por un aro en v 92.

50 El aro en v contacta una superficie plana de la porción inferior, formando por ello una junta estanca. Así, las aberturas de cámara de reactivo son accesibles a través de aberturas asociadas en el elemento de sellado y las cierra, o bloquea, la superficie plana de la porción inferior.

55 La rotación de la porción inferior con relación a la porción superior permite que la cámara de procesamiento se mueva a relación de solapamiento con cada abertura por orden. Al hacerlo, se realiza comunicación entre cada cámara de reactivo y la cámara de procesamiento por orden.

60 El elemento de sellado tiene agujeros definidos a su través que se alinean con las respectivas aberturas en la porción superior. Las crestas en el lado superior del elemento de sellado acoplan con rebajes definidos en la porción superior para colocar el elemento de sellado de tal manera que sus agujeros se alineen con las aberturas en la porción superior.

65 El elemento de sellado puede tener un diseño diferente al ilustrado en las figuras 1A a 2. Por ejemplo, el elemento de sellado solamente puede definir un solo agujero pasante, que se encuentra sobre la abertura a la cámara de procesamiento y, en este caso, puede estar fijo con relación a la porción inferior y moverse con relación a la porción superior.

En este caso, el elemento de sellado serviría para bloquear cada una de las aberturas en la porción superior hasta que las porciones superior e inferior se giren de tal manera que una abertura concreta esté alineada con la abertura de la cámara de procesamiento. Por ejemplo, si la cámara de procesamiento se pone en alineación con la primera abertura de cámara de reactivo, el agujero en el elemento de sellado también se alinea con la abertura de la primera cámara de reactivo y el contenido de la primera cámara de reactivo, previamente mantenido en la primera cámara de reactivo por el elemento de sellado, cae a la cámara de procesamiento.

El elemento de sellado ilustrado utiliza perfiles de sellado del tipo de aro en v; sin embargo, se podría usar otros perfiles de sellado tales como perfiles de junta tórica o una combinación de diferentes perfiles; por ejemplo, se podría usar un aro en v para el sellado alrededor de la circunferencia del elemento de sellado que sirve para sellar el dispositivo del entorno externo y se podría usar juntas tóricas para el sellado interno de las cámaras individuales dentro del dispositivo.

Se podría usar otros mecanismos y métodos de sellado, por ejemplo, en base a variaciones del sellado Luer-Lock, de frita y bayoneta, roscas o émbolo.

La rotación de la porción inferior del cuerpo, o aparato de colocación, con relación a la porción superior mueve así la cámara de procesamiento entre seis posiciones, o estaciones, cada una de las cuales permite un paso en un protocolo de procesamiento para el que el dispositivo está diseñado. En una primera posición, la cámara de procesamiento está enfrente del orificio de acceso 70 para recibir una muestra. En una segunda posición está enfrente de una sección en blanco 25 de la porción superior, que sirve para sellar la cámara de procesamiento sin añadir ningún reactivo, para un paso de procesamiento de incubación. En las posiciones tercera, cuarta y quinta, la cámara de procesamiento se alinea con las cámaras de reactivo primera 30, segunda 40 y tercera 50 para la administración de reactivos y en una sexta posición se alinea con la cámara de analizador 100. Un aparato de trinquete (no representado) actúa entre las porciones superior e inferior del aparato de colocación para evitar la rotación en una dirección inversa y para colocar el aparato de colocación en posición durante el procesamiento en cada posición o estación. En realizaciones alternativas, se puede definir cualquier número adecuado y disposiciones en la porción superior del aparato de colocación dependiendo del protocolo de procesamiento para el que el dispositivo esté diseñado.

La primera cámara de reactivo 30 tiene forma de un blíster o célula definido por paredes que se extienden desde la porción superior del aparato de colocación, y contiene un reactivo de procesamiento seco. El reactivo de procesamiento está contenido en la cámara de reactivo por las paredes de cámara de reactivo y el elemento de sellado, que bloquea la abertura asociada con la primera cámara de reactivo.

La segunda cámara de reactivo 40 es una cámara acoplable por separado que contiene un reactivo líquido. La segunda cámara de reactivo acopla con la porción superior en su abertura asociada por medio de un encaje de bayoneta. Cuando está acoplado a la porción superior del aparato de colocación, el reactivo líquido dentro de la segunda cámara de reactivo puede ser dispensado a través de su abertura asociada. Como en la primera cámara de reactivo, el elemento de sellado sirve para bloquear la abertura hasta que la abertura se alinee con la cámara de procesamiento, punto en el que se puede dispensar líquido de la segunda cámara de reactivo a través de la abertura y a través de la abertura de cámara de procesamiento a la cámara de procesamiento.

Las figuras 5A y 5B ilustran una cámara de reactivo acoplable por separado 900 adecuada para contener reactivos líquidos en un dispositivo según otra realización de la invención. La cámara acoplable define un espacio interno 910 para contener un reactivo líquido. Una porción inferior de la cámara acoplable de forma extraíble está adaptada para permitir un encaje por empuje con el dispositivo en la abertura de cámara asociada definida en el dispositivo. (Ésta es una construcción alternativa al encaje de bayoneta descrito en la primera realización). Una disposición de tope 930 incluye una espiga 940 que se extiende a través del espacio interno 910 y sella un agujero 950 en la parte inferior del espacio interno. Cuando la disposición de tope se eleva, como se ilustra en la figura 5B, la espiga 940 sale del agujero 950. Un agujero de ventilación 960 cerca de una porción superior del espacio interno permite que entre aire al espacio interno, desplazando así el líquido contenido en el espacio interno a través del agujero 950. El agujero de ventilación está dispuesto de modo que el aire sea aspirado desde dentro del dispositivo sellado y no del entorno externo, para reducir todo riesgo de contaminación durante el procesamiento.

Se podría usar métodos alternativos para administración de reactivo líquido, por ejemplo, con una jeringa montada en el dispositivo mediante un sistema Luer-lock o de bayoneta.

La tercera cámara de reactivo tiene forma de un blíster definido por paredes que se extienden desde la porción superior de la misma forma que la primera cámara de reactivo definida anteriormente. La tercera cámara de reactivo contiene reactivos secos.

La cámara de analizador se define en la porción superior y se extiende verticalmente con respecto a ella. Esta cámara de analizador es una cámara fina alta para contener una tira de prueba. La tira de prueba se mantiene en la cámara de analizador por el elemento de sellado de la misma forma que la descrita anteriormente con respecto a reactivos secos de procesamiento en las cámaras de reactivo primera y tercera.

La cámara de analizador tiene una pared transparente para que la tira de prueba pueda ser inspeccionada visualmente.

5 El dispositivo de la realización está diseñado para prueba de ácido nucleico in situ. En tal prueba, una muestra de sangre debe ser procesada por un número de pasos para amplificar el ácido nucleico después de que en la muestra procesada se compruebe la presencia de un ácido nucleico concreto utilizando una tira de prueba. El sistema cerrado de la presente invención es especialmente ventajoso para evitar la contaminación con ácidos nucleicos inestables.

10 El método siguiente para usar el dispositivo se refiere a un método de amplificar y detectar un ácido nucleico y se refiere a la figura 3, un diagrama de flujo que ilustra los pasos implicados en pruebas de ácido nucleico.

15 Se recoge una muestra de un paciente y se pre-procesa, en los pasos 1 a 3, antes de la introducción al dispositivo. Los pasos de pre-procesamiento pueden ser cualesquiera pasos de pre-procesamiento adecuados como los actualmente conocidos en la técnica para uso con kits comercialmente disponibles para extracción de ácido nucleico.

20 Los procedimientos de pre-procesamiento simples pueden implicar lisis de la muestra por calor o tratamiento químico y dilución de la muestra antes de la amplificación. Estos son especialmente aplicables a tipos de muestras que tienen altos números de copia de ácidos nucleicos deseados, por ejemplo, ARN ribosomal presente en miles de copias/célula.

25 La muestra se añade a una solución tampón de lisis (paso 1) y se incuba (paso 2). A continuación se diluye la muestra con una solución tampón adecuada (paso 3).

El dispositivo se prepara acoplando la cámara de reactivo acoplable por separado 40 conteniendo una solución tampón de detección a la porción superior del aparato de colocación 20.

30 Se quita la lámina de sellado 80 que sella el orificio de acceso 70 y se introduce la muestra pre-procesada a través del orificio de acceso a la cámara de procesamiento 60 (paso 4). La cámara de procesamiento contiene un primer reactivo congelado en seco precargado. La porción superior del aparato de colocación se gira entonces con relación a la porción inferior y la cámara de procesamiento de modo que la cámara de procesamiento se aleje del orificio de acceso y selle dentro del cuerpo, alineado con la sección en blanco 25 de la porción superior, y a continuación se agita el dispositivo para mezclar el primer reactivo congelado en seco con la muestra.

35 A continuación se coloca el dispositivo en una fuente de calor incluyendo un bloque de calentamiento conformado para recibir la base de la cámara de procesamiento, y se incuba la muestra dentro de la cámara (paso 5).

40 Se separa el dispositivo de la fuente de calor y las porciones superior e inferior se giran una con relación a otra hasta que la abertura de cámara de procesamiento se solapa con la abertura asociada con la primera cámara de reactivo 30, que contiene un segundo reactivo congelado en seco. El segundo reactivo congelado en seco cae a la cámara de procesamiento (paso 6).

45 El dispositivo se coloca de nuevo en la fuente de calor y se incuba antes de separarlo de la fuente de calor (paso 7).

50 Las porciones superior e inferior del dispositivo de colocación se giran más hasta que la abertura de la cámara de procesamiento se alinea con la abertura asociada con la segunda cámara de reactivo. La segunda cámara de reactivo acoplable tiene una disposición de tope que hay que quitar de modo que su contenido de solución tampón de detección de líquido pueda fluir a la cámara de procesamiento. Se quita el tope y se añade la solución tampón de detección a la cámara de procesamiento (paso 8).

55 Las porciones superior e inferior del dispositivo de colocación se giran más hasta que la abertura de la cámara de procesamiento se alinea con la abertura asociada con la tercera cámara de reactivo, conteniendo reactivos congelados en seco tercero y cuarto. Estos reactivos se añaden a la cámara de procesamiento (paso 9).

60 Las porciones superior e inferior del dispositivo de colocación se giran a una posición final en la que la abertura de cámara de procesamiento se solapa con la abertura asociada con la cámara de analizador conteniendo una tira de prueba. La tira de prueba cae a la cámara de procesamiento de modo que su extremo esté en contacto con la muestra procesada (paso 10).

La muestra procesada sube por la tira de prueba (paso 11).

65 Los resultados de la prueba se obtienen leyendo una señal visual en la tira de prueba (paso 12).

Puede haber más pasos, por ejemplo, un paso para tratar la muestra después del análisis para evitar la contaminación del entorno alrededor del dispositivo y/o un paso de desecho del dispositivo.

Las figuras 4A-4E ilustran una segunda realización de un dispositivo según la invención.

5 El dispositivo 200 tiene un aparato de colocación o cuerpo 270, dentro del que se define un paso de sección transversal rectangular. A lo largo de una pared superior del paso están colocados un orificio de acceso 280, tres cámaras de reactivo que cuelgan del aparato de colocación 220, 230 y 240, y una cámara de análisis 250 que también cuelga del aparato de colocación. La cámara de análisis contiene una tira de prueba 255 para análisis de la muestra procesada. Entre el orificio de acceso y la primera cámara de reacción, y entre las cámaras de reacción, secciones en blanco de la pared superior del paso proporcionan posiciones o estaciones de mezcla e incubación. El dispositivo incluye además una cámara de procesamiento 210 colocada o moldeada dentro de un bloque de caucho, que encaja de forma sellada dentro del paso, contactando la abertura de cámara de procesamiento la pared superior del aparato de colocación, de modo que esté sellada con respecto al entorno externo cuando esté dentro del aparato de colocación.

20 Una varilla de empuje o émbolo de extremo 260 permite al usuario impulsar la cámara de procesamiento a lo largo del paso dentro del aparato de colocación 270. También se utiliza un dispensador del tipo de émbolo 251 para retener la tira de prueba dentro de la cámara de análisis hasta que se necesite. Podría usarse un aparato de trinquete para evitar que la varilla de empuje se retire y para contribuir a la colocación de la cámara de procesamiento en alguna de varias posiciones o estaciones.

25 El acceso inicial a la cámara de procesamiento lo proporciona el orificio de acceso 280 después de la extracción de una lámina de sellado (no representada).

Cada cámara de reactivo tiene una abertura asociada definida en el aparato de colocación 222, 232 y 242 a través de la que puede pasar reactivo contenido en la cámara de reactivo.

30 La cámara de procesamiento es móvil dentro del aparato de colocación con relación a las aberturas asociadas con las cámaras de reactivo. En el ejemplo ilustrado en la figura 4A, las cámaras de reactivo 220 y 240 contienen bolas de reactivo congelado en seco 221 y 241, y la cámara de reactivo 230 contiene un reactivo líquido 231.

35 Cada cámara de reactivo incluye un tubo hueco con una abertura en un extremo que pasa a través de la pared superior del aparato de colocación. En el extremo opuesto de cada cámara de reactivo, un émbolo 225, 235 y 245 sella el extremo opuesto de la cámara y puede ser accionado para introducir el reactivo respectivo a la cámara de procesamiento a través de la abertura de la cámara de reactivo, cuando la abertura de cámara de procesamiento está dispuesta en relación de solapamiento con la abertura concreta de la cámara de reactivo.

