(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 689 172**

(51) Int. CI.:

B01L 3/00	(2006.01)
G01N 1/28	(2006.01)
G01N 21/76	(2006.01)
G01N 35/00	(2006.01)
B01L 7/00	(2006.01)
G01N 33/487	(2006.01)
G01N 21/64	(2006.01)
C12Q 1/68	(2008.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.06.2006 E 11005261 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.08.2018 EP 2409767**

(54) Título: **Cartucho modular, sistema y procedimiento para diagnóstico médico automatizado**

(30) Prioridad:

23.06.2005 EP 05105608

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.11.2018

(73) Titular/es:

BIOCARTIS NV (100.0%)
Generaal De Wittelaan 11 B3
2800 Mechelen, BE

(72) Inventor/es:

VAN HAAG, CHRIS;
JONGERIUS, MICHIEL J.;
SCHAEFER, DANNY G.A.;
VAN DEN BIJGAART, ADRIANUS W.D.M.;
DE GIER, RONALD;
DE JONG, MICHIEL;
PROSS, GERHARD;
BACHER, JOHANNES;
BOOS, ANDREAS;
LUEDKE, GERD y
SEHER, JENS-PETER

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

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

DESCRIPCIÓN

Cartucho modular, sistema y procedimiento para diagnóstico médico automatizado

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

Desde el descubrimiento del ADN, la tecnología relacionada con la detección de la presencia, ausencia o cantidad de secuencias de ADN o ARN específicas en una muestra ha experimentado un enorme auge. Especialmente la PCR (Polymerase Chain Reaction), la reacción en cadena de la polimerasa ha contribuido enormemente al desarrollo de ensayos de todo tipo para la detección de la presencia o ausencia de secuencias de ADN o ARN. Actualmente, es posible recoger muestras que contienen ADN de un organismo y determinar la presencia, ausencia o cantidad en ellas de ciertas secuencias de ADN específicas (secuencias diana). Hay tecnología disponible para realizar dicho análisis para múltiples secuencias diana al mismo tiempo, llamada detección múltiple de secuencias diana para aumentar, de este modo, el rendimiento.

Actualmente, este tipo de análisis aún no se realiza de forma rutinaria, tal como, por ejemplo, la medición del contenido de glucosa en sangre en el caso de diabetes. Generalmente, se necesitan laboratorios bien equipados y hay que usar protocolos cuidadosos para evitar la contaminación cruzada y para asegurar que los resultados obtenidos son fiables es decir las lecturas falsas positivas o falsas negativas de los ensayos se minimizan. Sin embargo, dado que sigue estando implicado mucho trabajo manual de personal exhaustivamente entrenado y supervisado, sigue existiendo en la técnica la necesidad de superar las anteriores desventajas de los presentes procedimientos de análisis de ADN o ARN. Especialmente, se sabe que el análisis de ARN es muy difícil debido a que la contaminación ocurre muy fácilmente debido a la presencia de cantidades mínimas de ARN en la atmósfera y en las manos de los expertos analistas. Además, los presentes procedimientos de análisis no solamente son laboriosos, también requieren mucho tiempo. Típicamente, un procedimiento eficaz para un análisis de ADN o ARN convencional dura aproximadamente 6 horas debido a, entre otras cosas, toda la manipulación entre los diversos sistemas para la toma de muestras, el aislamiento de ADN o ARN de la muestra, el posterior ensayo para el análisis de la presencia, ausencia o cantidad de la secuencia diana de la muestra, el procesamiento de cualesquiera resultados obtenidos y la correspondiente presentación de los resultados.

Sistemas a base de cartuchos para la detección de ADN se han descrito anteriormente.

Por ejemplo, el documento US 5.882.903 describe un sistema para la detección de ADN. El sistema comprende un primer ensamblaje que tiene una o más cámaras de reacción y un segundo ensamblaje que comprende una serie de cámaras de fluido. Cada una de las cámaras de fluido contiene el fluido que se usa durante la detección del ADN. Estos fluidos comprenden fluidos de lavado, fluido de lisis, y una solución de amplificación que contiene un tampón de amplificación y cebadores apropiados. Las cámaras de reacción se usan para realizar las diferentes etapas de la detección tales como lavado, lisis y amplificación.

Otros sistemas a base de cartuchos conocidos de la técnica anterior y usados para la detección de ADN se describen, por ejemplo, en los documentos US 5.585.069, US 6.168.948 y WO97/27324.

El documento US2003/0224506 describe las ventajas de formar biochips integrados que incluyen micromatrices que se componen de módulos ensamblados.

Choi (Int. Conference on Micro Electro Mechanical Systems, Kioto, 2003) describe cartuchos de biochips de plástico desechables con una fuente de alimentación del chip para análisis de sangre. Una desventaja del sistema a base de cartuchos conocido es que los cartuchos de estos sistemas están diseñados como un único cuerpo. El cartucho conocido no ofrece ninguna flexibilidad en cuanto a la aplicación para la que se pretende usar el cartucho, por ejemplo para bacterias específicas que se detecten con el sistema o para diferentes tipos de muestras que se introduzcan en el cartucho.

Un objeto de la presente invención es proporcionar un cartucho para la detección de la presencia, ausencia y/o cantidad de una secuencia de nucleótidos diana en una muestra, que posibilita un uso más flexible de dicho cartucho.

Este objetivo se consigue con un cartucho según la reivindicación 1.

Al proporcionar una parte genérica que se puede usar para una gran diversidad de aplicaciones y una o más partes específicas para una aplicación que están configuradas específicamente para usarlas en cierta aplicación, el cartucho se puede ensamblar en base a la aplicación específica para la cual se pretende usarlo. Al menos una de las una o más partes específicas para una aplicación se puede conectar al cuerpo principal con una conexión de ajuste por trinquete.

La parte genérica comprende medios de manejo de fluido tales como bombas y válvulas, una serie de cámaras del proceso que se usan independientemente de la aplicación del cartucho y alojamientos de almacenamiento y desechado de fluido para diferentes fluidos, tales como tampones de lisis y de lavado. Estos elementos del cartucho se describirán con más detalle a continuación.

En una realización una de las una o más partes específicas es un cuerpo de PCR que tiene una o más cámaras de termociclado y que comprende una serie de cebadores. Puede ser posible que el cartucho se vaya a usar para diferentes paneles de bacterias/resistencias. Proporcionando diferentes cuerpos de PCR que comprenden una serie de cebadores, se puede seleccionar un cuerpo de PCR específico para una aplicación en base a la aplicación para la cual se usa el cartucho. Por ejemplo, el cuerpo de PCR que comprende los cebadores se puede seleccionar en base a los paneles de bacterias/resistencias que se van a detectar, selección que puede ser específica para un ensayo particular o para una región particular, tal como Europa, Asia o África. También es posible que el tamaño o el número de cámaras de termociclado se seleccionen en base a las bacterias/resistencias a detectar. En una realización preferida, las cámaras de termociclado se usan solamente para la etapa de termociclado. Las cámaras del proceso, en particular los cebadores, en dicha realización no están afectadas por ninguna otra etapa realizada en el cartucho.

En una realización, se proporcionan dos o más cámaras de termociclado. En cada una de las cámaras de termociclado se puede introducir una cantidad de fluido de proceso, lo que hace posible un procesamiento paralelo eficaz.

En una realización, un cebador se dispone en cada una de las una o más cámaras de termociclado. Disponiendo los cebadores en las una o más cámaras de termociclado, no hay que transferir los cebadores antes de que puedan realizarse las etapas de termociclado. De esta manera, se realiza un uso más eficaz de los cebadores. Además, esto permite un diseño más sencillo del cuerpo de PCR.

En una realización, el cebador se localiza en el cuerpo de PCR. Dicha localización se puede realizar con cualquier técnica de localización conocida, tal como por ejemplo impresión por inyección de tinta. Preferentemente, los cebadores localizados están provistos en las una o más cámaras de termociclado, pero también se pueden proporcionar en cualquier otra ubicación adecuada, tal como los canales de entrada para la muestra que conducen a las una o más cámaras de termociclado.

En una realización, una de las una o más partes específicas para una aplicación es un dispositivo de detección. Se pueden usar una serie de diferentes procedimientos de detección para detectar los amplicones en la muestra después de la amplificación de ADN/ARN. Dichos procedimientos de detección pueden incluir procedimientos de detección ópticos, electroquímicos, con capilares magnéticos y de electroforesis en gel. Dependiendo del procedimiento de detección que se va a usar para cierta muestra, el dispositivo de detección, o al menos una parte del mismo se puede seleccionar y conectar a la parte genérica del cartucho.

En una realización, el dispositivo de detección se selecciona en base al cuerpo de PCR que se usa para la detección de algunas bacterias/resistencias. Algunos procedimientos de detección están relacionados típicamente con las bacterias/resistencias específicas que se van a detectar, y con ello también con los cebadores que se van a usar en el procedimiento de detección. Como resultado, el cuerpo de PCR con cebadores y el dispositivo de detección se pueden seleccionar como un par, es decir con la sección de un cuerpo de PCR también se realiza la selección del dispositivo de detección.

Puede ser posible que solamente una parte particular del dispositivo de detección, tal como un sustrato y/o soporte de sustrato pueda ser específico para la detección de cierto ADN/ARN. Se contempla, por lo tanto, que el dispositivo de detección específico para una aplicación pueda ser sólo una parte del verdadero sistema de detección usado en el cartucho para hacer posible la detección de un ADN/ARN particular.

