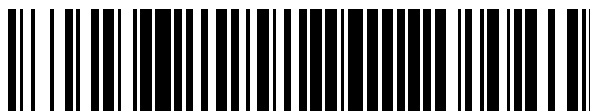


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 724 537**

51 Int. Cl.:

G01N 33/74 (2006.01)

G01N 33/92 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.12.2013** **E 13195534 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.02.2019** **EP 2881740**

54 Título: **Procedimiento para cuantificar un analito, y un dispositivo analítico automático configurado para poner en práctica dicho procedimiento**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.09.2019

73 Titular/es:

**IMMUNODIAGNOSTIC SYSTEMS LIMITED
(100.0%)
10 Didcot Way Boldon Business Park
Boldon Tyne and Wear NE35 9PD, GB**

72 Inventor/es:

**BRUTT, NORBERT;
CORNAUT, LOIC y
TRAN, JACQUELINE**

74 Agente/Representante:

CURELL SUÑOL, S.L.P.

ES 2 724 537 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

Procedimiento para cuantificar un analito, y un dispositivo analítico automático configurado para poner en práctica dicho procedimiento.

5

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un nuevo procedimiento para determinar la cantidad de un analito en una muestra, y más particularmente a un procedimiento que emplea inmunoensayos, y a un dispositivo analítico automático configurado para poner en práctica dicho procedimiento.

10

Antecedentes

La presente invención se refiere a un procedimiento para cuantificar la cantidad de un analito presente en una muestra y en particular, a un procedimiento que permite la cuantificación de un analito sin la necesidad de una fase preanalítica previa compleja y laboriosa de purificación de la muestra.

15

La presente invención también se refiere a procedimientos para determinar la cantidad de un analito para su uso en el diagnóstico de una enfermedad, y a reactivos y kits para su uso en la realización de los procedimientos de la invención.

20

La simplificación de los procedimientos de extracción y separación ha sido una característica clave en la mejora de los procedimientos. El requisito de una etapa de purificación aparte alarga notablemente el tiempo del procedimiento e introduce un error potencial en la determinación de la concentración, pero también en la trazabilidad de las muestras debido a por lo menos una etapa de manipulación manual de las muestras.

25

La eliminación de compuestos tales como lípidos de una muestra precisa a menudo una etapa de precipitación que requiere una serie de manipulaciones manuales y centrifugaciones. Una de las etapas de purificación del analito antes de la cuantificación puede requerir el uso de disolventes orgánicos, que pueden ser tóxicos y pueden necesitar equipos de evaporación que no son convenientes para su uso en laboratorios bioquímicos clínicos.

30

ULRICH REIDT ET AL., "Automated Immunomagnetic Processing and Separation of Legionella pneumophila With Manual Detection by Sandwich ELISA and PCR Amplification of the ompS Gene" (Journal of laboratory automation, vol. 16, Nº 2, (20110401), páginas 157 - 164, issn 2211-0682) divulga un sistema de separación automatizado para capturar bacterias utilizando perlas paramagnéticas. Dicho sistema de separación comprende una mesa giratoria, dos pipeteadores, una microplaca, una estación de lavado/calentamiento adaptada para recibir tubos de reacción pequeños y grandes, y un imán permanente móvil asociado con la estación de lavado/calentamiento, estando configurado cada pipeteador para aspirar un volumen de fluido contenido en un tubo de reacción dispuesto en la estación de lavado/calentamiento, y para transferir dicho volumen a otro tubo de reacción dispuesto en la estación de lavado/calentamiento o a la microplaca.

35

40

WELTER B H et al., "Magnetic separation to concentrate the estrogen receptor from adipose tissue for western analysis" (BioTechniques, Informa Healthcare, Estados Unidos, (19990801), volumen 27, Nº 2, ISSN 0736-6205, páginas 282 - 286) divulga un procedimiento que utiliza perlas magnéticas cubiertas con un anticuerpo biotinilado para inmunoprecipitar la proteínas de una muestra, y particularmente proteínas receptoras de estrógeno.