40 En el uso, se carga una muestra en la cámara de procesamiento a través del orificio de acceso de la cámara de procesamiento. Se utiliza la varilla de empuje para deslizar la cámara de procesamiento dentro del aparato de colocación a una posición de incubación 290, ilustrada en la figura 4B. En esta posición, la cámara de procesamiento está sellada con respecto al entorno externo.

45 Después de un paso de incubación, la cámara de procesamiento es movida a una posición directamente debajo de la abertura asociada con la primera cámara de procesamiento 220, en la que su abertura está en relación de solapamiento con la primera abertura de cámara de reactivo 222.

50 El émbolo en la primera cámara de procesamiento es empujado para distribuir la bola de reactivo 221 a la cámara de procesamiento (figura 4C).

El émbolo es movido a una segunda posición de incubación 295 ilustrada en la figura 4D.

55 Después de la segunda incubación, la cámara de procesamiento es movida directamente debajo de la abertura 232 asociada con la segunda cámara de reactivo 230. El émbolo de la segunda cámara de reactivo es empujado para distribuir el reactivo contenido dentro de ella 231 a la cámara de procesamiento.

60 La cámara de procesamiento se mueve entonces directamente debajo de la tercera abertura de cámara de reactivo 242 y se empuja el émbolo para distribuir el reactivo 241 contenido en la tercera cámara de reactivo a la cámara de procesamiento.

65 El reactivo procesado pasa entonces, dentro de la cámara de procesamiento, a una posición directamente debajo de la cámara de análisis 250 conteniendo la tira de prueba 255. El émbolo de la cámara de análisis 251 es empujado para dejar que la tira de prueba caiga a la cámara de procesamiento y entre en contacto con la muestra procesada (figura 4E).

Una tercera realización de la invención se ilustra en las figuras 6A y 6B y se usan los mismos números de referencia que para los componentes usados en la primera realización ilustrada en las figuras 1A a 2 y descrita anteriormente. Esta tercera realización es igual que la primera realización en todos los aspectos, a excepción de que la cámara de analizador se define en un aspecto horizontal en la porción superior del aparato de colocación con el fin de contribuir a hacer más compacto todo el dispositivo.

El dispositivo de la tercera realización se usa de la misma forma que la descrita anteriormente con respecto a la primera realización, a excepción de que todo el dispositivo debe girarse 90 grados para que la muestra procesada pueda contactar la tira de prueba contenida en la cámara de analizador después de que la abertura de cámara de procesamiento se haya puesto en correspondencia o relación de solapamiento con la abertura asociada con la cámara de analizador.

Una realización de un dispositivo según la invención se ilustra en las figuras 7 a 11, y los pasos ejemplares del método para usar el dispositivo se ilustran en las figuras 12 a 16.

El dispositivo ilustrado en las figuras 7 a 16 tiene dos porciones; una primera porción, o placa de prueba 4010, dentro de la que una muestra es procesada y analizada, y una segunda porción, o placa de émbolo 4020, acoplable a la placa de prueba y que soporta un número de jeringas o émbolos. Los diferentes émbolos tienen funciones diferentes, por ejemplo, un émbolo puede usarse para introducir la muestra en la placa de prueba, otro puede ser utilizado para distribuir una solución de procesamiento y otros pueden usarse para mover la muestra a través de la placa de prueba, como se describe más adelante. La placa de prueba y la placa de émbolo se empaquetan por separado para almacenamiento y transporte y deben montarse antes del uso.

En la realización preferida, la placa de prueba tiene cámaras de procesamiento primera 4030, segunda 4040 y tercera 4050 definidas dentro de ella; estas tres cámaras de procesamiento están conectadas una a otra en serie por capilares o conductos de conexión primero 4060 y segundo 4070.

El diámetro interno de los capilares es tal que puede pasar líquido acuoso a través de los capilares a la aplicación de presión. Los capilares no deberán ser demasiado pequeños puesto que esto podría perturbar físicamente la muestra, pero tampoco demasiado grandes puesto que esto puede permitir demasiado flujo de aire alrededor del sistema tanto en el uso como durante la incubación. La longitud de los capilares también puede ser importante. Si los tubos son demasiado cortos, entonces puede producirse flujo de aire a través de los tubos durante la incubación, y si los tubos son demasiado largos, entonces el movimiento de la muestra entre cámaras puede ser demasiado difícil. Un tubo capilar práctico puede tener un área en sección transversal de 0,5 mm cuadrados y una longitud entre cámaras de entre 15 y 25 mm, preferiblemente de aproximadamente 20 mm.

La placa de prueba también define una cámara de análisis 4080 conectada a la tercera cámara de procesamiento por un tercer capilar de conexión 4090. La cámara de análisis tiene una pared transparente para que el usuario pueda tener una indicación visual de los resultados de un análisis realizado dentro de la cámara. Una pared transparente también puede permitir la lectura automatizada de una señal de análisis, por ejemplo, por un lector automático de tiras de prueba.

Orificios de émbolo primero 4101, segundo 4102, tercero 4103, cuarto 4104, quinto 4105 y sexto 4106, cada uno de los cuales se puede fijar o acoplar con una boquilla de un émbolo, están dispuestos linealmente en un lado de la placa de prueba. La alineación de los émbolos permite ventajosamente el empaquetado eficiente del dispositivo durante el transporte, y puede permitir un montaje más fácil al acoplar la placa de émbolo a la placa de prueba.

Los orificios primero y segundo (4101 y 4102) están acoplados respectivamente a la primera cámara de procesamiento mediante capilares de acceso primero 4111 y segundo 4112. El tercer orificio está acoplado a la segunda cámara mediante un tercer capilar de acceso 4113. Los orificios cuarto y quinto están acoplados respectivamente a la tercera cámara de procesamiento mediante capilares de acceso cuarto 4114 y quinto 4115. El sexto orificio está acoplado a la cámara de análisis mediante un sexto capilar de acceso 4116.

Al usuario final se le suministra el dispositivo con las cámaras de procesamiento precargadas con reactivos congelados en seco o liofilizados y la cámara de análisis precargada con una tira de prueba. La figura 10 ilustra una vista despiezada de la placa de prueba que muestra reactivos congelados en seco 4120 asociados con las cámaras primera, segunda y tercera y una tira de prueba 4130 asociada con la cámara de análisis.

La placa de émbolo 4020 incluye un bastidor 4200 que soporta jeringas o émbolos primero 401, tercero 403, cuarto 404, quinto 405 y sexto 406. Cada émbolo tiene una boquilla (411 a 416) que puede acoplarse a un orificio en la placa de prueba y el bastidor sujeta cada émbolo de tal manera que esté en alineación con su orificio respectivo (es decir, el primer émbolo engancha con el primer orificio, el tercer émbolo con el tercer orificio, y así sucesivamente) cuando la placa de prueba y la placa de émbolo entran en enganche. La placa de émbolo también soporta un aro de guía 420 para guiar un segundo émbolo 402 a alineación con el segundo orificio 4102. Este segundo émbolo se usa para introducir una muestra líquida a la primera cámara de procesamiento mediante el segundo orificio y no está fijado a la placa de émbolo.

Juntas tóricas 4230 contribuyen a proporcionar un sellado estanco a gases y líquido entre cada émbolo en la placa de émbolo y su orificio respectivo en la placa de prueba.

- 5 Los émbolos primero 401, tercero 403, cuarto 404 y sexto 406 contienen un gas, preferiblemente aire. El quinto émbolo 405 está precargado con una solución tampón líquida para uso en el procesamiento de la muestra.

10 Tal como se suministra, la placa de prueba está precargada con reactivos congelados en seco o liofilizados y la placa de émbolo está precargada con una solución tampón líquida en el quinto émbolo. La placa de prueba y la placa de émbolo se juntan en una relación de acoplamiento (como se ilustra en la figura 7) de tal manera que cada boquilla de émbolo forme una junta estanca con su orificio respectivo.

15 Para usar el dispositivo, en primer lugar se enganchan la placa de prueba y la placa de émbolo. Preferiblemente, la relación de acoplamiento entre la placa de prueba y la placa de émbolo es un acoplamiento de bloqueo que no se puede romper una vez hecho. Esto puede asegurar una contención segura del contenido del dispositivo durante el procesamiento. A continuación se carga una muestra líquida en el segundo émbolo 402 y este émbolo se acopla después al dispositivo, a través de la guía 420 en la placa de émbolo, de modo que enganche con el segundo orificio 4102 en la placa de prueba. Todos los orificios de acceso están bloqueados ahora por las boquillas de émbolo y las cámaras de procesamiento (4030, 4040, y 4050) del dispositivo están selladas así con respecto al entorno externo.

20 Ventajosamente, tanto la placa de prueba como la placa de émbolo pueden tener juntas estancas, por ejemplo, láminas de sellado, sobre las aberturas/partes de acoplamiento para evitar la contaminación. Habrá que quitar tales juntas estancas antes de acoplar las dos placas. Con referencia a la figura 12, la muestra se añade a la primera cámara de procesamiento 4030 accionando el segundo émbolo 402 y arrastrando simultáneamente el tercer émbolo 403 de modo que la muestra sea empujada a través del segundo orificio 4102 y a través del segundo capilar de acceso 4112. La muestra hidrata el reactivo seco contenido en la primera cámara de procesamiento y luego se mezcla mediante una combinación de empuje y tracción en los émbolos segundo y tercero (402 y 403). El arrastre o la tracción del tercer émbolo mientras se empuja el segundo émbolo hace que se forme una presión diferencial que empuja la muestra en la primera cámara de procesamiento 4030 a lo largo del primer capilar de conexión 4060 hacia la segunda cámara de procesamiento 4040. Antes de que la muestra haya llegado a la segunda cámara de procesamiento, el tercer émbolo es empujado y el segundo émbolo es movido para llevar de nuevo la muestra a la primera cámara de procesamiento. La repetición de este empuje/tracción de los émbolos segundo y tercero produce un flujo turbulento, de un lado al otro, que contribuye a mezclar la muestra y el reactivo.

35 Cuando la muestra se ha mezclado suficientemente, y después de llevar a cabo cualesquiera pasos de procesamiento adicionales, tal como un período de incubación, la muestra es movida a la segunda cámara de procesamiento 4040 accionando el primer émbolo 401 y empujando, así, la muestra líquida a través del primer capilar de conexión 4060 hacia la segunda cámara moviendo simultáneamente el tercer émbolo 403 (figura 13). La muestra se mezcla entonces con reactivo en la segunda cámara por una acción simultánea de empuje/tracción en los émbolos primero y tercero.

45 Cuando la muestra se ha mezclado suficientemente, y después de llevar a cabo cualesquiera pasos de procesamiento adicionales, tal como un período de incubación, la muestra es movida a la tercera cámara de procesamiento 4050 empujando el tercer émbolo y la muestra líquida a través del segundo capilar de conexión 4070 hacia la tercera cámara mientras se mueve simultáneamente el cuarto émbolo 404 (figura 14). La muestra se mezcla con reactivo en la tercera cámara por una acción simultánea de empuje/tracción en los émbolos tercero y cuarto.

50 La solución tampón líquida en el quinto émbolo 405 se añade a la tercera cámara, mediante el quinto orificio 4105 y el quinto capilar de acceso 4115, accionando el quinto émbolo y moviendo el sexto émbolo para igualar la presión (figura 15). Como antes, la mezcla de la muestra y la solución tampón se logra por una acción de empuje/tracción en los émbolos apropiados, en este caso los émbolos quinto y sexto.

55 Después de llevar a cabo cualesquiera pasos de procesamiento adicionales, la muestra es transferida a la cámara de análisis 4080 accionando el cuarto émbolo 404 y el sexto émbolo 406 para crear una presión diferencial que empuja la muestra a través del tercer capilar de conexión 4090 a la cámara de análisis (figura 16). La muestra, ahora procesada, sube por la tira de prueba y el resultado se puede ver visualmente a través de las paredes claras de la cámara de análisis.

60 En otras realizaciones, el número y la posición de los émbolos, la forma y la alineación de las cámaras de procesamiento y la longitud y la dirección de los capilares se pueden variar para mejorar características del dispositivo tales como la mezcla de la muestra con los reactivos. Las realizaciones quinta y sexta de un dispositivo según la invención se ilustran en las figuras 17 a 21 usando números de referencia equivalentes para componentes equivalentes descritos con respecto a la cuarta realización anterior; siendo la diferencia que los números de referencia empiezan con un 5 o un 6 respectivamente más bien que con un 4.

65

5 A modo de ejemplo, las cámaras de procesamiento en una realización del dispositivo ilustrado en las figuras 18 a 21 son estrechas y sustancialmente cilíndricas. Este diseño puede minimizar los efectos gravitacionales en la muestra. En la escala del dispositivo, la tensión superficial tiene un efecto mayor que la gravedad y las cámaras cilíndricas pueden optimizar el rendimiento en relación a la tensión superficial. Además, una cámara cilíndrica puede evitar que la muestra líquida “se pegue” como puede suceder cuando se empuje aire a través de un sistema con una cámara de procesamiento más esférica.

10 Puede ser posible distribuir un volumen definido de líquido, por ejemplo, la administración de un volumen definido de muestra a la primera cámara de procesamiento, por la introducción de una cámara intermedia con un volumen definido acoplada a una cámara de rebosamiento.

15 Aunque el dispositivo según la invención puede ser operado manualmente por un usuario, la simplicidad del diseño puede prestarse ventajosamente a operación automática. En tal caso, el dispositivo podría usar un cartucho en una máquina diseñada para realizar automáticamente un ciclo de prueba. Una máquina para esta finalidad estaría programada para accionar los émbolos en un orden específico dependiendo del protocolo de procesamiento deseado, y puede incluir un calentador para realizar los pasos de incubación que sean necesarios.

