

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 692 805**

51 Int. Cl.:

G01N 1/28 (2006.01)

C12N 1/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.03.2017 E 17161753 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.08.2018 EP 3222989**

54 Título: **Dispositivo de análisis de una muestra biológica**

30 Prioridad:

21.03.2016 FR 1652378

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

05.12.2018

73 Titular/es:

**COMMISSARIAT À L'ÉNERGIE ATOMIQUE ET
AUX ÉNERGIES ALTERNATIVES (100.0%)
25 rue Leblanc, Bâtiment "Le Ponant D"
75015 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**GOSELIN, DAVID;
BERTHIER, JEAN;
BOURDAT, ANNE-GAËLLE y
VENTOSA, JÉROME**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 692 805 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 de análisis de una muestra biológica

5 Campo técnico de la invención

La presente invención se refiere a un dispositivo de análisis de una muestra biológica que comprende especies biológicas. Este dispositivo de análisis permite, en particular, realizar una concentración y una purificación de las especies biológicas presentes en la muestra, una lisis de estas especies para extraer el material biológico a analizar, después una separación de este material biológico y una reacción de amplificación para la detección de un patógeno en la muestra.

Estado de la técnica

15 La detección de patógenos en una muestra biológica se realiza frecuentemente empleando un material pesado y poco adecuado, en particular para un análisis rápido sobre el terreno. La detección necesita en particular una etapa de lisis de las especies biológicas contenidas en la muestra para triturar dichas especies, después de las etapas de concentración y de purificación.

20 En el estado de la técnica, se conocen unos dispositivos que permiten realizar las etapas de concentración, de purificación y de lisis mecánica. La solicitud de patente WO2015/181743A1 describe en particular tal dispositivo. En este, la lisis mecánica se realiza por cizallamiento entre dos paredes, teniendo una de las dos paredes una superficie de apoyo rugosa. Tal dispositivo permite esencialmente realizar la trituración y no es adecuado para realizar un análisis más completo de una muestra biológica.

25 Existen, por otro lado, soluciones que permiten realizar una detección de la presencia de patógeno por amplificación y detección por colorimetría o turbiedad o medición del pH. Tales soluciones se describen, por ejemplo, en las publicaciones siguientes:

30 - "Visual detection of isothermal nucleic acid amplification using pH-sensitive dyes", Nathan A. Tanner *et al.* - BioTechniques, Vol. 58, nº 2, febrero de 2015, p. 59-68.

- "Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue", Motoki Goto *et al.* - BioTechniques, Vol. 46, nº 3, marzo de 2009, p. 167-172.

35 - "Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Rapid Detection of Common Strains of Escherichia coli", Hill J, Beriwal S, Chandra I, *et al.* - Journal of Clinical Microbiology. 2008;46(8):2800-2804. doi:10.1128/JCM.00152-08.

40 - "Visual Detection of Norovirus Genogroup II by Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification with Hydroxynaphthol Blue Dye", Jianming, Ziqian Xu, Kai Nie, Xiong Ding, Li Guan, Ji Wang, Yuying Xian, Xiyang Wu, Xuejun Ma - Food and Environmental Virology, septiembre de 2014, Volumen 6, publicación 3, p. 196-201.

Sin embargo, no existe un dispositivo que permita realizar un análisis global y completo de una muestra biológica y que sea:

45 - fácilmente transportable,

- fácil de usar,

50 - fiable,

- poco costoso.

55 El objetivo de la invención es proponer un dispositivo de análisis de una muestra biológica que permita cumplir estos diferentes objetivos.

Descripción de la invención

60 Este objetivo se alcanza mediante un dispositivo de análisis de una muestra biológica que comprende especies biológicas, comprendiendo dicho dispositivo:

- una caja que comprende al menos una abertura,

65 - un canal de inyección dispuesto en dicha caja y por el cual se puede inyectar dicha muestra biológica en forma de un fluido,

- un canal de evacuación dispuesto en dicha caja,
- una cámara en la que desemboca el canal de inyección y el canal de evacuación,

5 - un filtro que separa dicha cámara en dos espacios distintos, a fin de definir un primer espacio en el que desemboca dicho canal de inyección y un segundo espacio en el que desemboca dicho canal de evacuación, presentando dicho filtro una porosidad adecuada para la separación a efectuar,