45

Descripción de la invención

La presente invención tiene como objetivo superar los problemas asociados con el procedimiento existente con anterioridad.

50

Por lo tanto, la presente invención satisface la necesidad de un procedimiento simple pero eficaz para cuantificar un analito presente en una muestra. Se basa en la eliminación de la operación manual compleja de deslipidación-extracción-purificación. La invención ha posibilitado un procedimiento que reduce considerablemente el tiempo de ejecución, que es más eficaz que procedimientos anteriores y, por lo tanto, más rentable, permite la trazabilidad completa de todas las operaciones y, por lo tanto, se adapta mejor al uso rutinario en laboratorios clínicos.

55

La invención se basa en el descubrimiento de que una purificación en una única etapa (en la que la muestra, el agente de deslipidación y el asociado de unión a analito se mezclan en el mismo recipiente) funciona eficazmente.

60

Como tal, en un primer aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para cuantificar un analito en una muestra, que comprende:

65

- una etapa de purificación inicial, que tiene lugar en un primer recipiente, que comprende las etapas siguientes:
 - 5 a) mezclar la muestra, un agente de deslipidación y unas primeras partículas magnéticas recubiertas con unos primeros socios de unión a analito en el primer recipiente,
 - b) incubar la mezcla contenida en el primer recipiente de manera que precipite los lípidos contenidos en la muestra y unir el analito contenido en la muestra a los primeros socios de unión a analito,
 - 10 c) someter el primer recipiente a un campo magnético de manera que atraiga magnéticamente las primeras partículas magnéticas a una parte de pared interior del primer recipiente,
 - d) eliminar los reactivos no unidos de la mezcla contenida en el primer recipiente,
 - 15 e) eluir el analito unido en una solución de elución de manera que separe el analito de los primeros socios de unión a analito,
- una etapa de transferencia que comprende las etapas siguientes:
 - 20 f) someter el primer recipiente a un campo magnético de manera que atraiga magnéticamente las primeras partículas magnéticas a una parte de pared interior del primer recipiente,
 - g) transferir un volumen de la solución de elución que comprende el analito desde el primer recipiente hasta un segundo recipiente, y
 - 25 - una etapa de cuantificación, que tiene lugar en el segundo recipiente, que consiste en la cuantificación del analito en dicha solución de elución.

30 La presente invención puede llevarse a cabo en cualquier medio biológico acuoso humano tal como sangre, suero o plasma.

35 Según un aspecto de la invención, por lo menos uno de entre el primer y segundo recipientes es una cubeta, un tubo o un recipiente similar. Cada uno de entre el primer y segundo recipientes puede ser una cubeta, un tubo o un recipiente similar.

Según un aspecto de la invención, por lo menos uno de entre el primer y segundo recipientes está fabricado de vidrio o plástico. Cada uno de entre el primer y segundo recipientes puede estar fabricado de vidrio o plástico.

40 Dicha etapa de transferencia se puede realizar utilizando un dispositivo de muestreo y pipeteo.

Según un aspecto de la invención, la etapa de incubación comprende una etapa de deslipidación de la muestra. El agente de deslipidación puede ser un analito polianiónico tal como sulfato de dextrano, ácido fosfolvofrámico o heparina en presencia de un catión del Grupo II tal como magnesio, manganeso o calcio.

45 Esta incubación con el agente de deslipidación permite precipitar los lípidos (gracias al agente de deslipidación) y unir el analito a los primeros socios de unión a analito que recubren las partículas magnéticas.

Según un aspecto de la invención, la etapa de eliminación comprende una etapa de lavado que consiste en lavar las primeras partículas magnéticas con una solución de lavado.