En una realización de la invención, una de las una o más partes específicas para una aplicación es un dispositivo de introducción de la muestra. Dependiendo de la cantidad de muestra necesaria, el tipo de muestra, el estado en el que se proporciona, se pueden usar diferentes dispositivos de introducción de la muestra para la introducción de una muestra en el cartucho. El uso de un dispositivo de introducción de la muestra proporciona además una conexión fácil y segura al cartucho y con ello una introducción fácil y fiable de la muestra en el cartucho.

En una realización, el dispositivo de introducción de la muestra es un dispositivo de pre-lisis configurado para preparar una muestra para un estado específico. La parte genérica del cartucho está diseñada para procesar una muestra en un estado de la muestra particular, por ejemplo fluido. Un dispositivo de pre-lisis puede estar provisto para procesar la muestra a partir de un estado particular en el que está disponible, y en el que no se puede usar en el cartucho, hasta el estado para el que el cartucho está diseñado para procesarla. Tal estado puede ser al que se llega secando un fluido, fluido que esté presente en un portador sólido, y similares. El proceso en la pre-lisis se puede realizar antes de que el dispositivo de pre-lisis se conecte a la parte genérica, pero también después de que esta conexión se realice.

En una realización, al menos una de las una o más de las partes específicas para una aplicación está provista de un dispositivo de identificación. Para evitar errores en la selección de las partes específicas para una aplicación, es útil proporcionar una identificación en las partes específicas para una aplicación de modo que pueda comprobarse fácilmente si la parte o conjunto de partes específicas para una aplicación correcta se combina con la parte genérica.

Dicho dispositivo de identificación puede incluir pegatinas, códigos de barras, códigos de color, códigos magnéticos y demás. Preferentemente, se usa un sistema de identificación automático, tal como un sistema de identificación de marcas de RF. También se pueden usar aquellos dispositivos de identificación más avanzados para rastrear el historial de ubicación de la parte genérica y/o las partes específicas para una aplicación. Puede ser importante, por ejemplo, que cierta parte específica para una aplicación se enfríe. Con el uso de un sistema de rastreo de un historial de ubicación, se puede comprobar si la parte específica para una aplicación no ha estado durante demasiado tiempo fuera de un dispositivo de refrigeración. En una realización preferida, una unidad de control del sistema de detección comprueba si las partes específicas para una aplicación correctas se han conectado a la parte general y si la parte genérica y las partes específicas para una aplicación siguen cumpliendo todos los requisitos respecto al historial de ubicación y demás.

La presente invención típicamente evita o minimiza el trabajo manual, evita la contaminación cruzada, proporciona resultados más rápidos que son más fiables, es fácil de usar y se adapta fácilmente para el análisis de diferentes secuencias diana. La presente invención proporciona un procedimiento de alto rendimiento para el análisis en busca de la presencia, ausencia o cantidad de ADN o ARN en cualquier tipo de muestra, preferentemente sangre.

La presente invención proporciona un cartucho que es adecuado para la detección de la presencia, ausencia o cantidad de ADN y/o ARN. La detección de la presencia, ausencia o cantidad de ADN y/o ARN es indicativa, por ejemplo, de la presencia, ausencia o cantidad de un gen, un alelo de un gen, un rasgo o trastorno genético, un polimorfismo, un polimorfismo de nucleótido único (SNP) o de la presencia de ADN o ARN exógeno en un organismo, es decir la presencia, ausencia o cantidad de patógenos o bacterias en organismos.

A través de la presente invención, se pueden desarrollar remedios adecuados para la preparación de medicamentos para el tratamiento de la dolencia diagnosticada. Por ejemplo, la detección en una muestra (digamos, sangre) de un organismo (digamos, un ser humano) de un patógeno (digamos, un virus) puede conducir, por lo tanto, al diagnóstico y el tratamiento correspondiente (digamos, un antibiótico).

El cartucho puede ser de tipo intercambiable que se puede colocar en un aparato reutilizable. Dicho cartucho puede ser desechable, reciclable o reutilizable, posiblemente después de limpiarlo. Al proporcionar un cartucho intercambiable, todas las partes que pueden entrar en contacto con la muestra pueden, después del proceso de detección, extraerse del aparato y el cartucho puede cambiarse por otro o limpiarse antes del siguiente uso. En otras realizaciones, el cartucho puede ser una parte integrante del aparato reutilizable que se limpia después del uso.

En algunas realizaciones, el aparato comprende una unidad de control para controlar los medios de aislamiento, medios de amplificación y/o los medios de detección. La unidad de control hace posible un control automático del aislamiento de ADN, la amplificación de ADN y la detección del ADN amplificado.

El cartucho comprende una o más cámaras en las que la muestra está contenida durante el proceso de detección. Dichas cámaras pueden comprender una cámara de introducción para introducir una muestra en el cartucho, una cámara de lisis para la lisis de las células en la muestra, una cámara de lavado para el lavado, una o más cámaras de termociclado para la amplificación del ADN y una cámara de detección que hace posible la detección. También es posible proporcionar una única cámara para una o más de las funciones descritas en relación con las cámaras. En dicha realización, dos o más cámaras de la cámara de introducción, la cámara de lisis, la cámara de lavado, la(s) cámara(s) de termociclado y la cámara de detección se pueden combinar en una única cámara.

Durante las diferentes etapas del proceso de detección, la muestra estará en una cámara respectiva. Con este fin, la muestra será transferida de una cámara a otra cámara entre dos etapas del proceso. Para hacer posible dicha transferencia, cada cámara está conectada al menos con otra cámara mediante un canal de fluido. Al menos uno, pero preferentemente cada uno de estos canales de fluido puede estar provisto de un medio de válvula, medio de válvula que, preferentemente, normalmente cierra el canal de fluido, pero abre el canal de fluido al accionar el medio de válvula poniendo así las dos cámaras respectivas en comunicación fluida. El medio de válvula puede estar diseñado como una válvula de una vía.

En algunas realizaciones, los medios de válvula son accionados por un dispositivo de accionamiento de la válvula. Este dispositivo de accionamiento de la válvula se dispone preferentemente en el aparato reutilizable.

En algunas realizaciones, están provistos medios de bomba para bombear la muestra o cualquier otro fluido usado en el proceso de detección, tal como tampón de lisis, reactivos, tampones de lavado y separación, tampones de

preamplificación, desde una cámara hasta otra cámara. Estos medios de bomba pueden ser accionados por medios de accionamiento de la bomba que se disponen preferentemente en el aparato reutilizable.

En algunas realizaciones, el sistema comprende medios para la recogida de datos y/o medios para el procesamiento de datos. Estos medios están diseñados para su uso en el análisis del ADN detectado y/o para la interpretación de los resultados. En particular, en algunas realizaciones, los medios de procesamiento de datos que son capaces de vincular la presencia, ausencia o cantidad del ácido nucleico diana (o combinación de los mismos) con un diagnóstico particular. Dichos medios de procesamiento de datos pueden estar, por ejemplo, en forma de un ordenador en combinación con una base de datos.

En algunas realizaciones, el sistema también puede comprender los medios para la introducción de una o más muestras. Dichos medios de introducción de la muestra pueden comprender cualquier dispositivo adecuado, tal como un dispositivo de contención o acoplamiento para la introducción de una muestra a partir de una jeringa o pipeta o demás y pueden comprender, por ejemplo, una válvula de entrada de una vía, un tabique, filtros y un rebosadero.

En algunas realizaciones, el sistema también puede comprender un dispositivo de lisis. En el dispositivo de lisis, que puede estar bajo el control de una unidad de control, la muestra se trata para proporcionar cualesquiera ácidos nucleicos en la muestra en una forma en la que puedan aislarse a partir de la muestra. Esta etapa de lisis incluye típicamente la lisis de las células, de modo que las membranas celulares y/o nucleares se rompen para liberar de este modo los ácidos nucleicos contenidos en su interior. Se pueden usar medios de manipulación física o mecánica para la etapa de lisis, pero también se pueden usar medios químicos para la lisis de las células de la muestra, tales como un tampón de lisis. Se pueden proporcionar medios de mezclado para mezclar la muestra y el tampón de lisis. Los procedimientos para la lisis de células se conocen bien en la técnica a partir de libros de texto, etc. En caso necesario, dichos procedimientos pueden estar adaptados para su uso en el presente sistema. Cualquier residuo que es producido por la etapa de lisis se puede desechar, por ejemplo a un dispositivo de desechado.

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

En algunas realizaciones, el sistema también puede comprender un dispositivo de enriquecimiento, opcionalmente bajo el control de una unidad de control. El dispositivo de enriquecimiento permite el aislamiento de ADN de la muestra lisada. Con este fin, el dispositivo de enriquecimiento puede estar equipado con medios para el aislamiento de ADN, tales como partículas magnéticas. En esta realización, el ADN o ARN de la presente invención se absorbe en partículas magnéticas. El material de ácido nucleico absorbido se puede someter a una o más etapas de lavado, drenaje y/o purificación para retirar cualquier material no deseado tal como restos de material biológico contenidos en la muestra y otros componentes de la muestra que no son ADN y/o ARN. Cuando el ADN o ARN absorbido es de una pureza deseada, puede resorberse o eluirse de las partículas magnéticas. El dispositivo de enriquecimiento también puede estar equipado con medios para la manipulación física o mecánica de los fluidos para el mezclado, la separación y el aislamiento del ADN o ARN.