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo (10) para el procesamiento de una muestra, incluyendo:

5 un aparato de colocación (20),

una cámara de procesamiento (60) para recibir la muestra que tiene una abertura (62),

10 un número de cámaras de reactivo (30), teniendo cada cámara de reactivo una abertura asociada definida en el aparato de colocación, pudiendo moverse la cámara de procesamiento con relación a la(s) cámara(s) de reactivo para permitir la comunicación secuencial entre la cámara de procesamiento y cada cámara de reactivo, de tal manera que cada cámara de reactivo comunique con la cámara de procesamiento cuando su abertura asociada esté dispuesta en relación de solapamiento con la abertura de cámara de procesamiento,

15 **caracterizado porque** el dispositivo incluye además:

una cámara de analizador (100) para contener un analizador para analizar la muestra después del procesamiento, teniendo la cámara de analizador una abertura asociada definida en el dispositivo de tal manera que comunique con la cámara de procesamiento cuando su abertura asociada esté dispuesta en relación de solapamiento con la
20 abertura de cámara de procesamiento; y

un aparato de sellado (90) que sella la cámara de procesamiento y la(s) cámara(s) de reactivo con respecto al entorno externo de modo que el dispositivo proporciona un sistema cerrado y la muestra no puede escapar del dispositivo durante el procesamiento de la muestra.
25

2. Un dispositivo según la reivindicación 1, en el que el aparato de colocación incluye el aparato de sellado.

3. Un dispositivo según cualquier reivindicación precedente, en el que el dispositivo no es reutilizable, y/o

30 está destinado a procesar una muestra biológica, y/o

incluyendo además un orificio de acceso (70) que proporciona acceso externo inicial a la abertura de cámara de procesamiento para permitir la introducción de la muestra, preferiblemente en el que el orificio de acceso está protegido, antes de la introducción de la muestra, por una junta estanca extraíble (80).
35

4. Un dispositivo según cualquier reivindicación precedente, en el que

la cámara de procesamiento es móvil entre una pluralidad de posiciones discretas o estaciones y en al menos algunas de estas posiciones la abertura de cámara de procesamiento está dispuesta en relación de solapamiento con una abertura de cámara de reactivo, y/o
40

en el que al menos una de las cámaras de reactivo puede acoplarse al dispositivo, preferiblemente

en el que la, o cada, cámara acoplable forma una junta estanca cuando está acoplada al dispositivo, y/o en el que la gravedad sirve para introducir al menos un reactivo y/o el medio de análisis a la cámara de procesamiento, y/o
45

que tiene al menos un dispensador accionable para introducir un reactivo desde su cámara de reactivo a la cámara de procesamiento, y/o

50 adecuado para uso con un reactivo congelado en seco o liofilizado, y/o

adecuado para uso con un reactivo líquido, y/o en el que las cámaras de reactivo están precargadas con reactivos.

55 5. Un dispositivo según cualquier reivindicación precedente, en el que la cámara de analizador está precargada con un analizador, y/o

en el que el analizador es una tira de prueba, y/o en el que una pared de la cámara de analizador es sustancialmente transparente.

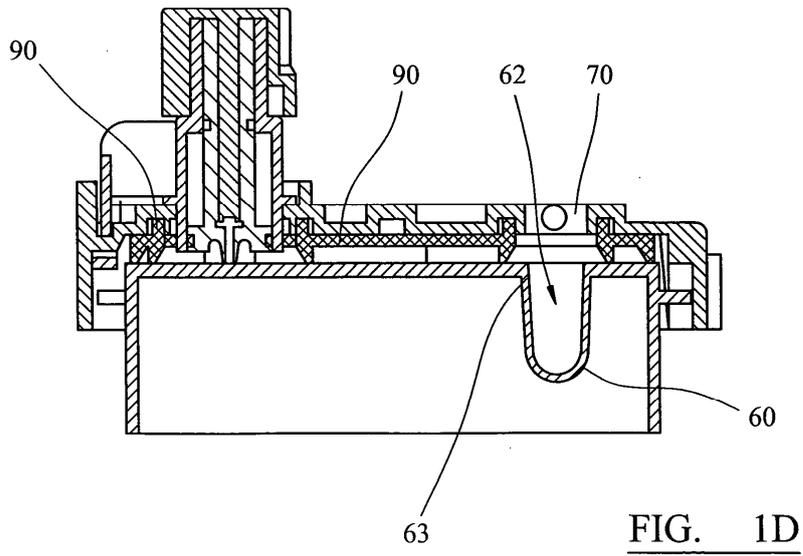
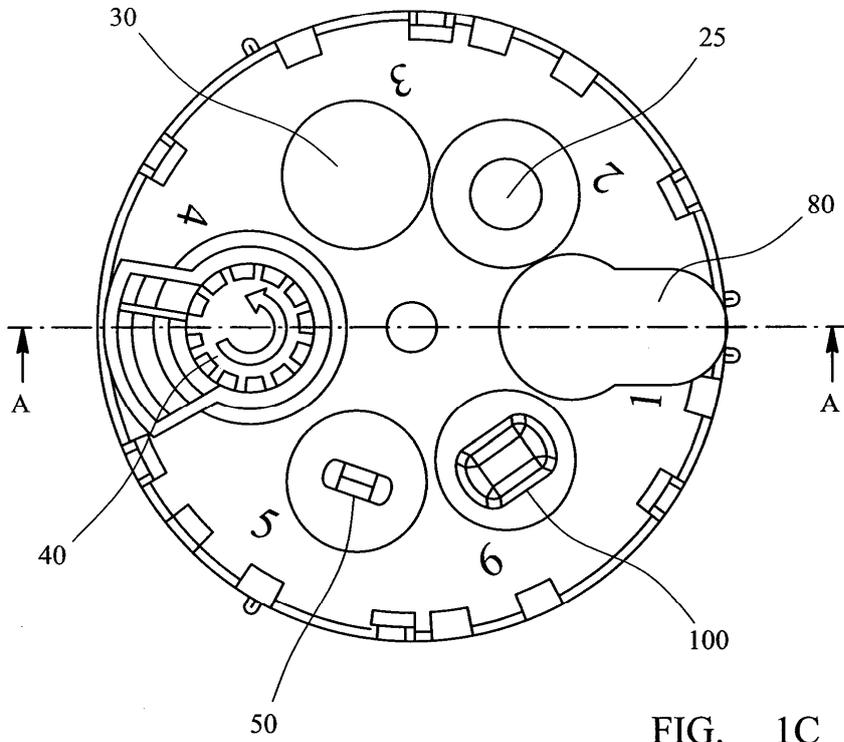
60 6. Un dispositivo según cualquier reivindicación precedente, en el que

el aparato de colocación incluye una porción inferior (22) y una porción superior (21) móvil con relación a la porción inferior, preferiblemente

65 en el que la cámara de procesamiento está conectada a la porción inferior y las aberturas asociadas de la cámara de reactivo se definen en la porción superior, y/o

- 5 en el que la porción superior y la porción inferior tienen sustancialmente forma de disco y son rotativas una con relación a otra alrededor de un punto central común, y/o incluyendo además un elemento de sellado dispuesto entre las porciones superior e inferior.
7. Un dispositivo según cualquier reivindicación precedente, en el que las aberturas asociadas de la cámara de reactivo están dispuestas en una disposición sustancialmente circular, o en una disposición sustancialmente lineal, y/o incluyendo tres cámaras de reactivo, cada una precargada con un reactivo, y/o incluyendo cuatro cámaras de reactivo, cada una precargada con un reactivo, y/o
- 10 en el que la cámara de procesamiento se precarga con un reactivo antes de la introducción de la muestra biológica, y/o
- 15 en el que el movimiento de la cámara de procesamiento es regulado por un aparato de trinquete.
8. Un sistema para el procesamiento de una muestra biológica incluyendo un dispositivo según alguna de las reivindicaciones 1 a 7, y una fuente de calor externa adaptada para enganchar con el dispositivo.
9. Un sistema según la reivindicación 8, en el que la fuente de calor está adaptada para enganchar con la cámara de procesamiento, y/o
- 20 incluyendo además al menos una cámara de reactivo acoplable, estando precargada con un reactivo la cámara de reactivo acoplable.
10. Un método de procesar y analizar una muestra en un dispositivo según la reivindicación 1, que tiene un aparato de colocación, una cámara de procesamiento, un número de cámaras de reactivo, una cámara de analizador, y un aparato de sellado que sella la cámara de procesamiento y la(s) cámara(s) de reactivo con relación al entorno externo de modo que el dispositivo proporciona un sistema cerrado y la muestra no puede escapar del dispositivo durante el procesamiento de la muestra, incluyendo los pasos de:
- 30 cargar la muestra en la cámara de procesamiento,
- mover la cámara de procesamiento después de cargar la muestra de tal manera que el aparato de sellado selle la muestra con relación al entorno externo,
- 35 mover la cámara de procesamiento con relación a la(s) cámara(s) de reactivo e introducir un primer reactivo en la cámara de procesamiento desde una primera cámara de reactivo,
- 40 en el que la muestra procesada resultante es analizada por un analizador contenido en la cámara de analizador del dispositivo.
11. Un método según la reivindicación 10, que incluye además mover la cámara de procesamiento con relación a la(s) cámara(s) de reactivo e introducir un segundo reactivo en la cámara de procesamiento desde una segunda cámara de reactivo.
- 45 12. Un método según la reivindicación 10 o 11, incluyendo además el paso de desechar el dispositivo después de analizar la muestra, y/o
- 50 que es un método de procesar y analizar una muestra biológica, y/o en el que hay entre dos y cinco cámaras de reactivo, conteniendo cada una un reactivo que se introduce en la cámara de procesamiento durante el procesamiento.
13. Un método según la reivindicación 12, en el que hay tres o cuatro cámaras de reactivo.
- 55 14. Un método según alguna de las reivindicaciones 10 a 13, en el que la cámara de procesamiento está precargada con un reactivo, y/o
- 60 incluyendo adicionalmente al menos un paso de incubar la muestra en la cámara de procesamiento a una temperatura predeterminada durante un período de tiempo predeterminado, y/o
- 65 incluyendo adicionalmente pasos de mezcla posteriores a la o cada introducción de reactivo de procesamiento.
15. Un método según alguna de las reivindicaciones 10 a 14, en el que el analizador es una tira de prueba que contacta la muestra procesada para realizar el análisis, y/o en el que el procesamiento implica un paso de amplificación para amplificar un ácido nucleico en la muestra, y/o en el que el paso de análisis implica la detección de un ácido nucleico presente en la muestra, y/o

en el que se lleva a cabo un procesamiento post-análisis en la muestra para neutralizar previas reacciones de procesamiento o para desactivar producto amplificado para activar nuevas reacciones de amplificación.