10 - una superficie de apoyo rugosa que presenta un parámetro de rugosidad de superficie adecuada para realizar una lisis mecánica de dichas especies biológicas, estando dispuesta dicha superficie de apoyo en dicho primer espacio, comprendiendo dicho filtro al menos una parte que presenta una deformabilidad elástica suficiente para alcanzar dicha superficie de apoyo rugosa durante el ejercicio de una fuerza de apoyo,

15 - una membrana flexible dispuesta en el lado opuesto de la superficie de apoyo rugosa con respecto al filtro y que obtura la abertura realizada a través de la caja.

Con respecto al estado de la técnica, se comprende en particular que la arquitectura del dispositivo permite disociar las funciones de separación y de lisis mecánica. Esto presenta, en particular, la ventaja de poder asegurar una de las dos etapas, sin efectuar obligatoriamente la otra. Y esto permite también modificar las características del filtro independientemente de las características de la superficie de apoyo rugosa para efectuar la lisis.

Además, la arquitectura del dispositivo permitirá ventajosamente realizar la separación en la cámara, manteniendo en la cámara al mismo tiempo los contaminantes (en el primer espacio de la cámara) y el material biológico a estudiar (en el segundo espacio de la cámara).

25 Según una particularidad, la membrana se realiza de un material transparente. Esto permitirá, en particular, realizar una detección visualizando el contenido de la cámara a través de la membrana.

30 Según otra particularidad, la caja comprende al menos una pared realizada de un material transparente.

Según otra particularidad, el dispositivo comprende unos medios de calentamiento dispuestos para calentar la cámara a una temperatura determinada.

35 Según otra particularidad, la caja comprende una pared inferior, una pared lateral y una pared superior.

Según otra particularidad, el canal de inyección y el canal de evacuación se realizan, por ejemplo, a través de dicha pared superior de la caja.

40 Según otra particularidad, dicha abertura obturada por la membrana se realiza, por ejemplo, a través de la pared superior de la caja.

Según otra particularidad, la superficie de apoyo rugosa presenta un parámetro de rugosidad de superficie media comprendido, por ejemplo, entre 0,1 μm y 10 μm .

45 Según otra particularidad, el filtro presenta unos poros que tienen un diámetro medio comprendido, por ejemplo, entre 0,2 μm y 0,5 μm .

50 La invención se refiere también a un procedimiento de análisis de una muestra biológica, realizada con la ayuda del dispositivo tal como se ha descrito anteriormente, comprendiendo este procedimiento así al menos las etapas siguientes:

- la inyección de una muestra que contiene unas especies biológicas en el primer espacio de la cámara del dispositivo por el canal de inyección,

55 - realización de una lisis mecánica de las especies biológicas presentes en la cámara por trituración contra la superficie de apoyo rugosa a fin de liberar un material biológico a analizar,

60 - separación del material biológico con respecto a los contaminantes por filtración a través del filtro haciendo pasar el material biológico en el segundo espacio de la cámara y manteniendo unos contaminantes en el primer espacio,

- amplificación del material biológico por calentamiento de la cámara a una temperatura determinada,

- análisis del material biológico obtenido después de la amplificación.

65 Según una particularidad, el procedimiento puede comprender también una etapa de aclarado y de purificación de las especies biológicas presentes en la cámara, realizada previamente a la etapa de lisis mecánica.

Según otra particularidad, la etapa de análisis se realiza, por ejemplo, por colorimetría, medición electroquímica, medición de turbiedad o fluorescencia.

5 Breve descripción de las figuras

Otras características y ventajas aparecerán a partir de la descripción detallada siguiente, realizada con respecto a los dibujos anexos, en los que:

10 - las figuras 1A y 1B representan, de manera esquemática, respectivamente en vista por arriba y en vista de lado, el dispositivo de análisis de una muestra biológica según la invención,

- las figuras 2A a 2E ilustran las diferentes etapas de un método de análisis y de detección realizada gracias al dispositivo de la invención.