En algunas realizaciones, el sistema también puede comprender los reactivos que son necesarios para la etapa de enriquecimiento, es decir el aislamiento del ADN o ARN, tales como tampones, fluidos de lavado, agua, filtros, perlas magnéticas, etc.

En algunas realizaciones, el sistema también puede comprender un dispositivo de desechado para alojar a cualquier desecho producido a partir de la etapa de enriquecimiento, tal como tampones usados, fluidos de lavado y similares.

En algunas realizaciones, los diferentes dispositivos de desechado del sistema pueden estar separados para cada diferente fin o volumen. En algunas realizaciones, dos o más de los dispositivos de desechado descritos en este documento se pueden combinar para alojar a todos los desechos que se producen mediante el procedimiento de la presente invención.

En algunas realizaciones, el sistema comprende además un dispositivo de pre-amplificación, opcionalmente bajo el control de una unidad de control. El dispositivo de pre-amplificación se puede usar, por ejemplo para aumentar la cantidad total de ADN o ARN a analizar. Al someter al ADN o ARN obtenido en la etapa de aislamiento a una etapa de pre-amplificación puede aumentar la cantidad total de ADN. Esto es ventajosamente, especialmente en el caso de análisis múltiple, donde se realizan múltiples ensayos sobre el ADN aislado, por ejemplo para detectar la presencia, ausencia o cantidad de múltiples patógenos en una muestra al mismo tiempo. En la técnica está disponible tecnología adecuada para aumentar la cantidad de ADN y se conoce en general como amplificación de todo el genoma (Whole Genome Amplification).

En el dispositivo de pre-amplificación, el ADN o ARN aislado y purificado se puede pre-tratar con, entre otros, un tampón de pre-amplificación y, en el caso, de amplificación de todo el genoma, con enzimas y DNTP. El dispositivo de pre-amplificación puede estar conectado a un dispositivo de desechado para el desechado de materiales.

En algunas realizaciones, el dispositivo de pre-amplificación también se puede usar para realizar algunos ensayos para la detección de ácidos nucleicos específicos. Ejemplos de los mismos son tecnologías similares a OLA-PCR tales como las proporcionadas por Applera (SNPplex), Keygene (SNPWave) y MRC-Holland (MPLA).

En algunas realizaciones, el sistema comprende un dispositivo de amplificación. El dispositivo de amplificación puede estar bajo el control de una unidad de control. El ADN aislado, opcionalmente pre-tratado como se describe en otra parte de este documento, se somete en el dispositivo de amplificación a un tratamiento de amplificación en el dispositivo de amplificación. El tratamiento de amplificación comprende poner al ADN aislado en contacto con un conjunto de cebadores de PCR que son específicos para el ácido nucleico diana, enzimas de PCR tales como una o más polimerasas y dNTP.

En algunas realizaciones, el dispositivo de amplificación contiene una pluralidad de cámaras. La pluralidad de cámaras permite que el ADN o ARN aislado o pre-amplificado se divida en partes y se distribuya entre las cámaras. En cada cámara, se puede realizar una etapa de amplificación usando un conjunto diferente de cebadores. De esta manera, se proporciona un análisis múltiple en el que una muestra se puede analizar en busca de la presencia, ausencia o cantidad de diferentes ácidos nucleicos diana. En el caso de análisis múltiple, el conjunto de cebadores para cada ácido nucleico diana puede estar equipado con una marca detectable de forma diferente, es decir con un espectro fluorescente diferente.

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

En algunas realizaciones, el sistema también puede comprender un dispositivo de detección. El dispositivo de detección puede estar bajo el control de una unidad de control. El dispositivo de detección es adecuado para la detección del ADN o ARN amplificado y, preferentemente, para la detección de las marcas que están incorporadas en los productos de amplificación.

El dispositivo de detección puede detectar en base a una marca, longitud, movilidad, secuencia de nucleótidos, masa o una combinación de las mismas. En algunas realizaciones, un dispositivo de detección puede detectar en base a óptica, electroquímica, magnetismo o movilidad (electroforesis en gel). En principio, se puede usar cualquier dispositivo de detección adecuado conocido de la técnica anterior.

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

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

En un aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento para la detección de la presencia, ausencia y/o cantidad de una secuencia de nucleótidos diana en una muestra que comprende una o más secuencias de ácido nucleico, en el que el procedimiento comprende las etapas de:

- proporcionar una muestra de un organismo;

- realizar etapas para el aislamiento de las secuencias de ácido nucleico de la muestra;

- realizar etapas para la amplificación de al menos parte de las secuencias de ácido nucleico para proporcionar, de este modo, amplicones;

- detectar la presencia, ausencia y/o cantidad de los amplicones correspondientes a la secuencia de nucleótidos diana entre las secuencias de ácido nucleico de la muestra,

con lo que el procedimiento se realiza en un cartucho como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.

En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos diana se puede seleccionar entre el grupo constituido por ADN, ADN genómico, ARN, ARNm, ADNc, ADN transgénico, etc.

En algunas realizaciones, el organismo es un ser humano, un animal no humano, un microorganismo o una planta.

En algunas realizaciones, la muestra es tejido, fluidos corporales tales como esputo, semen, sangre, orina y/o heces.

En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos diana es una secuencia exógena.

En algunas realizaciones, la secuencia nucleica diana es un patógeno.

En algunas realizaciones, la muestra que comprende las secuencias de ácido nucleico se somete a lisis para liberar las secuencias de ácido nucleico contenidas. En algunas realizaciones, la muestra lisada se somete a una secuencia de etapas de lavado y recogida como se conocen, a su vez, en la técnica y se describen en libros de texto convencionales que tienen como objetivo el aislamiento de los ácidos nucleicos de la muestra. Estas etapas se pueden realizar en una única etapa o como una secuencia de múltiples etapas. Después del aislamiento de los ácidos nucleicos de la muestra, los ácidos nucleicos se pueden someter a una reacción de amplificación usando cebadores que son selectivos para la detección del ácido nucleico diana.

Los procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos habitualmente emplean dos cebadores, dNTP, y una (ADN) polimerasa. Un procedimiento preferido para la amplificación es PCR. La "PCR" o "reacción en cadena de la polimerasa" es un procedimiento rápido para la amplificación enzimática in vitro de un segmento de ADN específico. El ADN a amplificar se desnaturaliza calentando la muestra. En presencia de ADN polimerasa y un exceso de desoxinucleótido trifosfatos, los oligonucleótidos que hibridan específicamente con la secuencia diana inician la síntesis de nuevo ADN. Una ronda de síntesis da como resultado nuevas cadenas de longitud determinada que, al igual que las cadenas parentales, pueden hibridar con los cebadores después de la desnaturalización y la hibridación. El segundo ciclo de desnaturalización, hibridación y síntesis produce dos productos de cadena sencilla que, juntos, componen un único producto de cadena doble, exactamente la longitud entre los extremos del cebador. Este producto único se acumula exponencialmente con cada sucesiva ronda de amplificación. A lo largo de aproximadamente 20 a 30 ciclos, puede conseguirse la amplificación de muchos millones de veces del fragmento individual. Los protocolos de PCR se conocen bien en la técnica, y se describen en libros de texto de laboratorio convencionales, por ejemplo Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc. (1995). Otros procedimientos de amplificación múltiple y/o isotérmica que se pueden aplicar incluyen por ejemplo LCR, replicación de secuencia auto-sostenida (3SR), amplificación de ARN mediada por Q-β-replicasa, amplificación por circulo rodante (RCA) o amplificación por desplazamiento de cadena (SDA).

La detección de los amplicones marcados se realiza mediante un detector para dar como resultado datos de detección. El detector depende, por supuesto, del sistema general con el que se realiza la discriminación entre los amplicones de las secuencias diana, pero también depende de la marca que está presente en el cebador, tal como una marca fluorescente o fosforescente. Para discriminar entre diferentes secuencias diana en la muestra, preferentemente se usa una diferencia en el espectro de fluorescencia de los amplicones correspondientes respectivos. En algunas realizaciones, al menos uno de los cebadores comprende una marca, preferentemente el cebador directo comprende una marca. La marca se puede seleccionar entre un grupo grande, que comprende, entre otros, restos fluorescentes y/o fosforescentes tales como colorantes, cromóforos o enzimas, antígenos, metales pesados, sondas magnéticas, restos fosforescentes, marcas radiactivas, restos quimioluminiscentes o restos de detección electroquímica. En algunas realizaciones la marca es un colorante fluorescente o fosforescente. Los ejemplos de dichos colorantes son FAM, HEX, TET, JOE, NED, y (ET-)ROX. Colorantes tales como FITC, Cy2, Rojo Texas, TAMRA, Alexa fluor 488TM, BodipyFL, Rodamina 123, R6G, Bodipy 530, AlexafluorTM532.

Usando diferentes conjuntos de cebadores que contienen una marca diferente, el número de secuencias diana que se puede discriminar en una muestra y, por lo tanto, el número de secuencias diana en una muestra que pueden detectarse puede aumentar usando marcas adicionales. El número máximo de marcas que se puede usar en una muestra en un procedimiento múltiple es gobernado principalmente por las limitaciones de las capacidades de detección de las plataformas de detección disponibles.