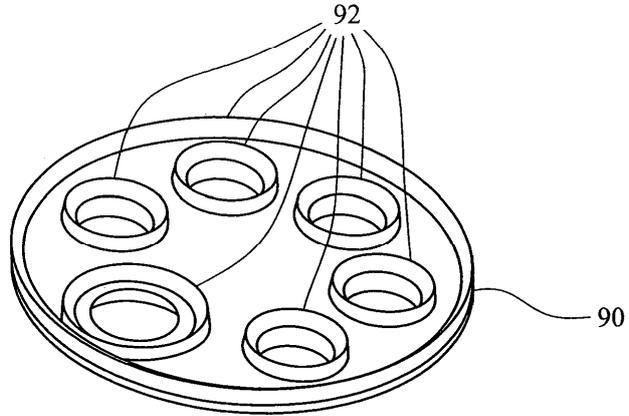


FIG. 1E

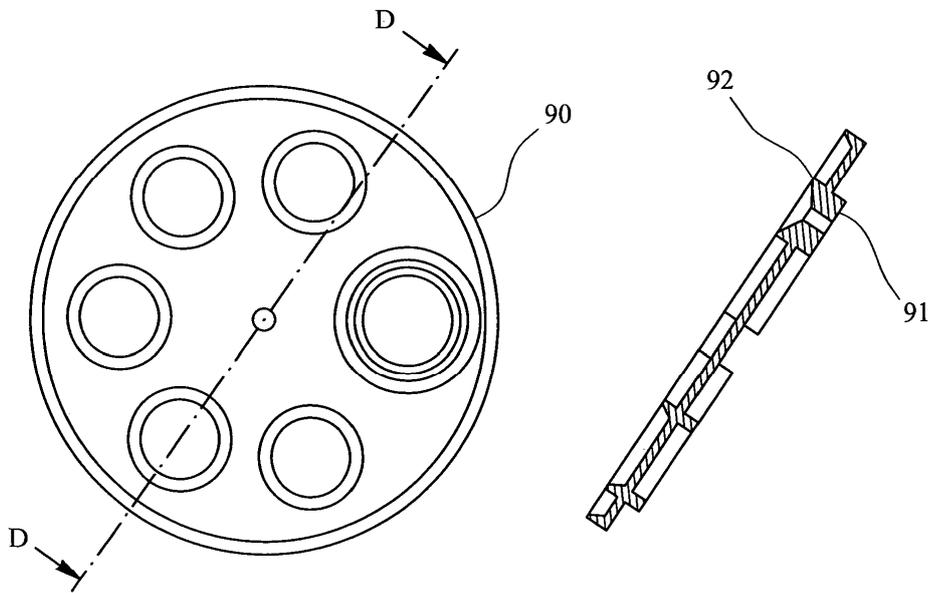


FIG. 1F

FIG. 1G

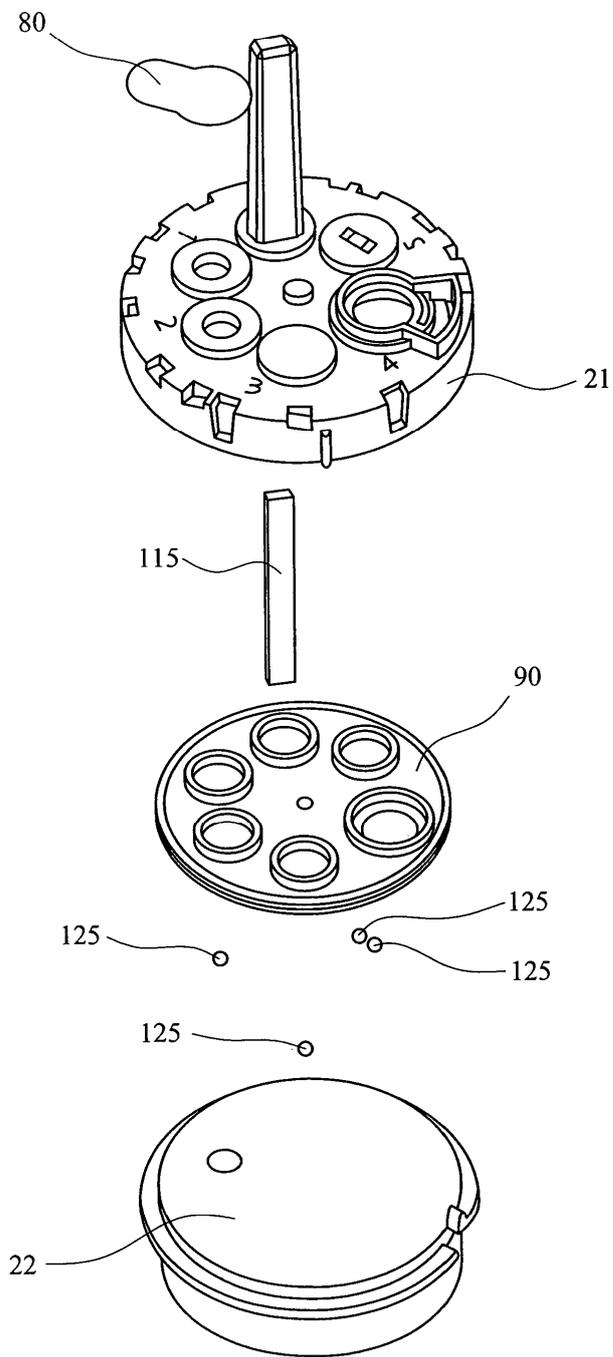


FIG. 2

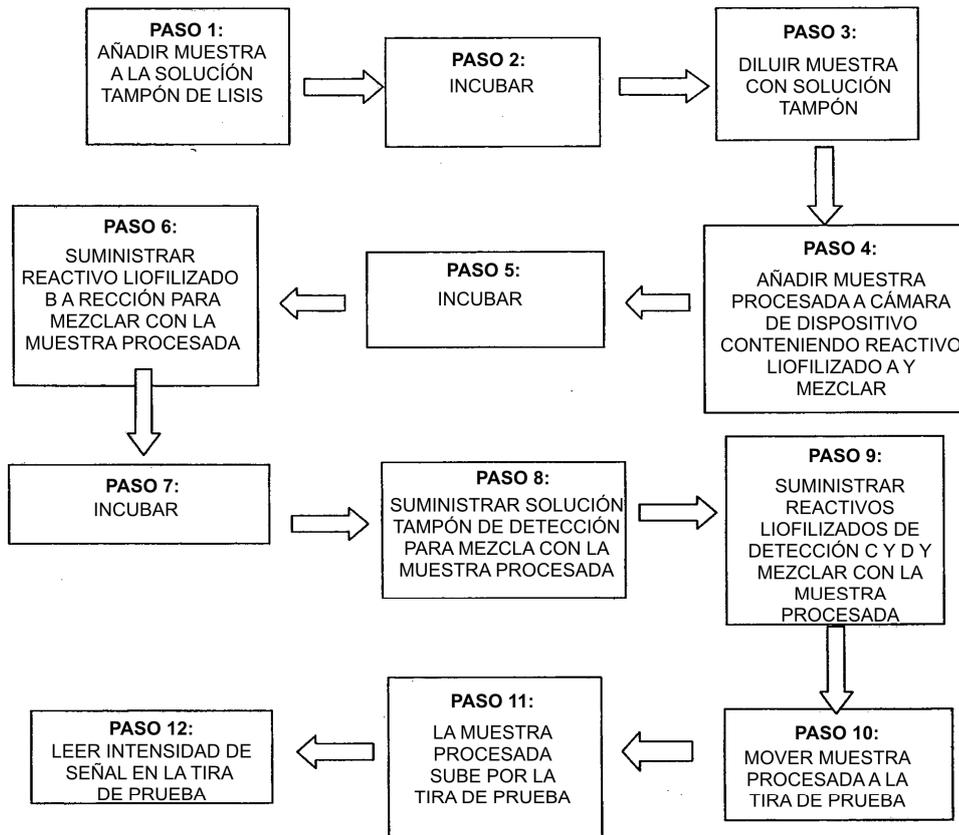


FIG. 3

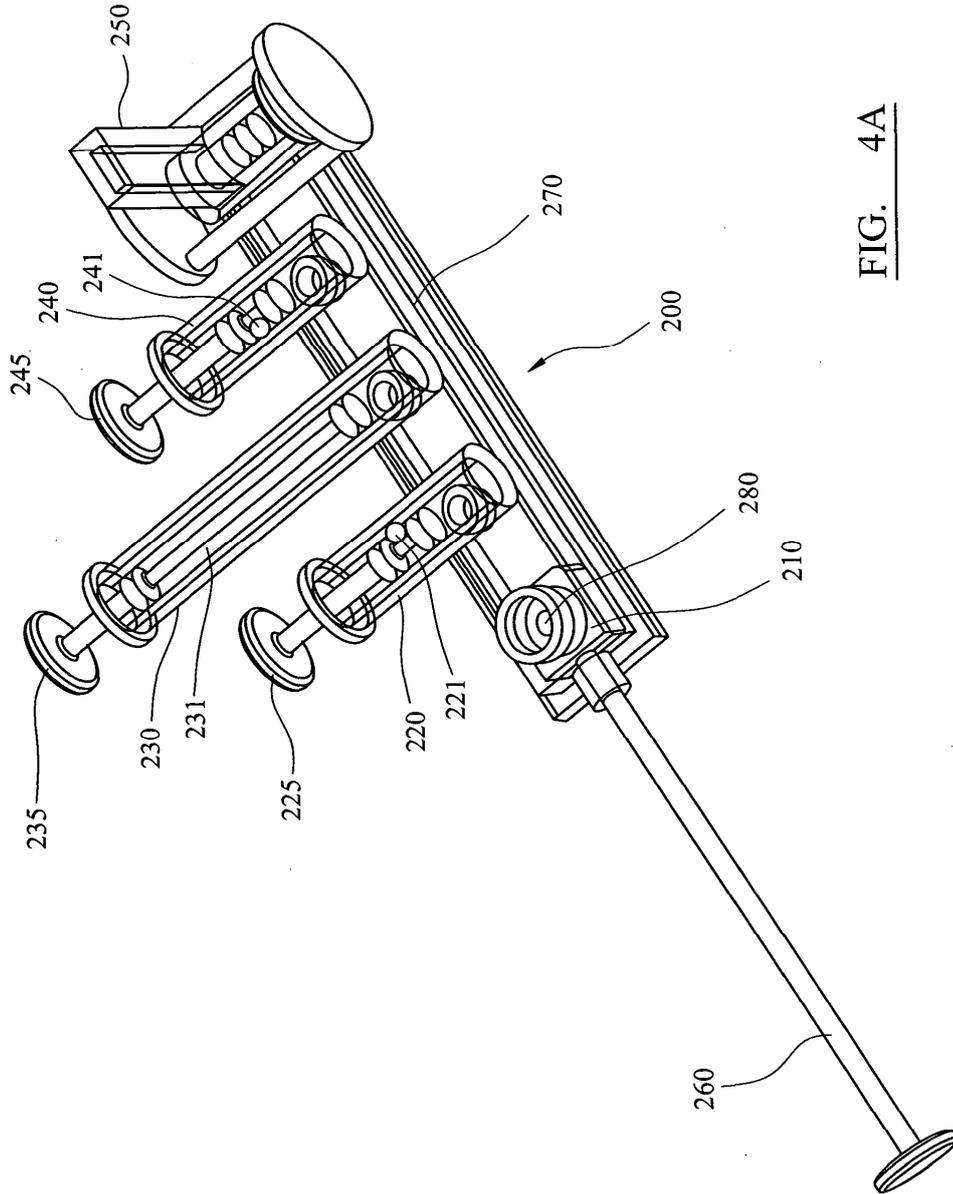


FIG. 4A