15 Descripción detallada de al menos un modo de realización

El dispositivo de la invención está destinado al análisis de una muestra biológica. Esta muestra biológica se presenta, por ejemplo, en forma de un fluido que contiene especies biológicas que contienen un material biológico a estudiar. Por especies biológicas se entienden, en particular, unos microorganismos, unas células, unas esporas, etc. Por material biológico a estudiar se entiende, por ejemplo, unas moléculas de ácido nucleico (ARN, ADN) procedentes de una célula, unas proteínas, unos lipopolisacáridos (LPS), unos ácidos lipoteicoicos (LTA), etc.

20 Por fluido se entiende, en particular, un líquido, un gas, etc. El líquido podrá presentar diferentes grados de viscosidad y podrá, por ejemplo, presentarse en forma de una pasta o de un gel.

De manera ventajosa, la invención presenta la particularidad de poder efectuar, en un mismo dispositivo, al mismo tiempo:

- 30 - una purificación y una concentración de las especies biológicas presentes en la muestra biológica,
- una lisis mecánica de las especies biológicas presentes en la muestra para extraer un material biológico a estudiar,
- 35 - una separación entre el material biológico a estudiar y unos contaminantes presentes, y
- una detección de la presencia de patógeno en el material biológico que se ha separado.

A continuación en la descripción, los términos “inferior”, “superior”, “arriba” y “abajo” empleados deben entenderse tomando como referencia un eje principal que es vertical.

40 A continuación en la descripción, los términos “externo”, “exterior”, “interno”, “interior”, deben comprenderse tomando como referencia la cámara del dispositivo que se describirá a continuación.

El dispositivo 1 comprende una caja. La caja comprende una pared inferior 10, una pared lateral 11 y una pared superior 12. Todas las paredes de la caja se realizarán preferiblemente de un mismo material. Este material será apto, en particular, para poder sufrir un calentamiento en un intervalo de temperatura comprendido entre 20°C y 100°C. Preferiblemente, algunas paredes de la caja, al menos su pared lateral 11, se realizarán de un material transparente. Preferiblemente, el material empleado será un plástico, por ejemplo de tipo PMMA (poli(metacrilato de metilo)).

50 El dispositivo 1 comprende una cámara 13 dispuesta en la caja. Esta cámara representa el sitio en el que se efectúan al mismo tiempo la purificación/concentración, la lisis mecánica, la separación y eventualmente la detección en las especies biológicas. La cámara 13 se cierra hacia abajo por la pared inferior de la caja.

55 El dispositivo comprende un canal de inyección 14 para inyectar en el cualquier tipo de fluido, por ejemplo con la ayuda de una pipeta. El canal de inyección comprende una entrada dispuesta, por ejemplo, a través de la pared superior 12 de la caja y una salida que desemboca en dicha cámara 13. La entrada del canal de inyección 14 está dispuesta, por ejemplo, verticalmente y su salida desemboca, por ejemplo, horizontalmente en la cámara 13. La entrada del canal de inyección se ensancha, por ejemplo, para aplicar el cono de una pipeta o se adaptará al tipo de dispositivo empleado para inyectar el fluido en el dispositivo. A título de ejemplo, se tratará de una entrada que presenta una punta de tipo luer para conectar una jeringa.

60 El dispositivo comprende un canal de evacuación 15 cuya entrada comunica con el espacio formado por la cámara 13 y la salida comunica con el exterior por una abertura realizada, por ejemplo, a través de la pared superior de la caja. Por este canal de evacuación 15, se evacúan unos fluidos inyectados. Su entrada está dispuesta, por ejemplo, horizontalmente y su salida verticalmente. La cámara 13 está dispuesta entre el canal de inyección 14 y el canal de

evacuación 15.

5 Hacia arriba, la cámara 13 está cerrada por una membrana 18 flexible y estirable, preferiblemente transparente. La pared superior 12 de la caja del dispositivo comprende así una abertura que está recubierta, de manera hermética, por dicha membrana 18. Dicha membrana está así anclada en la caja mediante cualquier solución de fijación adecuada, por ejemplo por encolado. Esta membrana 18 estará compuesta, por ejemplo, de una película, por ejemplo de tipo MicroAmp, 3M (marcas depositadas), de grosor, de dimensiones y de constitución adecuadas para deformarse de manera elástica, con respecto a sus puntos de anclaje, en particular hasta el fondo de la cámara 13.