En algunas realizaciones, la amplificación se realiza usando la reacción en cadena de la polimerasa con al menos un cebador directo y al menos uno inverso que son selectivos para la secuencia diana y no para ninguna otra secuencia de la muestra.

En algunas realizaciones, al menos uno del cebador directo o inverso está marcado.

En algunas realizaciones, la etapa de amplificación viene precedida o está sustituida por un ensayo para la detección de ácidos nucleicos en muestras.

En algunas realizaciones, los amplicones se detectan en base a la marca, la longitud, la movilidad, la secuencia de nucleótidos, la masa o una combinación de las mismas.

En algunas realizaciones, los amplicones se detectan en base a detección óptica, electroquímica o magnética.

La figura 1 muestra una vista en perspectiva de un sistema según una realización de la invención;

La figura 2 muestra un diagrama de bloques esquemático de la arquitectura de una realización del sistema según la invención;

La figura 3 muestra una sección transversal esquemática (B-B en la figura 4) de una realización de un cartucho según la presente invención; y

La figura 4 muestra una vista superior/sección transversal esquemática (A-A en la figura 3) de la realización de la figura 3.

La figura 1 muestra una realización de un sistema para la detección de la presencia, ausencia y/o cantidad de una secuencia de nucleótidos diana en una muestra que comprende una o más secuencias de ácido nucleico, en general indicada con el número de referencia 1. El sistema comprende un aparato reutilizable 2 con una carcasa 3 (parcialmente rota).

En el aparato 2 se proporciona un hueco 4. Un cartucho intercambiable 5 está colocado de forma que pueda desmontarse en este hueco 4. El cartucho 5 puede ser reutilizable, reciclable o desechable.

Para hacer posible la detección, el cartucho 5 comprende medios de introducción para la introducción de una muestra, medios de aislamiento para el aislamiento de ADN, medios de amplificación para la amplificación de ADN, y medios de detección para la detección de ADN amplificado. Los medios de introducción, medios de aislamiento, medios de amplificación y/o medios de detección pueden estar dispuestos en el cartucho y/o en el aparato reutilizable. En general se prefiere disponer en el aparato 2 todas las partes del sistema 1 que normalmente no entran en contacto con la muestra. La muestra se mantiene durante todo el proceso de detección en el cartucho que funciona como un cartucho.

En lo sucesivo en este documento se describe una realización preferida de la disposición de los medios de introducción, medios de aislamiento, medios de amplificación y/o medios de detección. Sin embargo, también son posibles otras realizaciones.

El aparato 2 comprende una unidad de control 7 para controlar automáticamente las diferentes etapas del proceso de detección como se describirá en lo sucesivo en este documento.

Además, el aparato 2 comprende uno o más dispositivos de accionamiento para el accionamiento de diferentes elementos dispuestos en el cartucho. Estos dispositivos de accionamiento pueden comprender uno o más dispositivos de accionamiento de los medios de bomba para el accionamiento de uno o más medios de bomba para bombear fluido, uno o más dispositivos de accionamiento de la válvulas para el accionamiento de una o más válvulas que están dispuestas en un canal de fluido en el cartucho, y otros dispositivos de accionamiento tales como dispositivos de accionamiento mecánicos para proporcionar, por ejemplo, un movimiento de rotación o de traslación a una o más partes del cartucho.

En el aparato, está provisto un dispositivo de detección que puede detectar la presencia, ausencia y/o cantidad de ADN. Para este fin el ADN se puede colocar en una cámara de detección que está dispuesta en el cartucho. El dispositivo de detección puede funcionar en base a un principio óptico, electroquímico o magnético como es sabido en la técnica anterior. Se puede aplicar cualquier otro procedimiento de detección adecuado.

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

El aparato 2 comprende un portador 6 para soportar al cartucho 5. El portador 6 en móvil en una dirección vertical entre una posición inferior (en la que se muestra el portador) y una posición superior. En la posición inferior, el cartucho 5 se puede colocar sobre o tomarse del portador 6. La posición superior es la posición de trabajo en la que el cartucho 5 se posiciona durante el proceso de detección. En esta posición superior, el cartucho se sujeta entre el portador 6 y la serie de dispositivos que se disponen sobre el cartucho, tales como medios de bomba, válvulas, medios mecánicos, y una cámara de detección, pueden cooperar con dispositivos correspondientes que se disponen en el aparato 2, tales como medios de bomba, válvula y otros dispositivos mecánicos de accionamiento, y un dispositivo de detección.

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

En la figura 2 se muestra un diagrama de bloques esquemático en el que se muestran las diferentes etapas de proceso del proceso de detección que usa el procedimiento según la presente invención. Este diagrama se usa para explicar la arquitectura principal del cartucho 5 y la relación entre el aparato 2 y el cartucho 5.

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

En una segunda etapa ("lisis") la muestra se trata para proporcionar cualesquiera ácidos nucleicos de la muestra en una forma en que puedan aislarse a partir de la muestra. Esta etapa de lisis incluye típicamente la lisis de las células de modo que las membranas celulares y/o nucleares se rompen para liberar de este modo los ácidos nucleicos contenidos en su interior. La etapa de lisis se realiza en una cámara de lisis que forma parte de un dispositivo de lisis. Esta cámara de lisis está en comunicación fluida con el dispositivo de introducción para la muestra, por ejemplo por medio de un canal de fluido. Pueden estar provistos medios de bombeo para bombear la muestra desde la cámara de introducción a la cámara de lisis.

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

En una realización, el dispositivo de lisis comprende un medio de manipulación física o mecánica para la etapa de lisis. En otra realización, o la misma realización, (también) se pueden usar medios químicos para la lisis de las células de la muestra, tales como un tampón de lisis. Dicho tampón de lisis puede estar contenido antes del uso en un recipiente diferente para el tampón de lisis que está en comunicación fluida con la cámara de lisis. Una válvula, preferentemente una válvula de una vía, puede estar provista en el canal de fluido que conecta el recipiente del tampón de lisis y la cámara de lisis.

Se pueden proporcionar medios de mezclado para mezclar la muestra y el tampón de lisis. Estos medios de mezclado pueden ser accionados por el aparato.

La lisis y posiblemente el mezclado se realizan bajo el control de la unidad de control del aparato 2. Los medios de válvula y de bomba son accionados por los dispositivos de accionamiento de los medios de válvula y de bomba que están dispuestos en el aparato 2.

Cualquier fluido de desecho que es producido por la etapa de lisis se puede desechar, por ejemplo a un dispositivo de desechado que puede estar presente en el cartucho. Dicho dispositivo de desechado puede estar realizado como una cámara de desechado que está en comunicación fluida con la cámara de lisis.

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

La etapa de enriquecimiento se realiza en una cámara de enriquecimiento que está en comunicación fluida con la cámara de lisis. En el canal de fluido entre la cámara de lisis y la cámara de enriquecimiento está provista una válvula para hacer posible que solamente sea posible un flujo a través del canal de fluido cuando se requiera. La válvula puede ser accionable por el medio de accionamiento de la válvula provisto en el aparato.

En esta realización, el ADN o ARN de la presente invención se absorbe en partículas magnéticas. El material de ácido nucleico absorbido se puede someter a una o más etapas de lavado, drenaje y/o purificación para retirar cualquier material no deseado tal como restos de material biológico contenidos en la muestra y otros componentes de la muestra que no son ADN y/o ARN. Esta etapa de lavado y purificación se muestra como una cuarta etapa "lavado y purificación" en la figura 2. Sin embargo, la etapa de "lavado y purificación" también se puede contemplar como parte de la etapa de "enriquecimiento". Cuando el ADN o ARN absorbido es de una pureza deseada, puede desorberse o eluirse de las partículas magnéticas. La etapa de lavado y purificación se realiza en una cámara de lavado. En la presente realización, esta cámara de lavado es la misma que la cámara de enriquecimiento. Sin embargo, en otras realizaciones se puede proporcionar una cámara diferente.

El cartucho 5 está provisto de uno o más recipientes para tampón de lavado y tampón de elución para contener el o los tampones de lavado y el o los tampones de elución, respectivamente. Cada uno de estos recipientes para tampón de lavado y tampón de elución está en comunicación fluida con la cámara de lavado, y de nuevo cada uno de los canales de fluido que proporciona esta comunicación fluida está provisto de una válvula, preferentemente una válvula de una vía. Se pueden proporcionar recipientes similares para cualesquiera otros reactivos que sean necesarios para la etapa de enriquecimiento, es decir el aislamiento del ADN o ARN.

Las válvulas del dispositivo de enriquecimiento se accionan mediante el dispositivo de accionamiento de la válvula del aparato 2 y pueden estar bajo el control de la unidad de control 7.

En una realización alternativa, el dispositivo de enriquecimiento también puede estar equipado con medios de manipulación física o mecánica de los fluidos para mezclar, separar y aislar el ADN o ARN. Dichos medios de manipulación física o mecánica pueden ser accionados mediante un dispositivo de accionamiento del aparato 2 y pueden estar bajo el control de la unidad de control 7 del aparato.

Cualquier residuo producido a partir de la etapa de enriquecimiento tal como tampones usados, fluidos de lavado y similares pueden guiarse a un dispositivo de desechado. Este dispositivo de desechado que forma parte del cartucho

puede ser el mismo dispositivo de desechado que el dispositivo de desechado descrito en el dispositivo de lisis. Como alternativa, los dispositivos de desechado de la etapa de lisis y la etapa de enriquecimiento pueden ser diferentes para cada fin o volumen diferente.