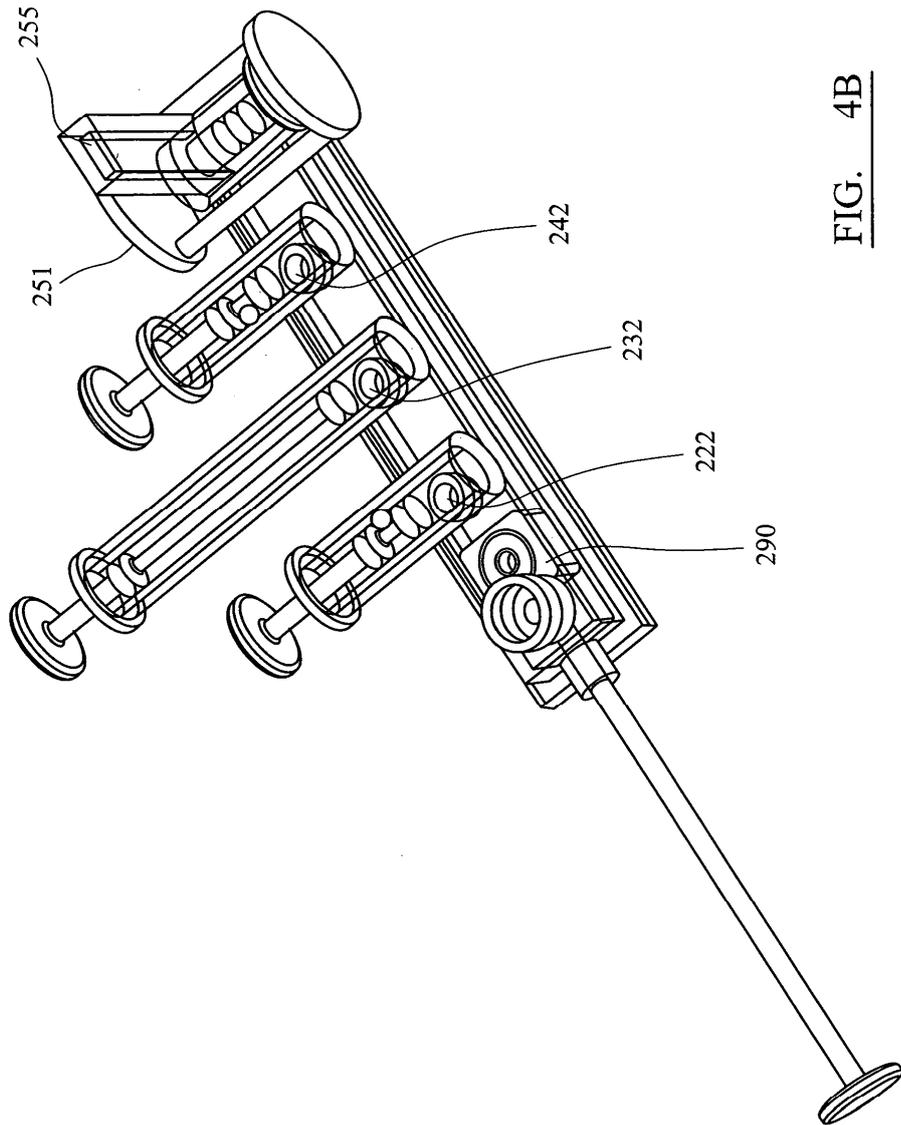


FIG. 4B

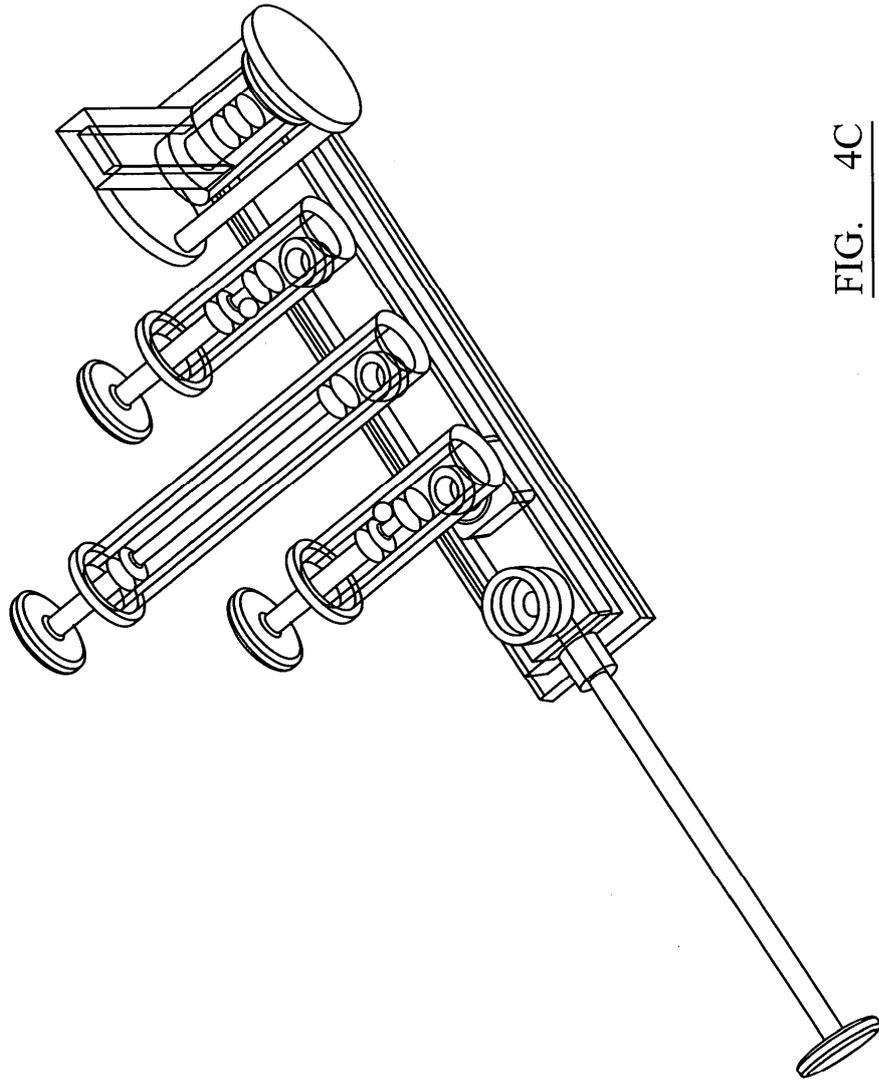


FIG. 4C

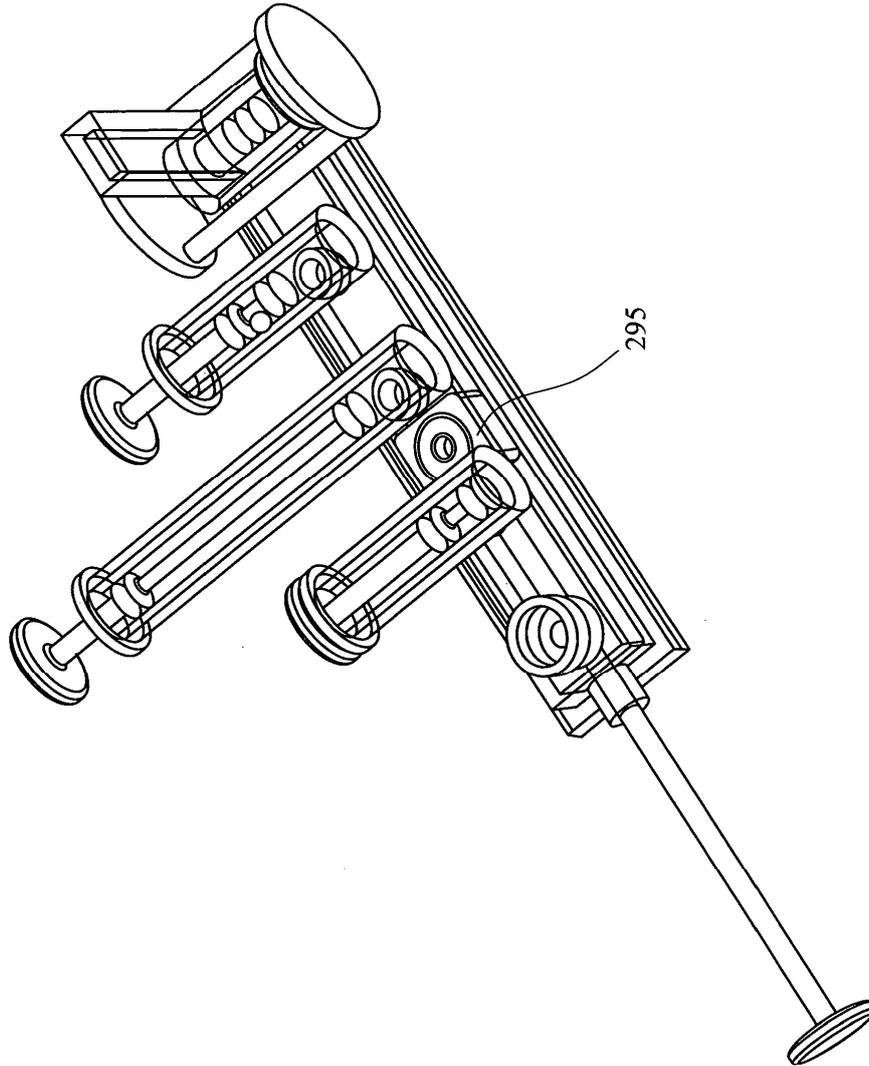


FIG. 4D

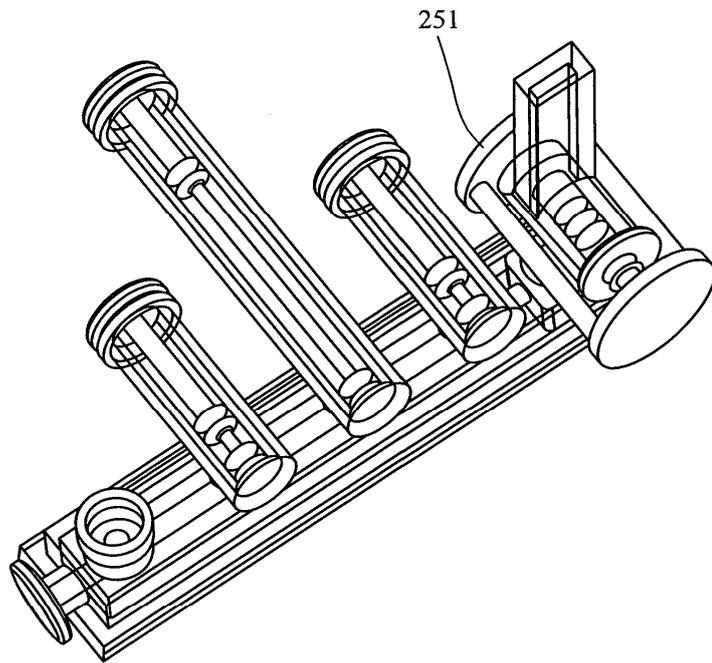


FIG. 4E

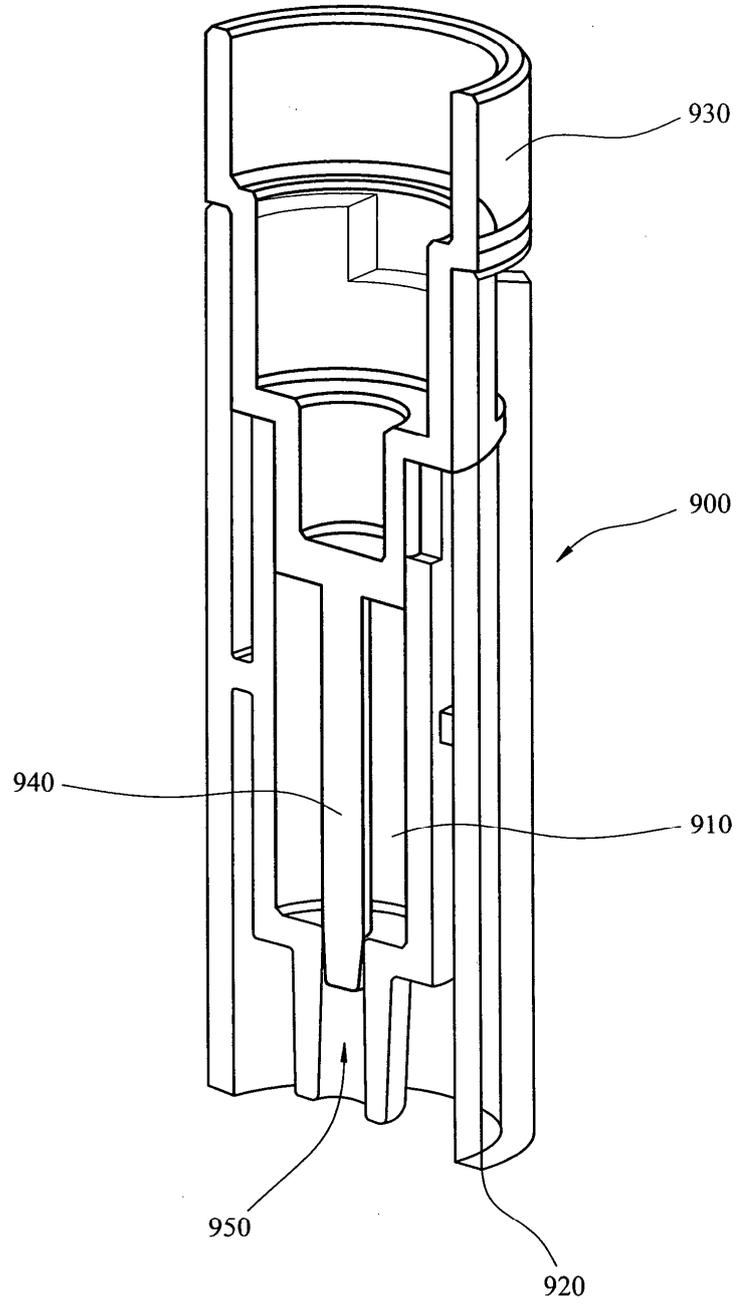


FIG. 5A

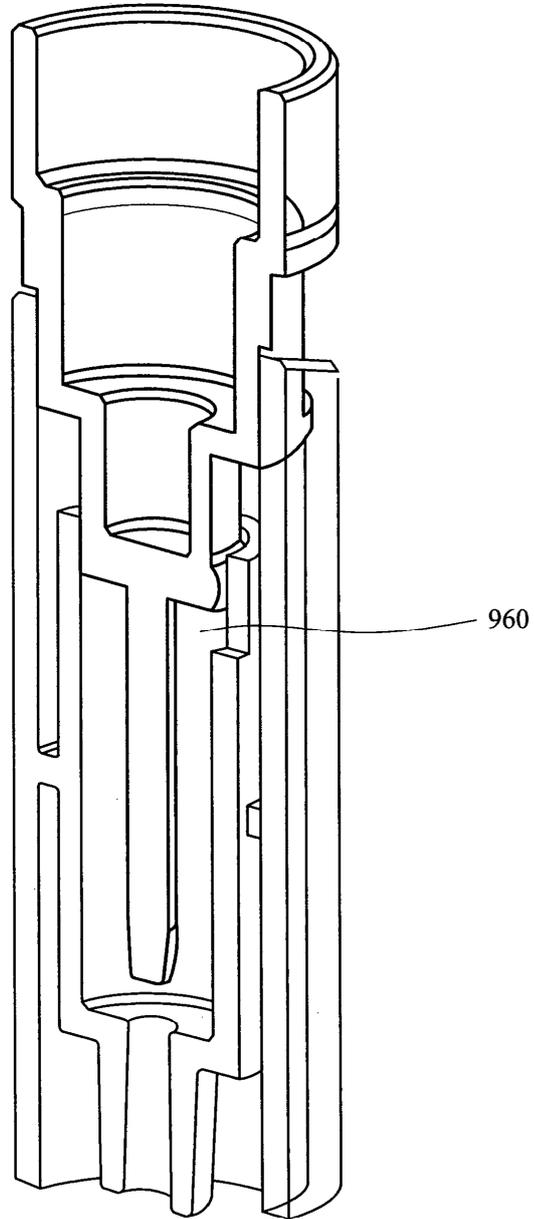