50 En un aspecto específico de la invención, la solución de elución se produce mediante la adición de una solución básica tal como NaOH, por ejemplo, NaOH 0.3 N a 0.6 N al primer recipiente que comprende el analito unido. Después se añaden al recipiente una solución de neutralización, tal como ácido cítrico, más particularmente ácido cítrico 0.3 a 0.6 M, y un tampón de procedimiento.

55 En un aspecto incluso más específico de la invención, el tampón del procedimiento comprende BSA, un polipéptido, manitol, sacarosa, mezcla de tritón-antioxidante, ascorbato de sodio, trolox e hidrogenocarbonato de sodio en tampón MOPS.

60 Según un aspecto de la invención, la adición y la eliminación de cualquier líquido (reactivo en solución, tampón, solución de lavado, etc.) a o desde el primer y el segundo recipientes se puede realizar utilizando unos medios de pipeteo.

65 Según un aspecto de la invención, el analito puede ser cualquier metabolito de vitamina D, de forma más preferida 1.25-dihidroxivitamina D (1.25D), o esteroides tales como aldosterona, andrógenos, estrógenos, progestágenos o colesterol.

Según un aspecto preferido de la invención, el analito es 1,25-dihidroxitamina D (1,25D). Este analito se encuentra en una concentración muy baja en la sangre y su medición es una tarea complicada, ya que la concentración normal varía de 10 a 100 picogramos/ml.

5 La concentración de 1,25D en la sangre humana sirve como un indicador excelente de la eficacia del metabolismo de la vitamina D en el cuerpo y es un buen indicador de una enfermedad renal crónica.

10 El desarrollo de procedimientos para determinar los niveles de 1,25D ha sido difícil, principalmente debido a las concentraciones extremadamente bajas de 1,25D en los fluidos sanguíneos.

15 La medición de 1,25D es conocida por sus múltiples etapas de extracción, que implican mucho trabajo, antes del análisis en un sistema automatizado o utilizando un procedimiento manual. Los procedimientos de extracción existentes disponibles actualmente en el mercado requieren una gran cantidad de equipos que incluyen columnas de purificación, rotador, centrifugadora y evaporador de nitrógeno. A menudo es necesario un disolvente. La identificación positiva de las muestras está comprometida.

20 La cuantificación del analito puede llevarse a cabo mediante cualquier tecnología bien conocida por el experto en la materia. La presente invención se refiere, en general, a las tecnologías siguientes para realizar la cuantificación del analito:

- ensayos de química o bioquímica clínica que se llevan a cabo con suero sanguíneo u otros medios biológicos acuosos y en las que el principio de medición utilizado es esencialmente espectrofotometría;
- 25 - inmunoensayos llevados a cabo según diferentes procedimientos técnicos tales como ELISA, EIA, llevándose a cabo la medición mediante espectrofotometría, fluorescencia o CLIA por luminiscencia.

30 En un aspecto específico de la invención, la cuantificación del analito se lleva a cabo mediante inmunoensayo, llevándose a cabo dicho inmunoensayo utilizando un segundo asociado de unión a analito.

35 En un aspecto específico de la invención, por lo menos uno de entre el primer y segundo socios de unión a analito, y por ejemplo cada uno de entre dicho primer y segundo socios de unión a analito, puede ser un anticuerpo policlonal, monoclonal, quimérico, tecnológico (del inglés, "engineered") o humanizado, un fragmento scFV o Fab.

En un aspecto específico de la invención, el primer y segundo socios de unión a analito son idénticos o diferentes.

40 Uno de los procedimientos preferidos para cuantificar un analito presente en una muestra a bajas concentraciones es mediante un procedimiento de unión competitiva. Este procedimiento de unión competitiva se requiere cuando el analito es una molécula pequeña y no ofrece múltiples posibilidades de unión. Los procedimientos de unión competitiva adecuados adoptan varias formas, y serán bien conocidos por los expertos en la técnica. Un procedimiento típico de unión competitiva implicará poner socios de unión a analito en contacto con una forma marcada de un analito y una muestra sospechosa de contener una forma no marcada del mismo analito.