10 Mediante el término “transparente”, se entiende que el material empleado es al menos parcialmente transparente a la luz visible, a fin de dejar pasar al menos un 80% de esta luz. Se debe comprender así que será suficientemente transparente para ver en el interior de la cámara 13, al menos el segundo espacio situado por encima del filtro.

15 El dispositivo comprende un filtro 16 dispuesto en dicha cámara 13 y que separa dicha cámara 13 en dos espacios. Los dos espacios están, por ejemplo, superpuestos y designan así el espacio inferior 130 situado debajo del filtro y espacio superior 131 situado por encima del filtro. Este filtro 16 se realiza preferiblemente en todo o en parte en forma de una película flexible y delgada, estirada en el espacio formado por la cámara a fin de permitir el paso de un espacio al otro sólo por los poros del filtro 16. La película presenta una deformabilidad elástica que le permite estirarse durante el ejercicio de una fuerza de apoyo en una dirección sustancialmente vertical, teniendo esta deformabilidad un nivel suficiente para alcanzar la superficie inferior de la cámara 13. El filtro 16 presenta un diámetro medio de poros comprendido entre 0,2 μm y 50 μm , por ejemplo comprendido entre 0,2 μm y 1 μm para la separación de microorganismos. El diámetro de los poros es adecuado, por supuesto, para asegurar una separación entre los contaminantes y el material biológico a estudiar. Después de la etapa de lisis y de la separación por el filtro 16, el material biológico a estudiar permanece por encima del filtro 16, en el espacio superior 131 de la cámara, mientras que los contaminantes permanecen por debajo del filtro, en el espacio inferior 130 de la cámara. El filtro 16 estará, por ejemplo, compuesto de una película de grosor, de dimensiones y de constitución adecuados para deformarse hasta el fondo de la cámara 13 con respecto a sus puntos de anclaje. Según un modo de realización particular, el filtro se podrá realizar también de un material transparente, por ejemplo con las mismas características de transparencia que la membrana.

30 El dispositivo comprende una superficie de apoyo rugosa 17 dispuesta sobre el fondo de la cámara 13. Esta superficie de apoyo rugosa 17 se extiende sobre una parte mayoritaria del fondo de la cámara. Comprende un parámetro de rugosidad de superficie media comprendida entre 0,1 μm y 10 μm , preferiblemente comprendida entre 0,2 μm y 3 μm . Esta superficie de apoyo rugosa 17 está destinada a permitir una lisis mecánica de las especies biológicas presentes en una muestra biológica colocada en el dispositivo. Preferiblemente, la lisis mecánica se realiza triturando dichas especies biológicas, por abrasión sobre dicha superficie de apoyo rugosa. La operación de trituración se lleva a cabo mediante un movimiento de fricción de las especies biológicas contra la superficie de apoyo rugosa, usando un elemento de trituración adecuado. Este elemento será, por ejemplo, una espátula 2 (véase la figura 2B) o una varilla, por ejemplo de material plástico o metálico. Este elemento se aplica desde el exterior de la cámara 13 y su extremo se aplica contra la superficie externa de la membrana 18, a fin de estirar la membrana 18 y el filtro hacia el fondo de la cámara y así frotar las especies biológicas presentes en una muestra contra la superficie de apoyo rugosa.

45 El dispositivo comprenderá, preferiblemente, unos medios para obturar el canal de inyección y el canal de evacuación a fin de cerrar cualquier acceso a la cámara y aislar el espacio interno de la cámara con respecto al exterior. Estos medios están, por ejemplo, formados de dos hojas 21 cuya posición permite obturar o abrir cada canal 14, 15, o formados de adhesivos pegados sobre la entrada del canal de inyección y la salida del canal de evacuación. Por su puesto, se podrían considerar otras soluciones.

50 Preferiblemente, la caja puede integrar unos medios de calentamiento del espacio interno de la cámara, compuestos, por ejemplo, de al menos una resistencia 19 calentadora, como se representa en las figuras anexas. La resistencia se fija, por ejemplo, debajo de la pared inferior de la caja. Se proporcionará, por ejemplo, una fuente de alimentación 20 para alimentar la resistencia 19. La fuente de alimentación comprenderá, por ejemplo, una o varias pilas eléctricas, que proporcionan suficientemente energía para calentar la cámara a una temperatura comprendida en el intervalo definido anteriormente, es decir de 20°C a 100°C. Por supuesto, se podrían emplear otros medios de calentamiento, que comprenden por ejemplo una tinta conductora depositada por impresión o serigrafía debajo de la pared inferior de la caja.