En una quinta etapa ("pre-amplificación") la cantidad total de ADN o ARN que se ha de analizar puede aumentar mediante el uso de un dispositivo de pre-amplificación. Al someter al ADN o ARN obtenido de la etapa de aislamiento a una etapa de pre-amplificación puede aumentar la cantidad total de ADN. Esto es ventajoso, especialmente en el caso de análisis múltiple, donde se realizan múltiples ensayos sobre el ADN aislado, por ejemplo para detectar la presencia, ausencia o cantidad de múltiples patógenos en una muestra al mismo tiempo.

El dispositivo de pre-amplificación comprende una cámara de pre-amplificación en la que se realiza la preamplificación. La cámara de pre-amplificación puede ser la misma cámara que o una cámara diferente de la cámara de enriquecimiento y/o la cámara de lavado. El dispositivo de pre-amplificación está bajo el control de la unidad de control 7.

En el dispositivo de pre-amplificación, el ADN o ARN aislado y purificado se puede pretratar con, entre otros, un tampón de pre-amplificación y, en el caso de amplificación de todo el genoma, con enzimas y DNTP. Antes del uso, este tampón de pre-amplificación está contenido en un recipiente de tampón que está en comunicación fluida con la cámara del proceso previa, por ejemplo la cámara de lavado. Una válvula puede estar en el canal de fluido, proporcionando la comunicación fluida.

El dispositivo de pre-amplificación puede estar conectado a un dispositivo de desechado para el desechado de materiales.

En una sexta etapa ("amplificación") el ADN aislado, opcionalmente pre-tratado como se describe en otra parte de este documento, se somete en el dispositivo de amplificación a un tratamiento de amplificación. El tratamiento de amplificación comprende poner al ADN aislado en contacto con un conjunto de cebadores de PCR que son específicos para el ácido nucleico diana, enzimas de PCR tales como una o más polimerasas y dNTP.

Con este fin, el dispositivo de amplificación comprende una pluralidad de cámaras de amplificación. La pluralidad de cámaras de amplificación permite que ADN o ARN aislado o pre-amplificado se divida en partes y se distribuya entre las cámaras. En cada cámara, se puede realizar una etapa de amplificación usando un conjunto diferente de cebadores. De esta manera, se proporciona un análisis múltiple en el que se puede analizar una muestra en busca de la presencia, ausencia o cantidad de diferentes ácidos nucleicos diana. En el caso de análisis múltiple, el conjunto de cebadores para cada ácido nucleico diana puede estar equipado con una marca detectable de forma diferente, es decir con un espectro fluorescente diferente.

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

En una etapa final ("detección") se detectan el ADN o ARN amplificado y, preferentemente, las marcas que están incorporadas en los productos de amplificación. Para este fin, el sistema 1 comprende un dispositivo de detección. Este dispositivo de detección comprende una cámara de detección que se dispone sobre el cartucho 5. Otras partes del dispositivo de detección pueden estar dispuestas en el aparato reutilizable 2 como se ha descrito en este documento anteriormente. La cámara de detección está en comunicación fluida con las una o más cámaras de amplificación para introducir simultánea o posteriormente el ADN o ARN de las una o más cámaras de amplificación. Pueden estar provistas válvulas en el canal de fluido que conecta la cámara de detección con las una o más cámaras de amplificación.

El dispositivo de detección puede estar bajo el control de la unidad de control 7. El dispositivo de detección puede detectar en base a la marca, la longitud, la movilidad, la secuencia de nucleótidos, la masa o una combinación de las mismas. En algunas realizaciones, un dispositivo de detección puede detectar en base a óptica, electroquímica, magnetismo o movilidad (electroforesis en gel). En principio se puede usar cualquier dispositivo de detección adecuado conocido de la técnica anterior.

La información detectada puede ser recogida por el medio de recogida de datos y procesada por los medios de procesamiento de datos para llegar, por ejemplo, a cierto diagnóstico.

Todos los flujos de fluido en el cartucho se pueden obtener mediante medios de bomba que están provistos en el cartucho. Dichos medios de bomba pueden funcionar en base a la compresión o la expansión de espacios en el cartucho, en particular los espacios de las respectivas cámaras del proceso, es decir la cámara de introducción, la cámara de lisis, la cámara de pre-amplificación, la cámara de lavado y de purificación, la cámara de amplificación y la cámara de detección, y los respectivos recipientes para reactivos. Estos medios de bomba también pueden ser de cualquier otro tipo adecuado.

Los medios de bomba en el cartucho son accionados por los dispositivos de accionamiento de los medios de bomba provistos en el aparato 2. Estos dispositivos de accionamiento de los medios de bomba están bajo el control de la unidad de control 7.

En las trayectorias o canales de fluido entre las diferentes cámaras de proceso, es decir la cámara de introducción, la cámara de lisis, la cámara de pre-amplificación, la cámara de lavado y de purificación, la cámara de amplificación y la cámara de detección, y los respectivos recipientes para reactivos, pueden estar provistas válvulas para permitir un flujo solamente cuando se requiera. Dado que la mayor parte del fluido pasará los canales de fluido solamente en una dirección, las válvulas son preferentemente válvulas de una vía.

Las válvulas pueden ser accionadas por dispositivos de accionamiento de la válvula que se disponen preferentemente en el aparato 2.

Todas las etapas como se han descrito anteriormente pueden estar bajo el control de la unidad de control 7.

Las figuras 3 y 4 muestran con más detalle una realización de un cartucho indicado generalmente con el número de referencia 10, en el que se pueden realizar los procedimientos como se han descrito anteriormente. El cartucho comprende una parte genérica 11 que tiene una serie de cámaras de proceso, y sistemas de manejo de fluido como se describirá más adelante en este documento.

Las diferentes partes del cartucho 10 se describirán más adelante en este documento en el orden en el que se usarán cuando se realiza un procedimiento de detección para la detección de la presencia, ausencia y/o cantidad de una secuencia de nucleótidos diana en una muestra que comprende una o más secuencias de ácido nucleico.

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

Por ejemplo, la muestra se puede proporcionar en estado sólido, por ejemplo sangre seca, mientras que el cartucho está diseñado para procesar una muestra en estado fluido. En tal caso hay que llevar a la muestra a estado fluido antes de poder procesarla en el cartucho. Dicho procesamiento se puede realizar proporcionando enzimas adecuadas en un medio adecuado en el dispositivo pre-lisis 12. Dichos procesos se conocen en la técnica, tales como por ejemplo tripsinización. Proporcionando un dispositivo de pre-lisis que puede estar conectado a la parte genérica 11, se puede realizar el procesamiento de la muestra hasta el estado deseado sin necesidad de transferir la muestra después de su procesamiento, con lo que se evita cualquier posibilidad de contaminación. El procesamiento de la muestra al estado deseado se puede realizar antes o después de que el dispositivo de pre-lisis esté conectado a la parte genérica 11.

Cuando no se necesita ningún procesamiento de la muestra, dado que la muestra ya está en un estado en el que puede ser procesada por el cartucho, el dispositivo de pre-lisis también puede estar indicado como un dispositivo de introducción de la muestra. El dispositivo de introducción de la muestra se usa a continuación para introducir la muestra en el cartucho sin riesgo de contaminación alguna, ya que el dispositivo de introducción de la muestra está diseñado para conectarse a la parte genérica 11, para la introducción de la muestra en el cartucho 10.

Cuando la muestra se introduce en el cartucho 10, ésta puede ser bombeada a la cámara de lisis 13. La parte genérica 11 del cartucho 10 comprende medios de manejo de fluido que incluyen bombas y válvulas para bombear la muestra a las diferentes cámaras de proceso. En general, la parte genérica 11 comprende dos componentes principales 14, 15 que se colocan uno contra el otro con la interposición de una membrana flexible 16. Los dos componentes principales 14, 15 comprenden huecos que, junto con la membrana flexible 16, pueden formar cámaras de bomba, válvulas, canales de fluido, estaciones de almacenamiento de fluido y similares.

En el cartucho mostrado en los dibujos, la muestra se mantendrá principalmente por encima de la membrana flexible, mientras que las bombas 17 y las válvulas 18 son accionadas principalmente desde el lado inferior de la membrana flexible 16. El fluido puede ser bombeado dentro o fuera de una cámara moviendo la membrana flexible para aumentar o reducir el espacio dentro de la cámara, respectivamente. La membrana flexible se puede mover, por ejemplo, introduciendo aire o fluido en el espacio entre la membrana flexible 16 y el componente 15. El aire o fluido puede ser introducido a través de los canales 19. Las otras cámaras de bomba externas también se pueden usar como cámaras de bomba de una manera correspondiente. También se pueden usar otros medios para mover la membrana flexible tales como accionadores mecánicos. Las válvulas se pueden accionar mediante presión de aire o fluido, accionamiento mecánico o cualquier otro dispositivo de accionamiento adecuado. El movimiento de la membrana flexible 16 con respecto al componente 14 también se puede usar para abrir y cerrar un asiento de válvula, con lo que, por ejemplo, en la posición cerrada de una válvula, la membrana flexible 16 se mantiene contra el extremo de un canal del componente 14.