50 La cantidad de analito marcado que se encuentra unido a los socios de unión a analito es indicativa de la proporción de analito sin marcar en la muestra. Alternativamente, el procedimiento de unión competitiva puede implicar proporcionar unos socios de unión a analito unidos a una forma marcada del analito, añadir a los socios de unión a analito la muestra sospechosa de contener la forma sin marcar del analito, y medir la cantidad de analito marcado desplazado que es indicativa de la cantidad presente de analito sin marcar.

55 En un aspecto más específico y preferido, el procedimiento de la invención se puede llevar a cabo de una forma totalmente automatizada. Según un aspecto incluso más preferido de la invención, el procedimiento se realiza mediante un dispositivo analítico automático, tal como un analizador automático de inmunoensayo.

La innovación inherente en el procedimiento es que la fase preanalítica está completamente automatizada en el mismo instrumento en lugar de realizarse manualmente o en un equipo aparte.

60 En un aspecto de la invención, todas las etapas de suministro, pipeteo, incubación y mezclado son gestionadas por el dispositivo analítico automático.

En un aspecto de la invención, el procedimiento incluye además las etapas siguientes:

65 proporcionar un dispositivo analítico automático configurado para poner en práctica el procedimiento según la presente invención, y más particularmente un dispositivo analítico automático que incluye:

- una pluralidad de recipientes,
 - 5 - un rotor que presenta un eje de rotación sustancialmente vertical y que es impulsado de forma giratoria alrededor de su eje de rotación, delimitando el rotor unas cavidades abiertas radialmente hacia el exterior,
 - un dispositivo de carga apto para cargar unos recipientes en las cavidades del rotor,
 - 10 - por lo menos un dispositivo de muestreo y pipeteo apto para suministrar reactivos y muestras a unos recipientes recibidos en las cavidades del rotor,
 - 15 - un módulo de sedimentación magnética y lavado apto para recibir un recipiente extraído del rotor y para generar un campo magnético, incluyendo el módulo de sedimentación magnética y lavado un aparato de pipeteo apto para pipetear fluidos desde un recipiente recibido en el módulo de sedimentación magnética y lavado,
 - un módulo de atracción magnética, también denominado módulo de separación magnética, que incluye una carcasa abierta hacia arriba apto para recibir un recipiente extraído del rotor, y un primer generador de campo magnético situado en la proximidad de la carcasa abierta hacia arriba y
 - 20 - un dispositivo de cuantificación apto para recibir un recipiente extraído del rotor y para cuantificar un analito contenido en dicho recipiente,
- 25 en el que el dispositivo de muestreo y pipeteo es apto para transferir un volumen de solución desde un recipiente recibido en el módulo de atracción magnética a otro recipiente recibido en el rotor,
- llevándose a cabo automáticamente la etapa de purificación, la etapa de transferencia y la etapa de cuantificación utilizando el dispositivo analítico automático.
- 30 Por lo tanto, una vez que un analito contenido en un primer recipiente se ha separado de las partículas magnéticas utilizando la solución de elución, el rotor mueve el primer recipiente al módulo de atracción magnética, que atrae las partículas magnéticas contenidas en el primer recipiente a una pared interior de este último. Después, el dispositivo de muestreo y pipeteo aspira un determinado volumen de solución de elución en el primer recipiente sin partículas magnéticas, y dispensa este volumen en un segundo recipiente recibido en el
- 35 rotor.
- Este segundo recipiente se utiliza específicamente para la cuantificación del analito en la solución. La concentración del analito en dicha solución de elución se mide mediante procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica, tales como un procedimiento de unión competitiva, que es necesario cuando la molécula del analito es pequeña y no ofrece múltiples posibilidades de unión. Los procedimientos de unión competitiva adecuados adoptan diversas formas y serán bien conocidos por los expertos en la materia.
- 40 En un aspecto de la invención, el dispositivo analítico automático comprende una unidad de control configurada para controlar varios dispositivos y módulos del dispositivo analítico automático para poner en práctica el procedimiento según la invención.
- 45 En un aspecto de la invención, el primer generador de campo magnético está situado al lado de la carcasa abierta hacia arriba.
- 50 En un aspecto de la invención, el primer generador de campo magnético está configurado para que se extienda a lo largo de una parte de pared lateral de un recipiente recibido en la carcasa abierta hacia arriba.
- En un aspecto de la invención, el primer generador de campo magnético está configurado para atraer partículas magnéticas contenidas en un recipiente recibido en la carcasa abierta hacia arriba a una parte de pared interior de dicho recipiente, y ventajosamente a una parte de pared lateral interior de dicho recipiente.
- 55 En un aspecto de la invención, el módulo de sedimentación magnética y lavado incluye un segundo generador de campo magnético dispuesto para generar un campo magnético.
- 60 En un aspecto de la invención, el aparato de pipeteo es apto para suministrar una solución de lavado a un recipiente recibido en el módulo de sedimentación magnética y lavado.
- En un aspecto de la invención, el, por lo menos un, dispositivo de muestreo y pipeteo es apto para suministrar a un recipiente recibido en el rotor una solución básica, y un tampón de procedimiento y solución de neutralización.
- 65 En un aspecto de la invención, el, por lo menos un, dispositivo de muestreo y pipeteo es apto para aspirar un