60 Así, para resumir, el dispositivo comprende la estructura “multicapas” siguiente:

- una superficie inferior de apoyo rugosa 17,
- un espacio inferior 130 de una cámara 13 situada por encima de la superficie de apoyo rugosa 17,
- 65 - un filtro 16 flexible y estirable situado por encima del espacio inferior 130,

- un espacio superior 131 de la cámara 13 situado por encima del filtro 16,

- una membrana 18 flexible y estirable situada por encima del espacio superior 131, que contiene herméticamente la cámara y accesible desde el exterior del dispositivo.

5 Con la ayuda del dispositivo descrito anteriormente, de manera no limitativa, un procedimiento de lisis, de separación y de detección comprenderá por ejemplo las etapas siguientes:

10 - La muestra biológica líquida, que comprende unas especies biológicas 3, se inyecta en la cámara 13 del dispositivo 1 con la ayuda de una pipeta, a través del canal de inyección 14. A título de ejemplo, la muestra presenta un volumen de 1 mililitro y contiene 10^5 bacterias por mililitro. La parte líquida de la muestra y todas las partículas/moléculas que pasan a través del filtro 16 se recuperan por el canal de evacuación 16 y se apartan del análisis. Las bacterias se concentran entonces en el espacio inferior 130 de la cámara 13. Unos contaminantes presentes en la muestra, demasiado gruesos para atravesar el filtro, pueden también permanecer en el espacio inferior 130 de la cámara 13.

15 - Una vez que la muestra está presente en la cámara, se inyecta preferiblemente una solución de lavado/aclarado de las especies biológicas 3 presentes con la ayuda de una pipeta a través del canal de inyección 14, a fin de purificar las bacterias presentes en la muestra (figura 2A). Unos contaminantes 31, demasiado gruesos para atravesar el filtro 16 y no solubles, pueden también permanecer en el espacio 130.

20 - Una lisis mecánica de las especies biológicas 3 se lleva a cabo con la ayuda de una espátula 2. El extremo de la espátula 2 se pone en contacto con la superficie externa de la membrana 18, después se presiona sobre la membrana 18 para estirla hacia el interior de la cámara 13, el extremo de la espátula 2 alcanza la superficie de apoyo rugosa 17 a fin de triturar las especies biológicas 3 contra la superficie de apoyo rugosa (figura 2B).

25 - Una vez efectuada la lisis mecánica, el espacio inferior de la cámara comprende el material biológico 30 a estudiar, por ejemplo unas moléculas de ADN, y unos contaminantes 31 (figura 2C).

30 - Para efectuar la separación entre el material biológico 30 a estudiar y los contaminantes 31, se inyecta una solución líquida que contiene unos reactivos de amplificación en la cámara por el canal de inyección 14, para eluir el material biológico a estudiar. Una parte de la solución líquida inyectada se lleva así el material biológico 30 a estudiar, por ejemplo las moléculas de ADN, pasa a través del filtro 16 y se reúne con el espacio superior 131 de la cámara. Los contaminantes 31, que presentan una estructura superior al diámetro de los poros del filtro 16, permanecen en el espacio inferior 130 de la cámara 13. Durante esta etapa, el canal de evacuación 15 se obtura preferiblemente por una hoja 21 a fin de evitar cualquier evacuación del material biológico 30 a estudiar (figura 2D).

35 - Una vez que se efectúa la separación entre los contaminantes 31 y el material biológico 30 a estudiar, se trata de realizar una reacción de amplificación del material biológico a fin de, por ejemplo, poder detectar la presencia de un patógeno en el material biológico 30 que se ha separado.