FIG. 5B

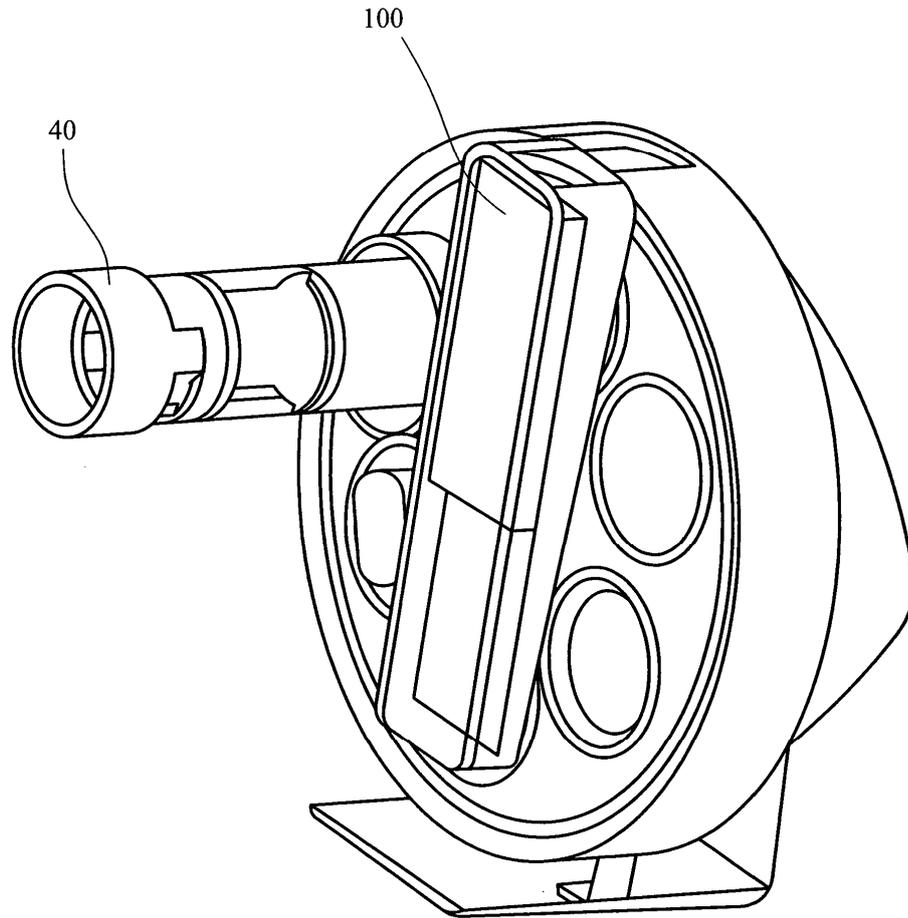


FIG. 6A

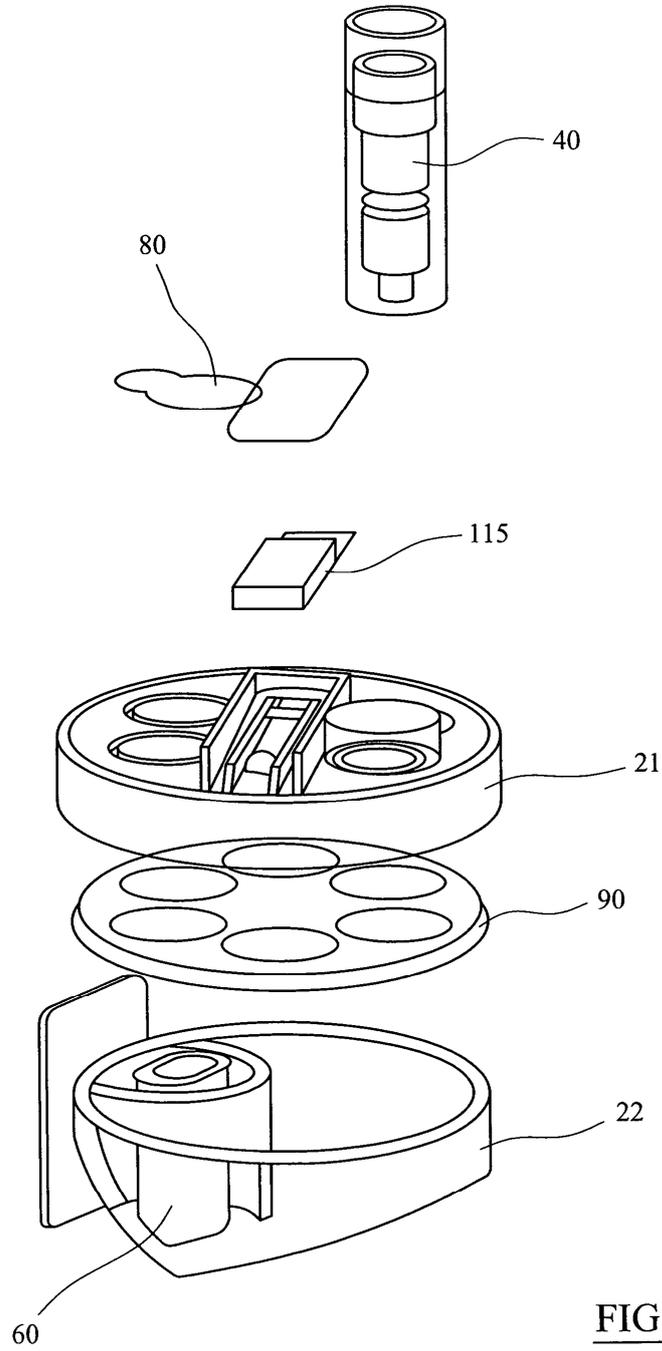


FIG. 6B

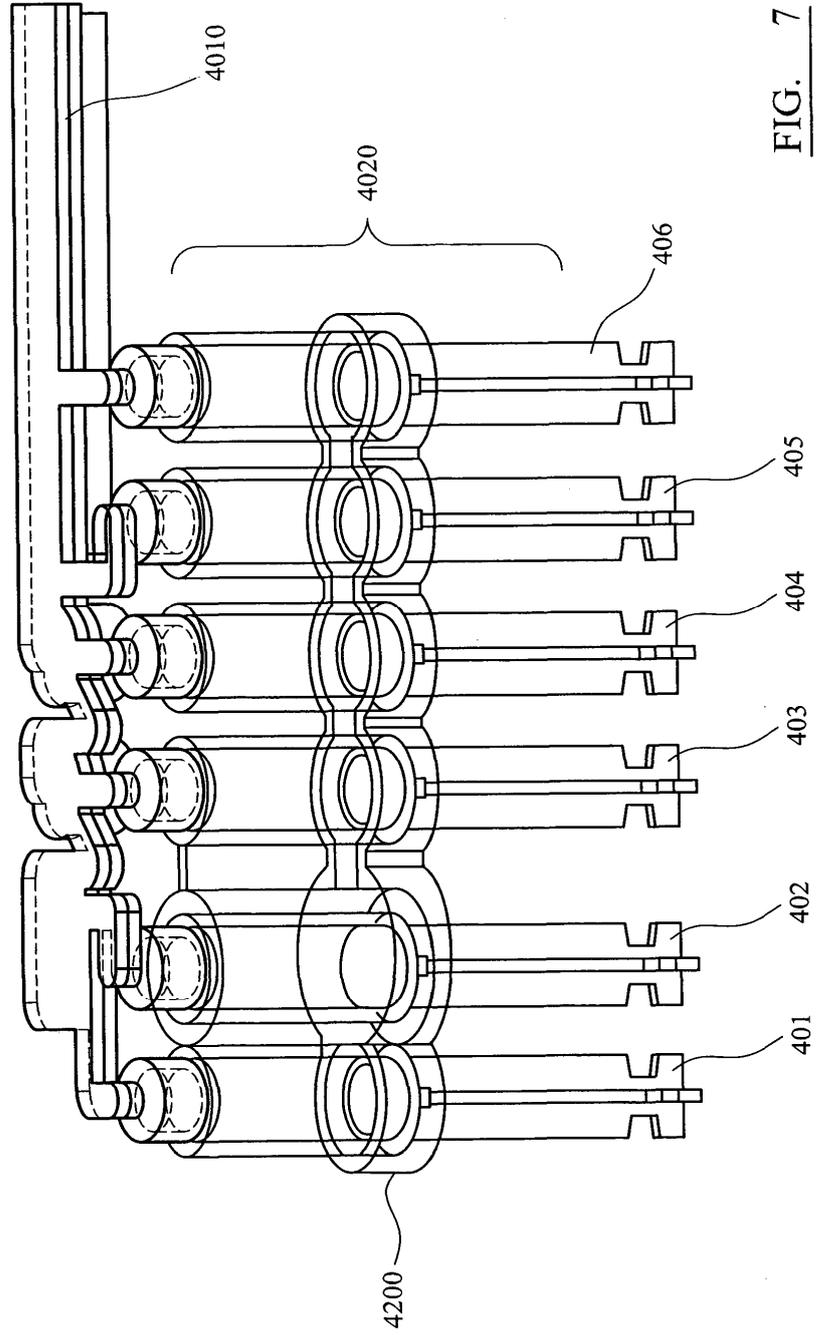


FIG. 7

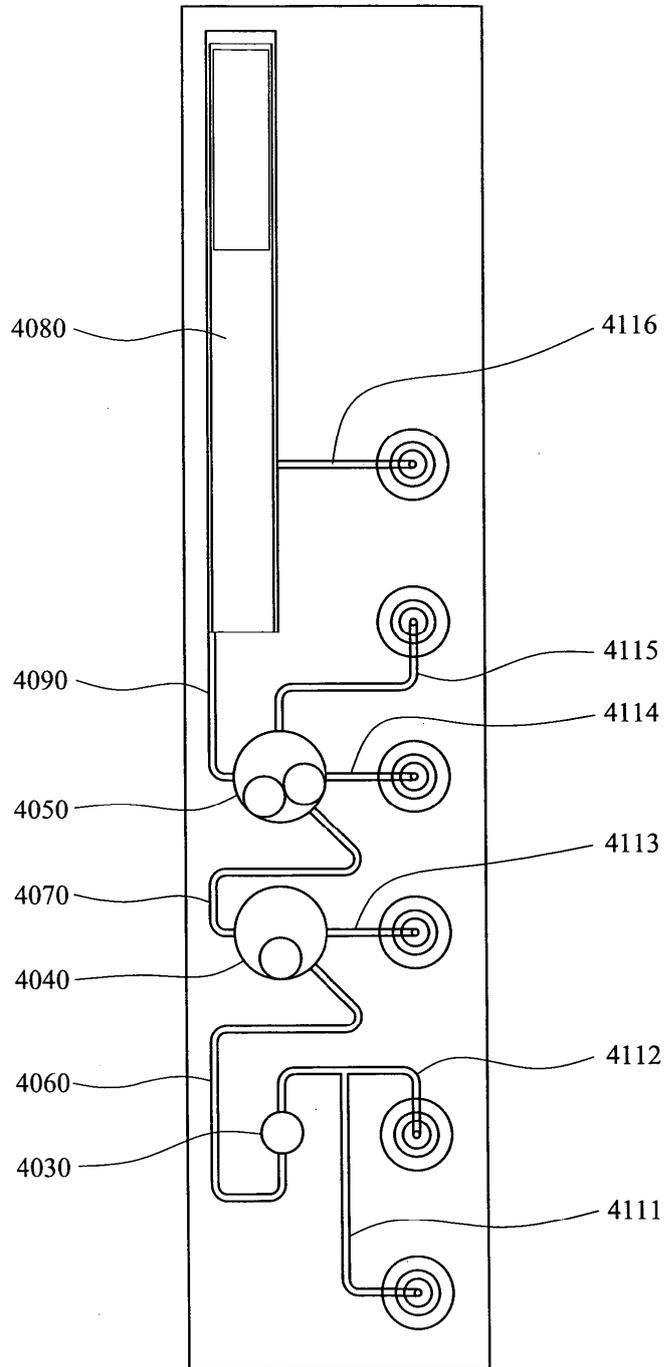


FIG. 9

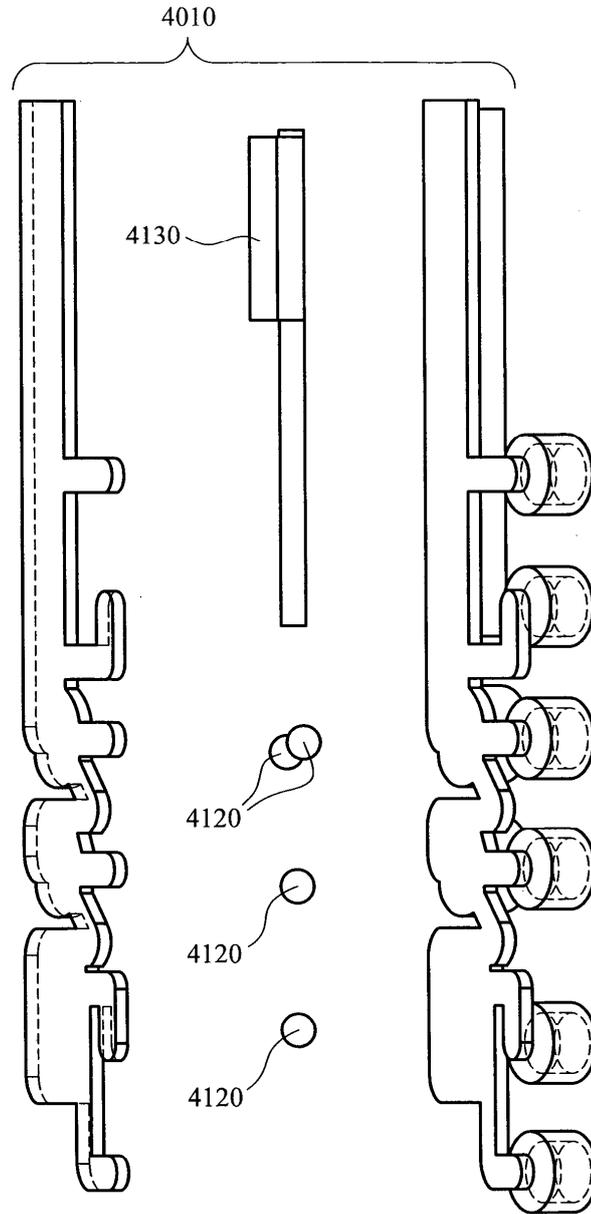


FIG. 10