En sí mismos, dichos sistemas basados en cartucho que tienen el tipo de bombas 17 y válvulas 18 para el manejo de fluidos como se describe, se han descrito anteriormente, sin embargo, aunque no con el fin de la presente invención. Se hace referencia, entre otros, a los documentos US 6156270, USD 37164, USD 351913, US 6382923, US 6663359, US 6416293, US 4865584 y US 4479760.

En la cámara de lisis 13, la muestra se lisará como se ha descrito anteriormente en este documento en la etapa 2 en relación con la figura 2. Un almacenamiento de lisis 20 está provisto para almacenar un tampón de lisis antes de bombearlo a la cámara de lisis.

Después de la etapa de lisis, la muestra se puede bombear a una segunda cámara de proceso 21 en la que la muestra se puede enriquecer según la etapa 3 y lavarse y purificarse según la etapa 4 como se ha descrito anteriormente en este documento. Se proporcionan almacenamientos de fluido 22 para el almacenamiento de diferentes tampones de lavado y purificación que se pueden usar durante las etapas de lavado y purificación. Estos almacenamientos de fluido 22 están en comunicación fluida mediante válvulas con la segunda cámara de proceso 21.

Después de la posible pre-amplificación (como se describe en la etapa 6 en relación con la figura 2) que también se puede realizar en la segunda cámara de proceso 21 o en la cámara 23, la muestra se puede introducir en el cuerpo de PCR 24.

Este cuerpo de PCR 24 es una segunda parte específica para una aplicación del cartucho. El cuerpo de PCR 24 es circular, en forma de disco y está conectado con una conexión de ajuste por trinquete 25 a la parte genérica 11.

El cuerpo de PCR 24 comprende seis cámaras de termociclado 26, de modo que se pueden realizar simultáneamente seis procesos de PCR en la muestra. Dicho proceso de amplificación por PCR se ha descrito anteriormente en este documento como la etapa 6 en relación con la figura 2. Cada una de las cámaras de termociclado 26 está provista de al menos un cebador específico.

El cuerpo de PCR 24 se puede seleccionar entre un grupo de diferentes tipos de cuerpos de PCR que comprenden cada uno un conjunto diferente de cebadores, un número diferente de cámaras y/o un tamaño o geometría de las cámaras diferente. Por ejemplo, el cuerpo de PCR que comprende los cebadores se puede seleccionar en base a los paneles de bacterias/resistencias que deben detectarse, selección que puede ser específica para un ensayo particular o para una región particular, tal como Europa, Asia o África.

Los cebadores se localizan en una pared de las cámaras de termociclado, por ejemplo, mediante un procedimiento de inyección de tinta, de modo que, durante el almacenamiento de los cuerpos de PCR, no hay que tomar medidas especiales para evitar que los cebadores fluyan fuera del cuerpo de PCR, lo que sería el caso por ejemplo si se usaran cebadores en estado fluido. En tal caso, se puede proporcionar un sello o cámara sellada diferente para contener los cebadores y cualquier otro fluido específico para una aplicación antes de su uso.

Después de la etapa de amplificación el ADN o ARN amplificado y preferentemente las marcas que están incorporadas en los productos de amplificación se bombean al dispositivo de detección 27. Este dispositivo de detección o al menos una parte del mismo es una tercera parte específica para una aplicación del cartucho 10, que es una parte diferente y puede estar conectada a la parte genérica 11. En la realización mostrada, el dispositivo de detección está conectado a la parte genérica 11 mediante una conexión de ajuste por trinquete.

Dependiendo del tipo de procedimiento de detección y/o de medios de detección (como se ha descrito en esta solicitud; en particular la etapa seis descrita en relación con la figura 2), se puede seleccionar un dispositivo de detección entre una serie de diferentes dispositivos de detección específicos para una aplicación que pueden estar diseñados específicamente para cada procedimiento de detección respectivo.

En algunos casos, el tipo de dispositivo de detección que se usará en el cartucho 11 dependerá del tipo de cuerpo de PCR que se usa para el proceso de amplificación. A continuación la elección de un cuerpo de PCR conducirá automáticamente a una elección del dispositivo de detección.

La parte genérica 11 y las partes específicas para una aplicación están provistas de un dispositivo de identificación, de modo que después del ensamblaje de las partes genéricas y específicas para una aplicación, se puede comprobar si se ha realizado la combinación correcta. Posiblemente, se usa un sistema de identificación más avanzado, como por ejemplo una marca de RF, que comprende marcas de identificación que se pueden comprobar automáticamente y de la cual posiblemente se puede rastrear incluso el historial. Dicha comprobación y rastreo del historial pueden estar controlados por la unidad de control del aparato reutilizable como una etapa en el procedimiento para procesar la muestra del cartucho.

Una ventaja adicional de la construcción del presente cartucho con una parte genérica y una o más partes específicas para una aplicación es que la conexión entre la parte genérica y cada una de las partes específicas para una aplicación

se puede hacer fácilmente hermética al aire, de modo que todo el espacio en el que la muestra y otros fluidos usados en el cartucho puede estar cerrado respecto al entorno. De esta manera, se evita la contaminación de la muestra durante la introducción de la muestra en el cartucho y el procesamiento de la misma y, dado que la muestra está en un entorno cerrado que tiene su propia presión interna, el procesamiento de la muestra se puede realizar independientemente de la presión del aire en el entorno directo, y también independientemente de otras condiciones del entorno como la humedad. Esto hace posible un procesamiento más fiable de la muestra.

Se contempla que el cartucho según la presente invención puede comprender otras partes específicas para una aplicación diferentes de las partes específicas para una aplicación identificadas en la descripción anterior. Se considera que la aplicación de dichas otras partes específicas para una aplicación diferentes en el cartucho está dentro del alcance de la presente invención. Los ejemplos de dichas partes específicas para una aplicación pueden comprender recipientes de fluido que contienen un fluido tal como enzimas, reactivos y otras sustancias químicas para una aplicación específica, dispositivos de mezclado y otros dispositivos de manipulación mecánica con diferentes geometrías o tamaños para una aplicación específica y otros.

La invención también se puede usar para partes específicas del cartucho que tienen que ser pre-tratadas o tienen que mantenerse a cierta temperatura que no se desea o se requiere para las otras partes del cartucho. Por ejemplo, la provisión de un recipiente de fluido diferente que se puede usar en el pre-tratamiento o almacenarse en una ubicación diferente, y que se puede conectar, por consiguiente a la parte genérica del cartucho antes del uso, puede ser muy útil dado el riesgo de contaminación de esa parte, en particular se evita el fluido en su interior, dado que el fluido no tiene que transferirse desde un recipiente al cartucho en un entorno abierto.

Dicho uso de una parte diferente se contempla como específico para una aplicación dentro del significado de la presente invención, incluso aunque la misma parte se usa en una serie de diferentes aplicaciones. Un ejemplo de dicha parte diferente es un recipiente de fluido diferente para una llamada mezcla maestra de PCR que tiene que almacenarse a una temperatura baja antes del uso en el cartucho. Justo antes de que el cartucho se introduzca en el aparato reutilizable, el recipiente de fluido diferente está conectado a la parte genérica del cartucho, por ejemplo mediante una conexión de ajuste por trinquete.

REIVINDICACIONES

1. Un cartucho para la detección de la presencia, ausencia y/o cantidad de una secuencia de nucleótidos diana en una muestra que comprende una o más secuencias de ácido nucleico, en el que

- el cartucho (5, 10) comprende una parte genérica (11) y una o más partes específicas para una aplicación separadas, que se pueden conectar a la parte genérica (11), y

- al menos una de la una o más partes específicas para una aplicación se puede conectar al cuerpo principal con una conexión de ajuste por trinquete para establecer una comunicación fluida entre dicha parte genérica y dichas partes específicas para una aplicación, y

- la parte genérica comprende (i) medios de manipulación de fluidos, (ii) varias cámaras de proceso (21) que se utilizan independientemente de la aplicación específica del cartucho, y (iii) alojamientos de almacenamiento y desechado de fluido para diferentes fluidos, en particular tampones de lisis y de lavado.

2. Un cartucho según la reivindicación 1, en el que una de las una o más partes específicas es un cuerpo de PCR (24) que tiene una o más cámaras de termociclado (26) y que comprende una serie de cebadores.

3. Un cartucho según la reivindicación 2, en el que al menos un cebador se dispone en cada una de las una o más cámaras de termociclado (26).

4. Un cartucho según la reivindicación 2 ó 3, en el que al menos uno de la serie de cebadores está localizado en el cuerpo de PCR (24).

5. Un cartucho según cualquiera de las reivindicaciones 2-4, en el que el cuerpo de PCR (24) tiene forma de disco.

6. Un cartucho según cualquiera de las reivindicaciones 2-5, en el que el cuerpo de PCR (24) comprende una o más masas térmicas.

7. Un cartucho según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que una de las una o más partes específicas para una aplicación es un dispositivo de detección (27).

8. Un cartucho según la reivindicación 2 y 7, en el que el dispositivo de detección (27) se selecciona en base a los cebadores del cuerpo de PCR (24).

9. Un cartucho según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que una de las una o más partes específicas para una aplicación es un dispositivo de introducción de la muestra configurado para preparar una muestra en un estado específico.

10. Un cartucho según la reivindicación 9, en el que el dispositivo de introducción de la muestra es un dispositivo de pre-lisis (12) configurado para preparar una muestra en un estado específico.