40 - La reacción de amplificación se lleva a cabo calentando el espacio interno de la cámara 13, por ejemplo con la ayuda del sistema de resistencias 19 integrado a la caja. Durante la operación de calentamiento, se cierra preferiblemente el canal de inyección 14 y el canal de evacuación 15. La temperatura a la cual se calienta la cámara 13 depende del tipo de reacción de amplificación utilizado. Podrá tratarse de cualquier tipo de reacción de amplificación, por ejemplo LAMP ("Amplificación isotérmica mediada por bucle"), PCR ("reacción de polimerización en cadena"), NASBA ("amplificación basada en secuencias de ácido nucleico"), RPA ("amplificación polimerasa recombinasa"), etc. Para una amplificación de tipo LAMP, el calentamiento se realiza a una temperatura ventajosamente comprendida entre 60°C y 65°C. Esta reacción permite amplificar las moléculas del material biológico 30 a detectar, por ejemplo las moléculas de ADN. Durante el calentamiento, la membrana 18 se lleva a estirarse, por ejemplo, para crear una concavidad en la cámara 13, aumentado así el volumen de la cámara (figura 2E).

45 - Durante la reacción de amplificación del material biológico, se trata de detectar si un patógeno está presente. Para ello, es posible emplear diferentes métodos, como por ejemplo la colorimetría, la fluorescencia, la electroquímica, la pHmetría, la medición de turbiedad. Se podría considerar cualquier otro método de detección. Para un método de detección de tipo pHmetría, se podrían integrar al dispositivo unos electrodos de detección de pH. Durante una detección por colorimetría o fluorescencia, la característica transparente de la membrana 18 y/o de la caja del dispositivo, en particular a nivel de su pared lateral, presenta la ventaja de permitir una detección visual directa. Así, observando el color de la muestra presente en la cámara, es posible determinar si un patógeno está presente o no.

50 El dispositivo de la invención comprende así numerosas ventajas, entre las cuales:

55 - Un dispositivo fácilmente transportable, por ser ligero y poco voluminoso.

60 - Un dispositivo que permite realizar en una misma cámara al mismo tiempo la concentración/purificación, la lisis, la

separación, la amplificación y la detección, formando así un laboratorio en chip ("Lab On Chip").

- Un dispositivo que no comprende ninguna pieza mecánica compleja para realizar la lisis mecánica.

- 5 - Un dispositivo que permite eventualmente una detección por colorimetría, solamente mirando a través de las partes transparentes del dispositivo.

REIVINDICACIONES

1. Dispositivo de análisis de una muestra biológica que comprende unas especies biológicas (3), comprendiendo dicho dispositivo:
- 5
- una caja que comprende al menos una abertura,
 - un canal de inyección (14) dispuesto en dicha caja y por el cual se puede inyectar dicha muestra biológica en forma de un fluido,
 - 10 - un canal de evacuación (15) dispuesto en dicha caja,
 - una cámara (13) en la que desemboca el canal de inyección (14) y el canal de evacuación (15),
 - 15 - un filtro (16) que separa dicha cámara en dos espacios distintos a fin de definir un primer espacio (130) en el que desemboca dicho canal de inyección (14) y un segundo espacio (131) en el que desemboca dicho canal de evacuación (15), presentando dicho filtro (16) una porosidad adecuada para la separación a efectuar,
 - una superficie de apoyo rugosa (17) que presenta un parámetro de rugosidad de superficie adecuada para realizar una lisis mecánica de dichas especies biológicas (3), estando dispuesta dicha superficie de apoyo en dicho primer espacio (130) y comprendiendo dicho filtro al menos una parte que presenta una deformabilidad elástica suficiente para alcanzar dicha superficie de apoyo rugosa de la cámara (13) durante el ejercicio de una fuerza de apoyo,
 - 20 - una membrana (18) flexible dispuesta en el lado opuesto de la superficie de apoyo rugosa (17) con respecto al filtro (16) y que obtura la abertura realizada a través de la caja.
- 25
2. Dispositivo según la reivindicación 1, caracterizado por que la membrana (18) se realiza de un material transparente.
- 30
3. Dispositivo según la reivindicación 1 o 2, caracterizado por que la caja comprende al menos una pared realizada de un material transparente.
- 35
4. Dispositivo según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que comprende unos medios de calentamiento dispuestos para calentar la cámara (13) a una temperatura determinada.
5. Dispositivo según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que la caja comprende una pared inferior (10), una pared lateral (11) y una pared superior (12).
- 40
6. Dispositivo según la reivindicación 5, caracterizado por que el canal de inyección (14) y el canal de evacuación, se realizan a través de dicha pared superior de la caja.
7. Dispositivo según la reivindicación 5 o 6, caracterizado por que dicha abertura obturada por la membrana (18) se realiza a través de la pared superior (12) de la caja.
- 45
8. Dispositivo según una de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado por que la superficie de apoyo rugosa presenta un parámetro de rugosidad de superficie media comprendido entre 0,1 μm y 10 μm .
9. Dispositivo según una de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado por que el filtro presenta unos poros que tienen un diámetro medio comprendido entre 0,2 μm y 0,5 μm .
- 50
10. Procedimiento de análisis de una muestra biológica, realizado con la ayuda del dispositivo definido en una de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado por que comprende las etapas siguientes:
- 55
- inyección de una muestra que contiene unas especies biológicas (3) en el primer espacio (130) de la cámara (13) del dispositivo por el canal de inyección (14),
 - lisis mecánica de las especies biológicas presentes en la cámara por trituración contra la superficie de apoyo rugosa (17) a fin de liberar un material biológico (30) a analizar,
 - 60 - separación del material biológico (30) con respecto a los contaminantes (31) por filtración a través del filtro (16) haciendo pasar el material biológico (30) en el segundo espacio (131) de la cámara y manteniendo unos contaminantes en el primer espacio,
 - amplificación del material biológico por calentamiento de la cámara a una temperatura determinada,
 - 65 - análisis del material biológico obtenido después de la amplificación.