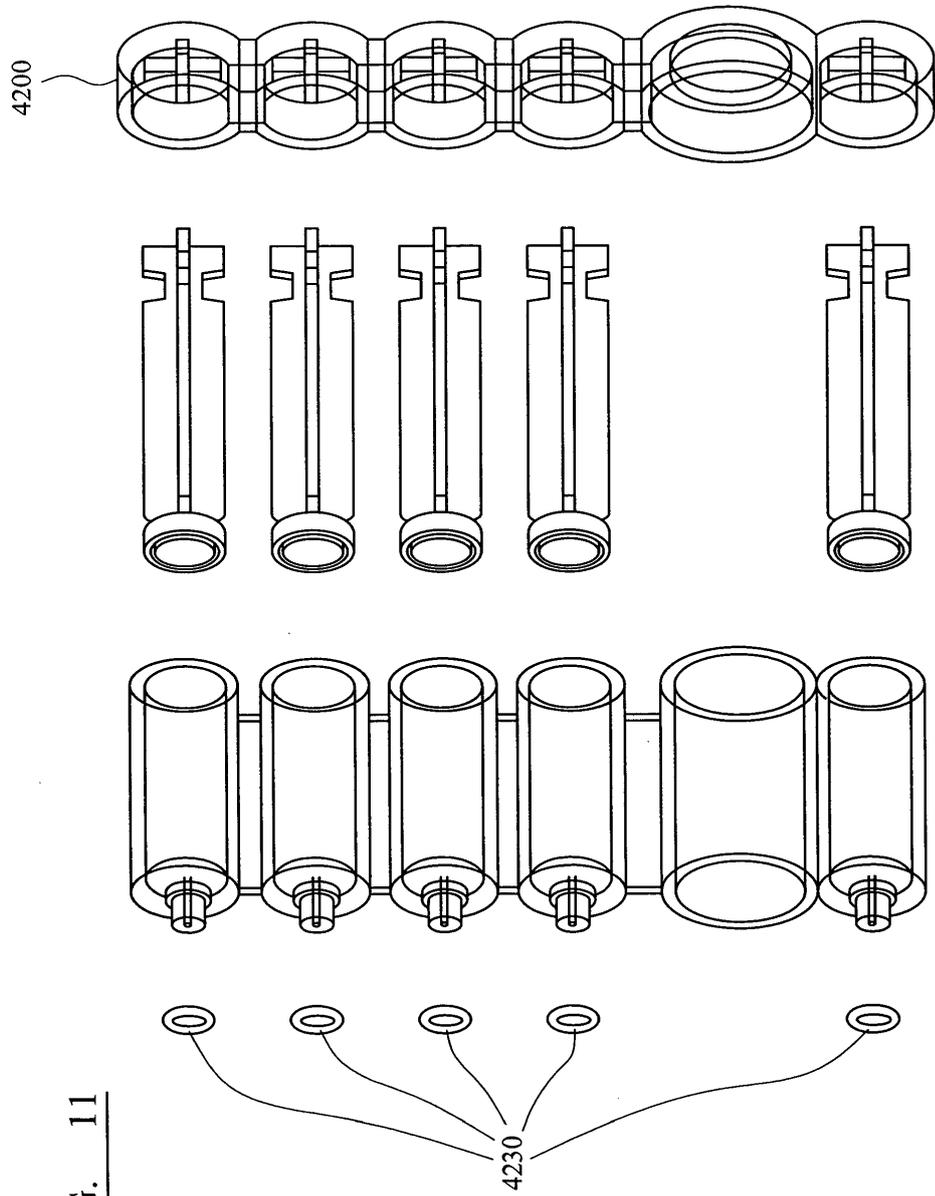


FIG. 11

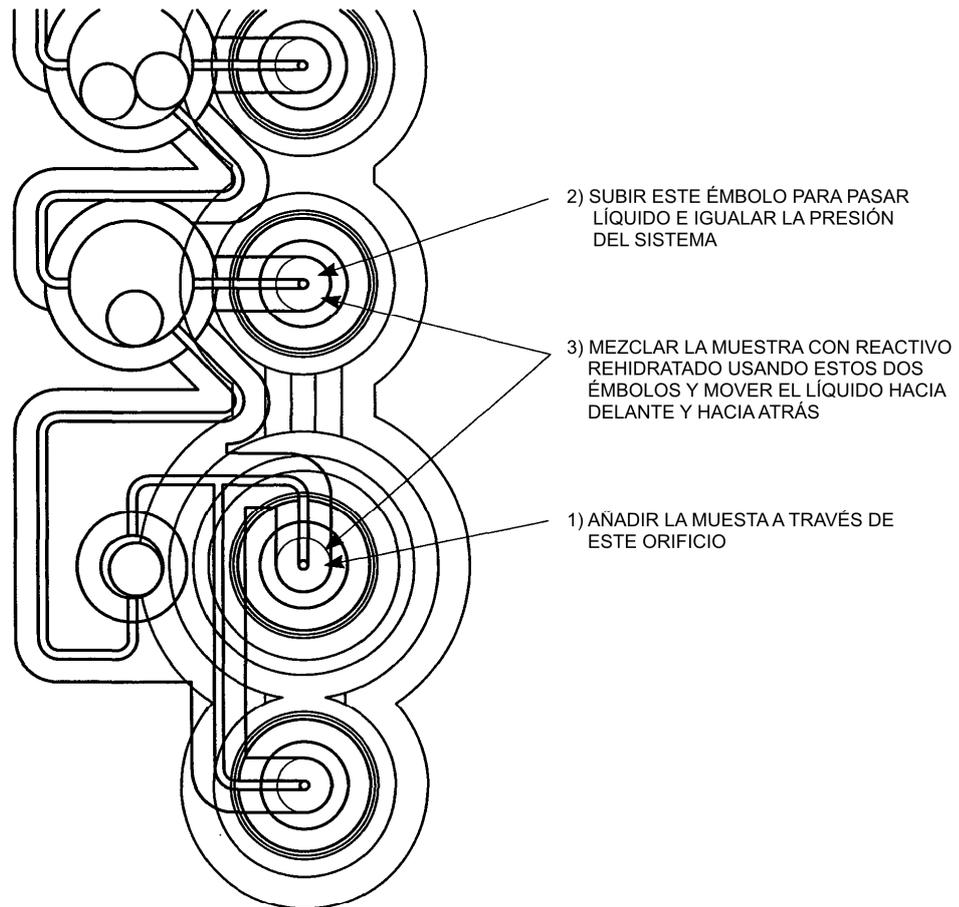


FIG. 12

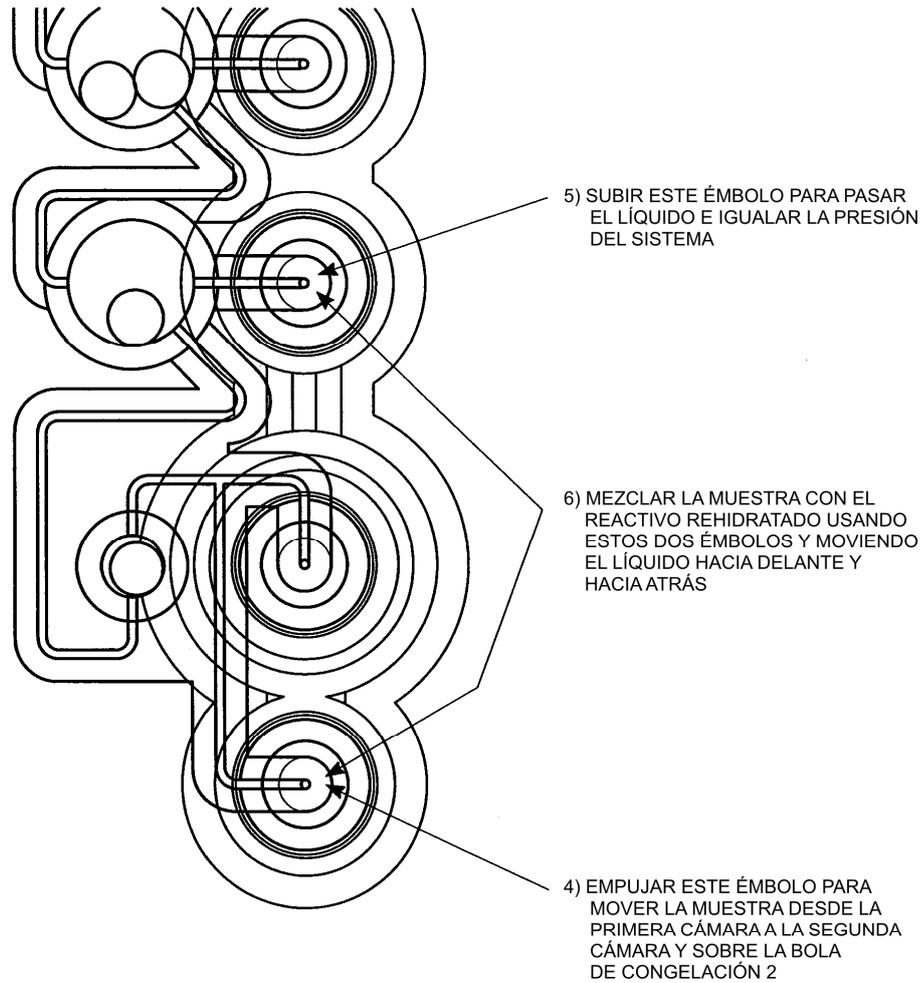


FIG. 13

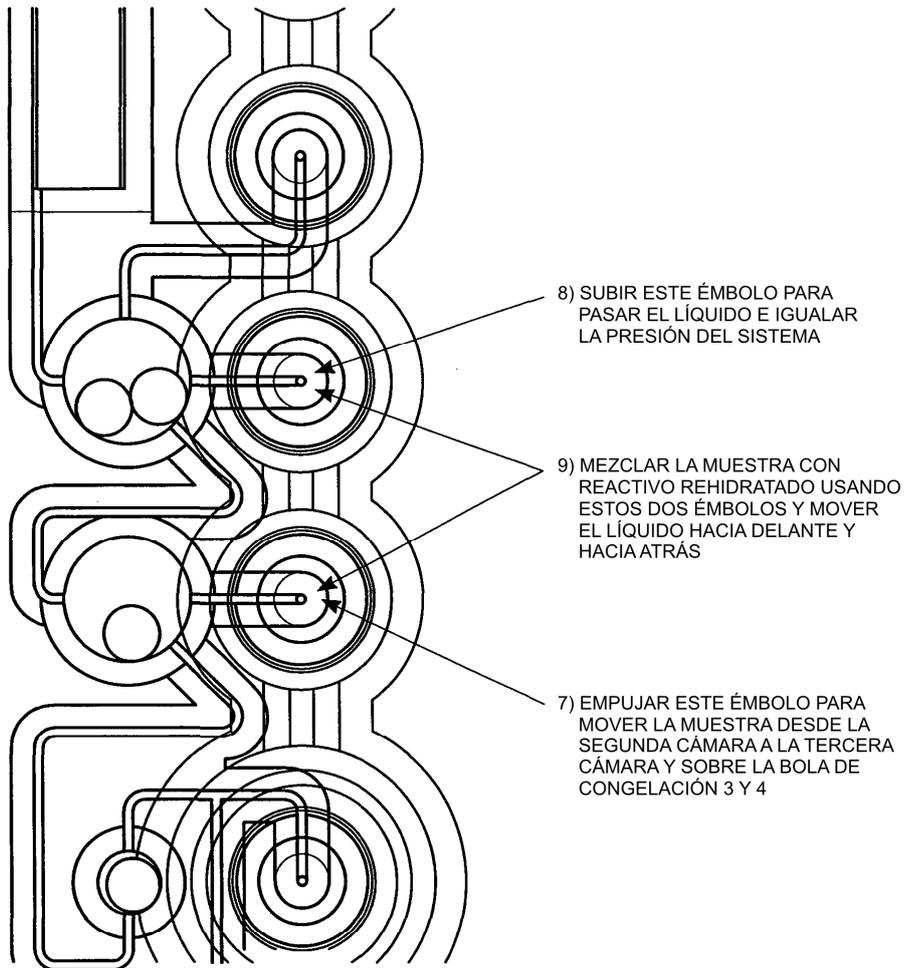


FIG. 14

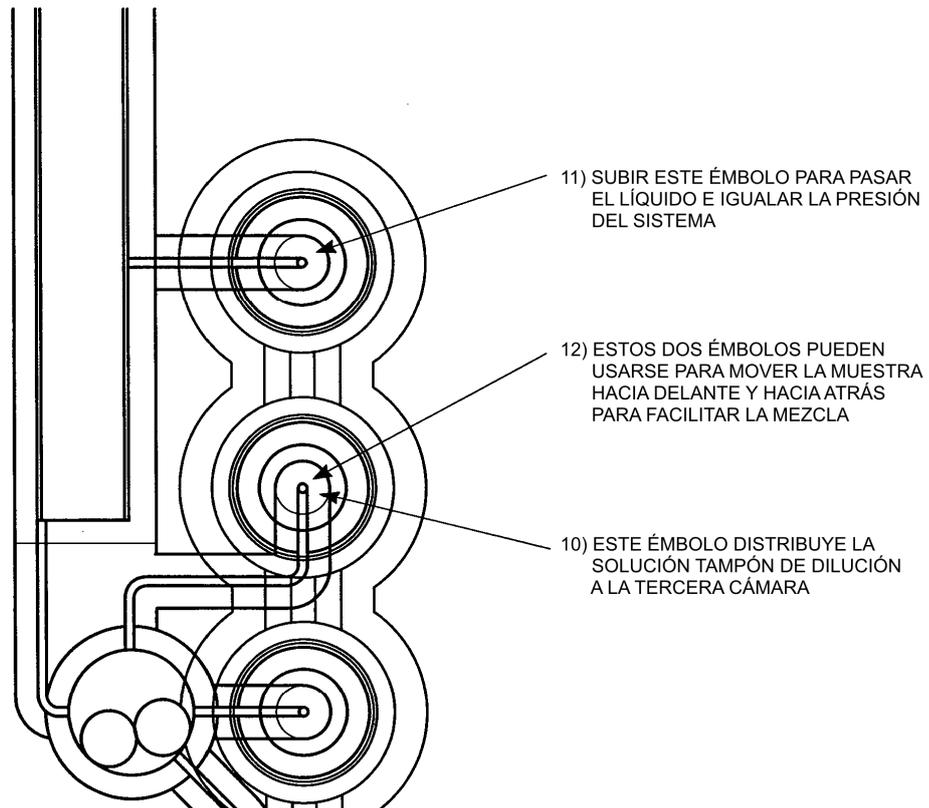


FIG. 15

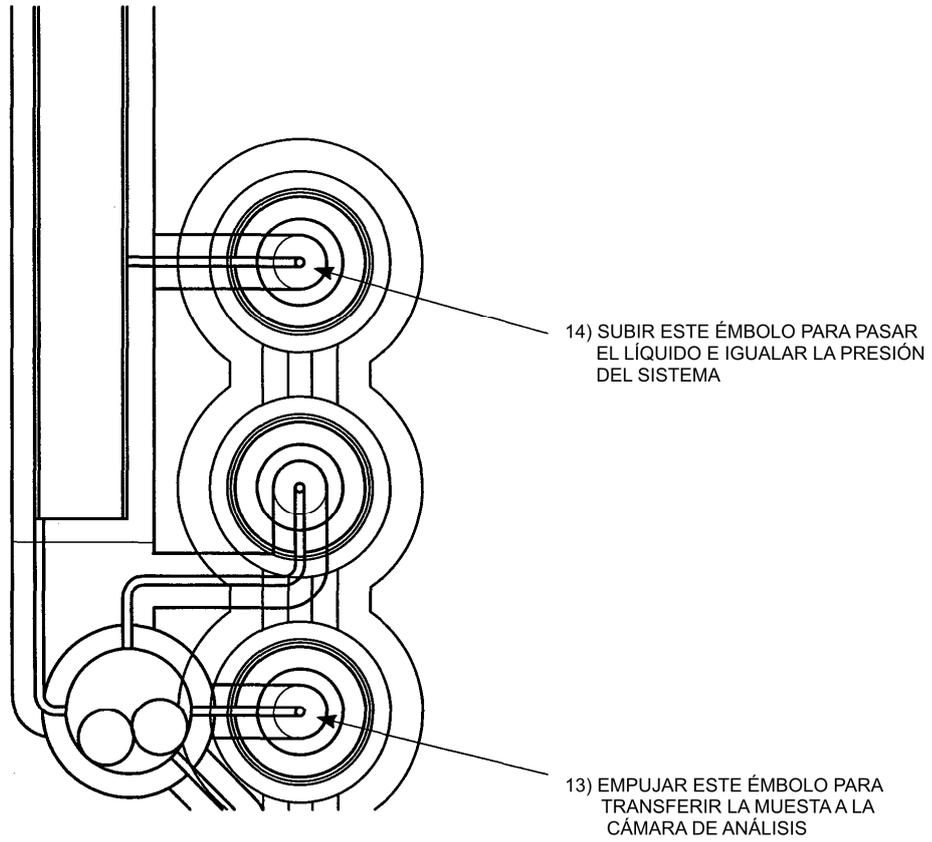