11. Un cartucho según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que cada espacio para contener la muestra o parte de la misma en la parte genérica (11) y las una o más partes específicas para una aplicación es hermético al aire.

12. Un cartucho según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que

- al menos una de las una o más partes específicas para una aplicación está provista de un dispositivo de identificación; o

- cada una de las una o más partes específicas para una aplicación y la parte genérica está provista de un dispositivo de identificación.

13. Un cartucho según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dichas partes específicas para una aplicación se seleccionan entre:

- cuerpos de PCR (25) que tienen una o más cámaras de termociclado y que comprende una serie de cebadores,

- dispositivos de detección (27),

- dispositivos de introducción de la muestra,

- recipientes de fluido que contienen un fluido,

- dispositivos de mezcla o de manipulación química.

14. Sistema para la detección de la presencia, ausencia y/o cantidad de una secuencia de nucleótidos diana en una muestra que comprende una o más secuencias de ácido nucleico, en donde

- dicho sistema (1) comprende un aparato (2) reutilizable y un cartucho (5, 10), y

- dicho aparato (2) está configurado (i) para recibir un cartucho (5, 10) según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, y (ii) para controlar un proceso para la detección de la presencia, ausencia y/o cantidad de una secuencia de nucleótidos diana en la muestra, que está presente en dicho cartucho (5, 10).

15. Un procedimiento para la detección de la presencia, ausencia y/o cantidad de una secuencia de nucleótidos diana en una muestra que comprende una o más secuencias de ácido nucleico, en el que el procedimiento comprende las etapas de:

- proporcionar una muestra de un organismo;

- realizar etapas para el aislamiento de las secuencias de ácido nucleico de la muestra;

- realizar etapas para la amplificación de al menos parte de las secuencias de ácido nucleico para proporcionar, de este modo, amplicones;

- detectar la presencia, ausencia y/o cantidad de los amplicones correspondientes a la secuencia de nucleótidos diana entre las secuencias de ácido nucleico de la muestra,

caracterizado por que el procedimiento se está realizando en un cartucho según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.

16. Un procedimiento según la reivindicación 15, en el que el procedimiento comprende además la selección de una o más partes específicas para una aplicación y el montaje de dicha parte específica para una aplicación sobre la parte genérica del cartucho.

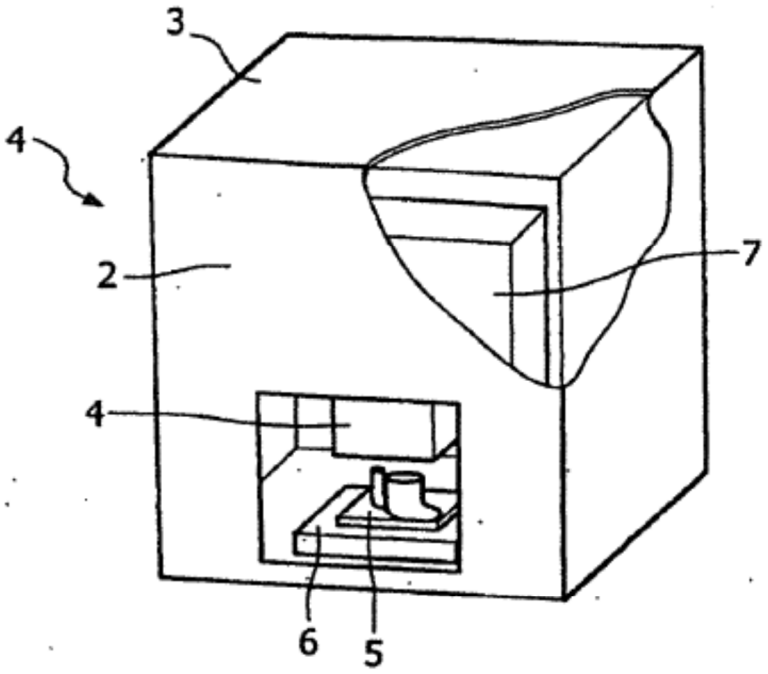

FIG. 1

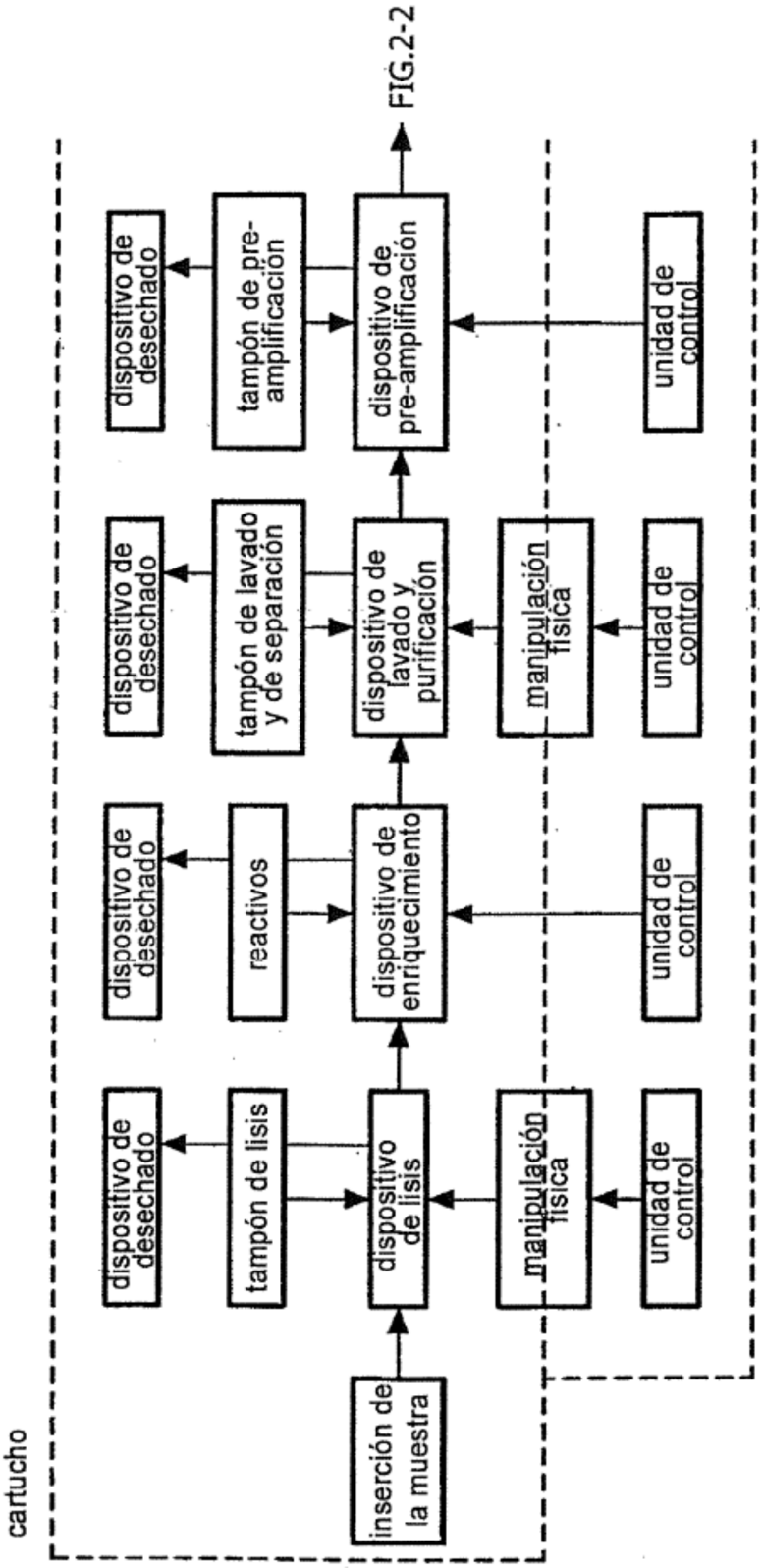
cartucho
inserción de la muestra
dispositivo de lisis
tampón de lisis
dispositivo de desechado
manipulación física
unidad de control
dispositivo de enriquecimiento
reactivos
dispositivo de desechado
unidad de control
dispositivo de lavado y purificación
tampón de lavado y de separación
dispositivo de desechado
manipulación física
unidad de control
dispositivo de pre-amplificación
tampón de pre-amplificación
dispositivo de desechado
unidad de control
FIG.2-2