11. Procedimiento según la reivindicación 10, caracterizado por que comprende una etapa de aclarado y de purificación de las especies biológicas presentes en la cámara (13), realizada previamente a la etapa de lisis mecánica.

5

12. Procedimiento según la reivindicación 10 u 11, caracterizado por que la etapa de análisis se realiza por colorimetría, medición electroquímica, medición de la turbiedad o fluorescencia.

Fig. 1A

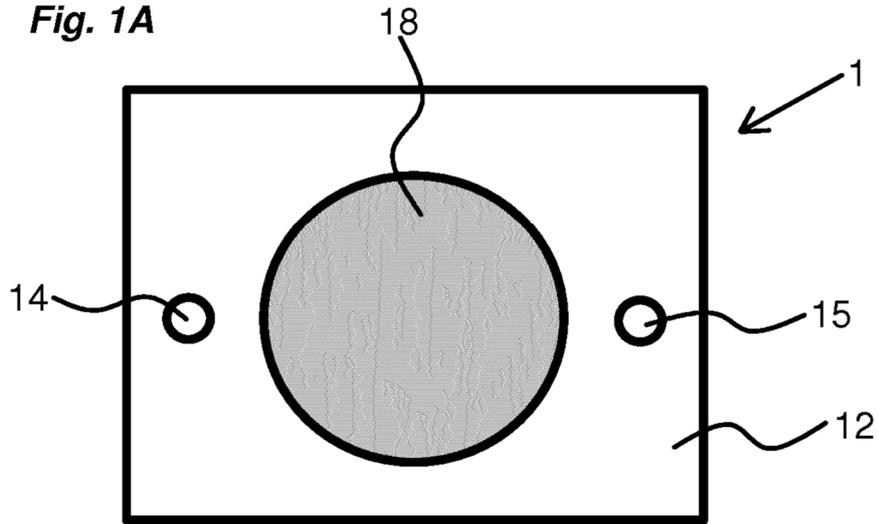


Fig. 1B

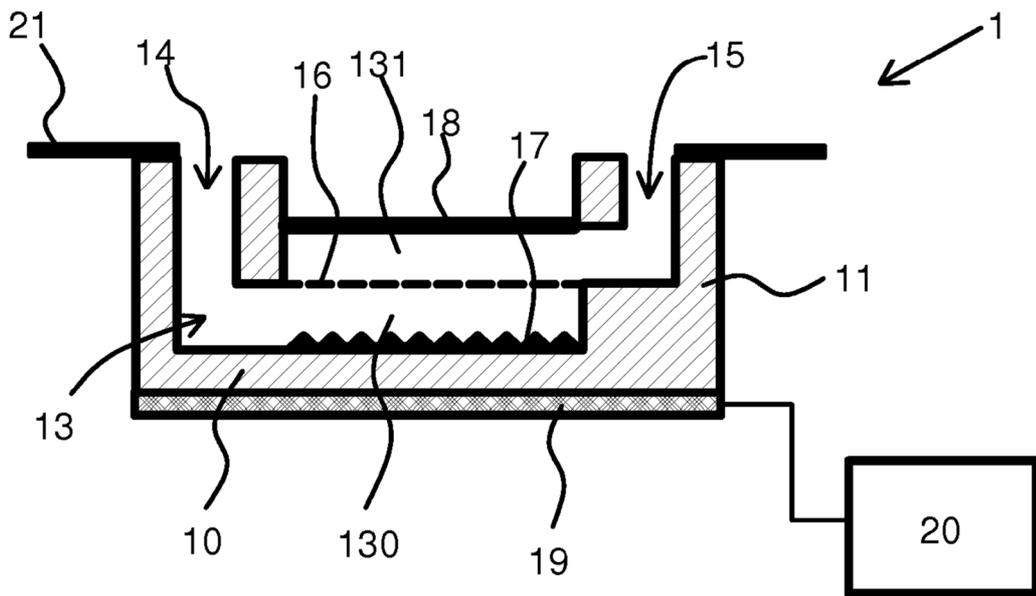


Fig. 2A

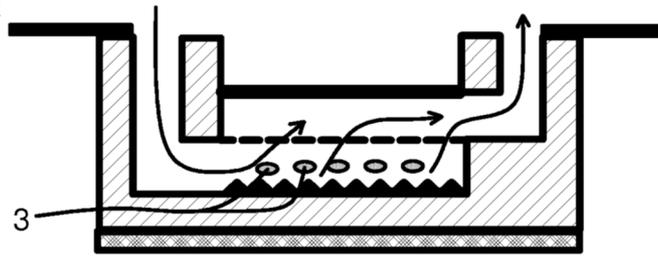


Fig. 2B

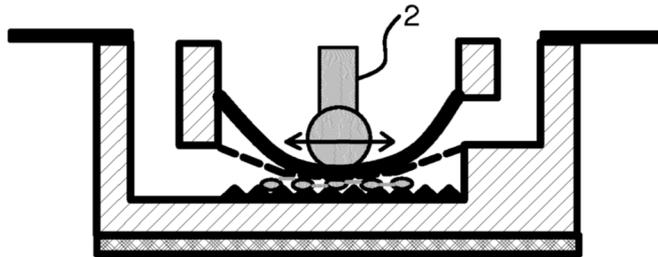


Fig. 2C

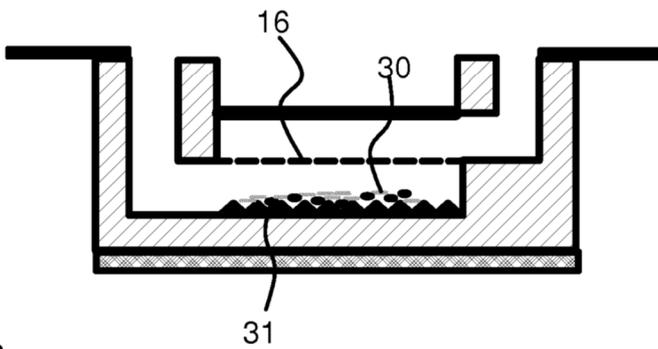


Fig. 2D

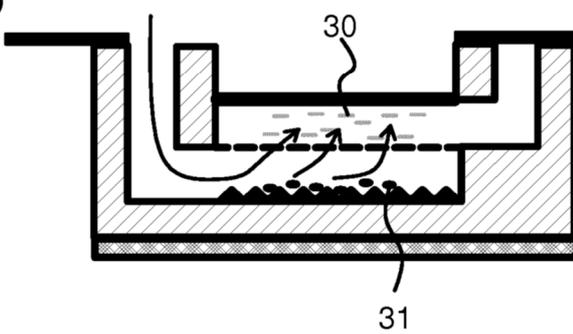


Fig. 2E