FIG. 16

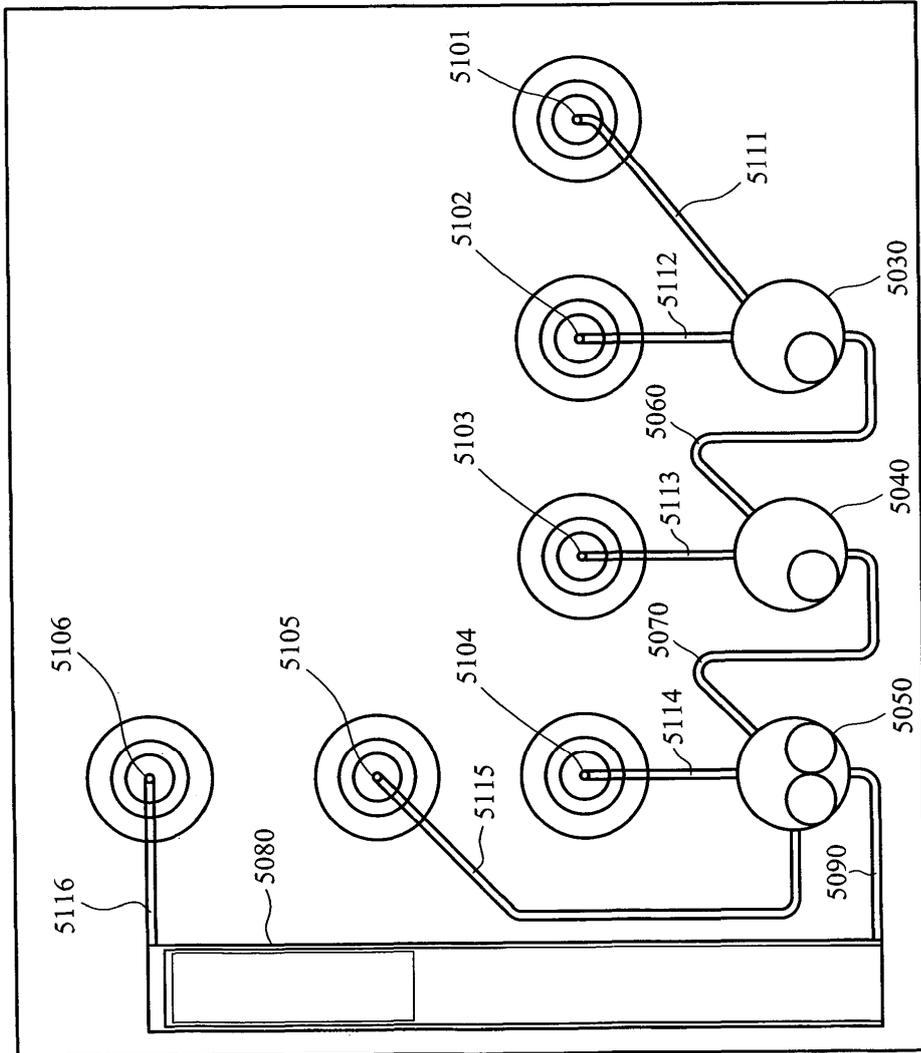


FIG. 17

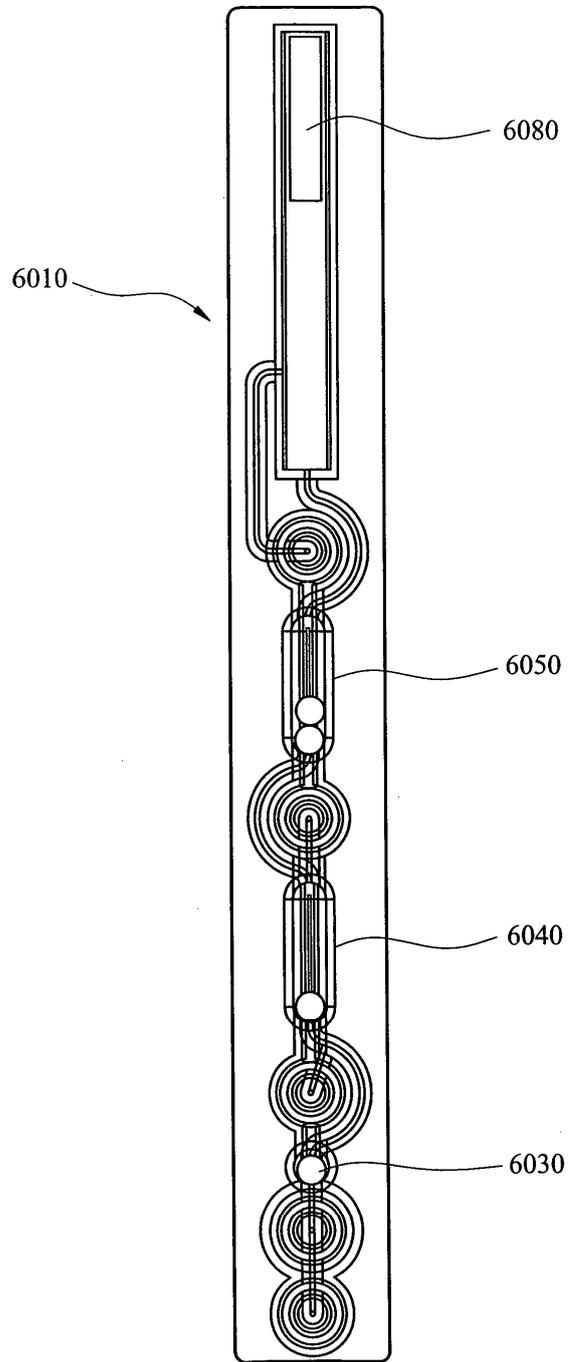


FIG. 18

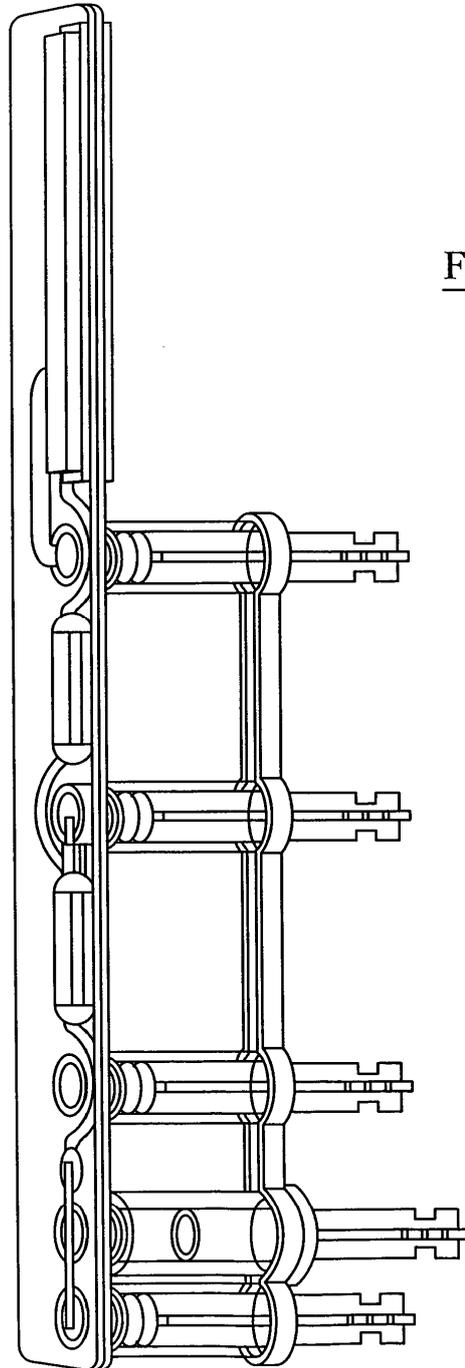


FIG. 19

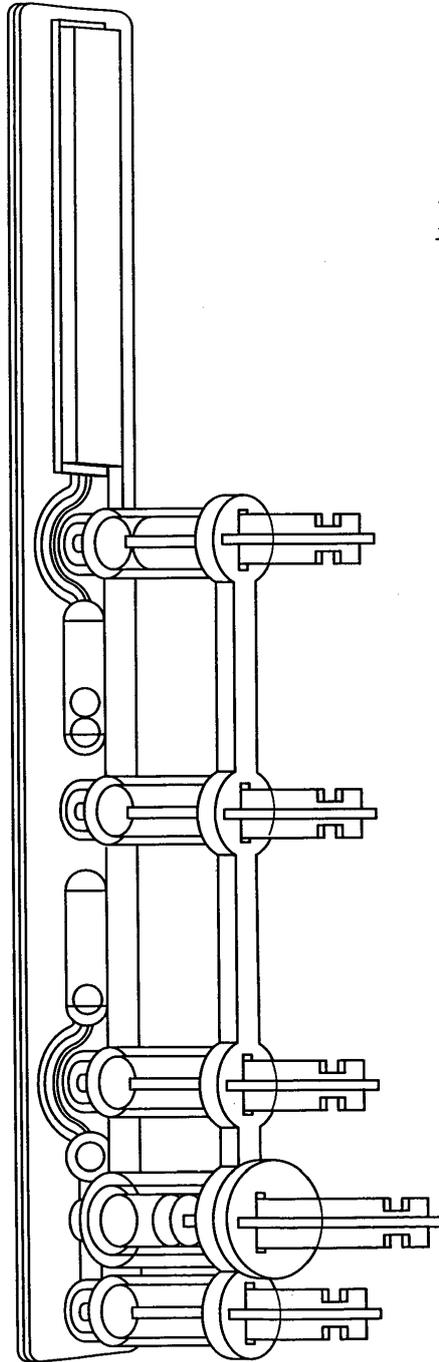


FIG. 20

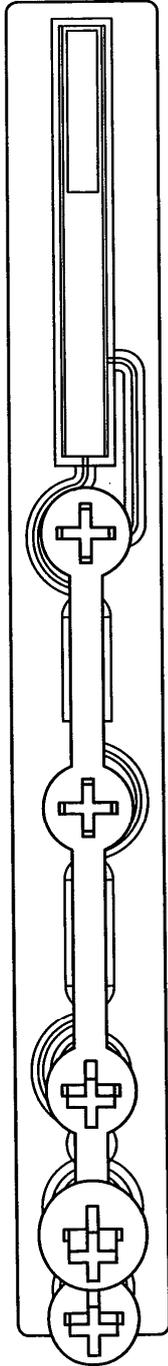


FIG. 21