FIG. 2-1

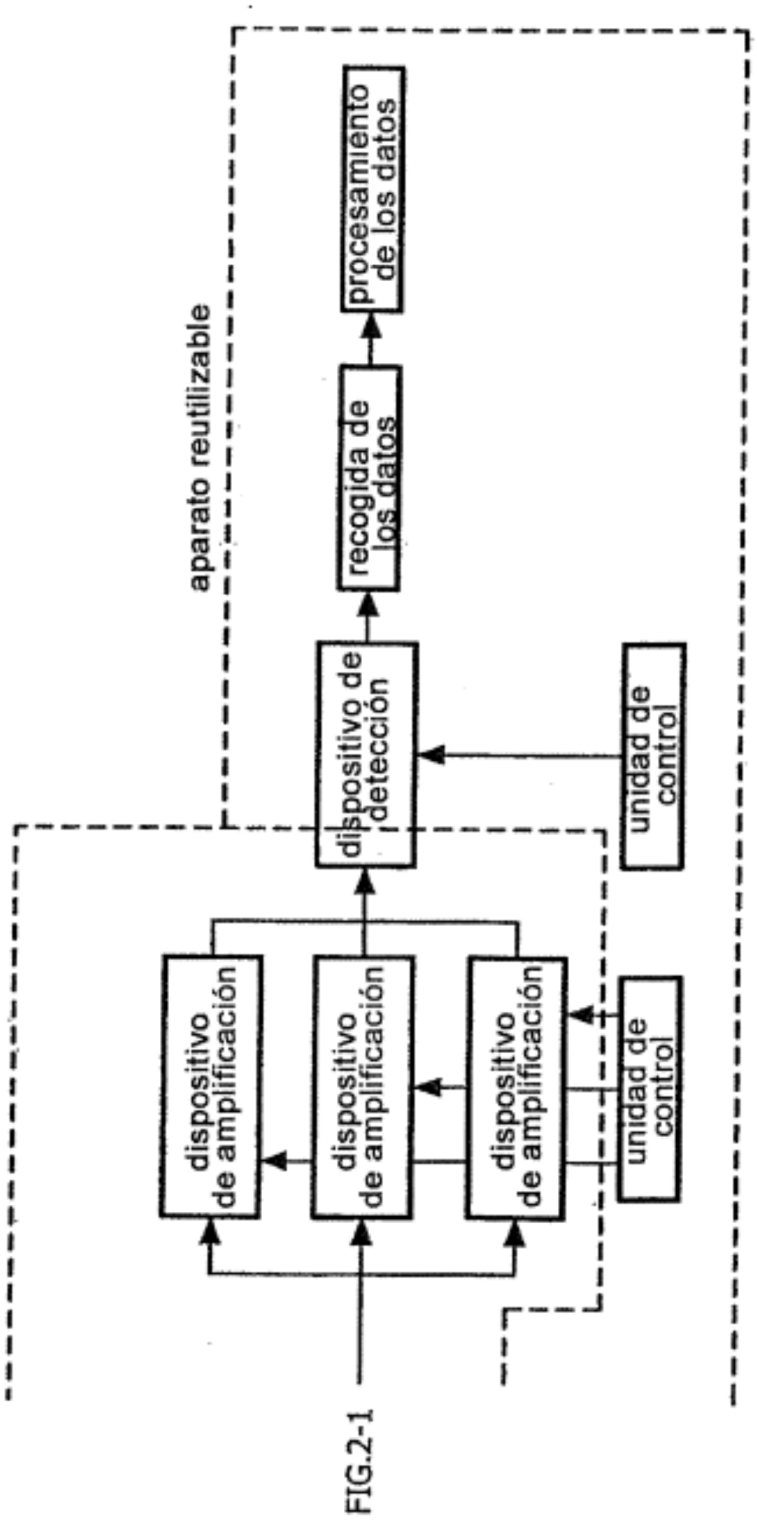
aparato reutilizable
procesamiento de los datos
recogida de los datos
dispositivo de detección
unidad de control
dispositivo de amplificación
dispositivo de amplificación
dispositivo de amplificación
unidad de control
FIG.2-1

FIG. 2-2

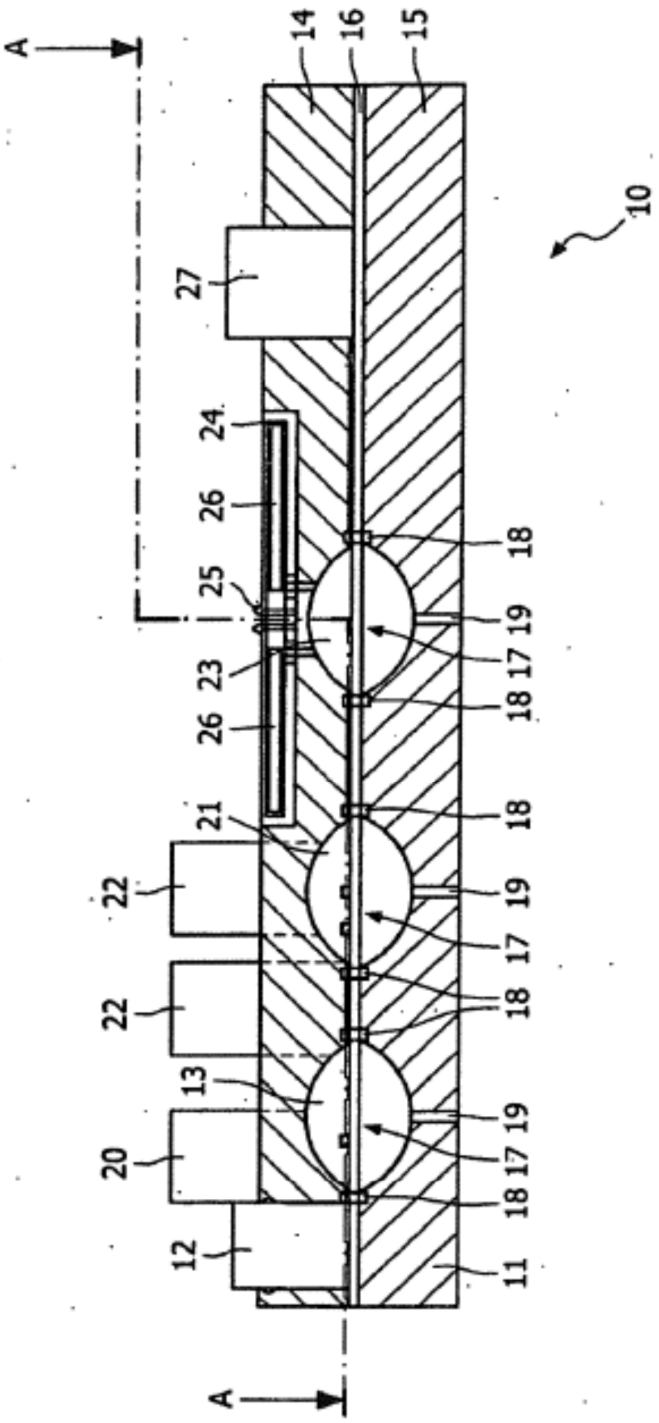
A
14
16
15
10
27
24
26
25
23
26
21
22
22
13
20
12
18
19
17
18
19
17
18
19
17
18
11
A

FIG. 3

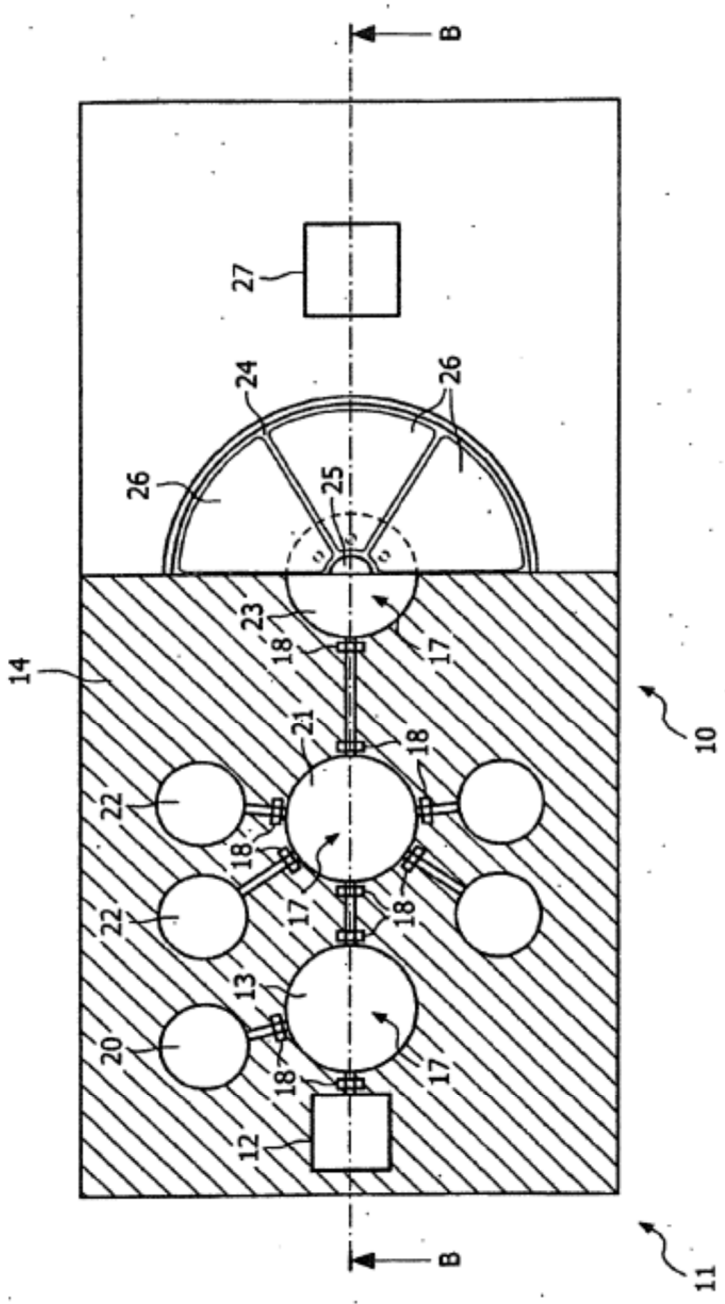
B
27
24
26
26
25
23
18
17
14
21
18
10
22
18
18
22
17
18
13
20
18
17
12
B
11

FIG. 4