volumen de solución de elución que contiene un analito desde un recipiente recibido en el módulo de atracción magnética, y para dispensar dicho volumen en otro recipiente recibido en el rotor.

5 En un aspecto de la invención, el, por lo menos un, dispositivo de muestreo y pipeteo es apto para tomar muestras para analizar y reactivos de las primera y segunda zonas de almacenamiento, y para transferirlas a recipientes situados en cavidades del rotor.

10 En un aspecto de la invención, el módulo de atracción magnética está situado encima de un recipiente para residuos.

En un aspecto de la invención, la carcasa abierta hacia arriba está abierta hacia el exterior y hacia el interior, y está particularmente abierta radialmente hacia el exterior y hacia el interior.

15 Breve descripción de los dibujos

La presente invención se explicará ahora con más detalle haciendo referencia a las figuras adjuntas, en las que:

La figura 1 es una vista en perspectiva de un dispositivo analítico automático según la presente invención.

20 La figura 2 es una vista en perspectiva parcial del dispositivo analítico automático de la figura 1.

La figura 3 es una vista en perspectiva parcial del dispositivo analítico automático de la figura 1.

25 La figura 4 es un diagrama que muestra un procedimiento para determinar la cantidad de un analito en una muestra según la presente invención.

Descripción detallada de la invención

30 El dispositivo analítico automático 2 para determinar la cantidad de un analito en una muestra según la presente invención se representa en las figuras 1 a 3.

35 El dispositivo analítico automático 2 incluye una primera parte 3 para almacenar reactivos y muestras para analizar, y una segunda parte 4 para medición y análisis. La primera parte 3 comprende una primera zona de almacenamiento 3a apta para recibir cartuchos de muestra 5, que incluyen cada uno un soporte de muestras 5a y receptáculos de muestras 5b situados en el soporte de muestras 5a, y una segunda zona de almacenamiento 3b apta para recibir cartuchos de reactivo 6, que incluyen cada uno un soporte de reactivos 6a y receptáculos de reactivos 6b situados en el soporte de reactivos 6a. Las muestras contenidas en los receptáculos de muestras pueden ser muestras de sangre, suero o plasma. Los reactivos contenidos en los receptáculos de reactivos pueden ser soluciones de elución, soluciones de neutralización, soluciones tampón, agentes de deslipidación o soluciones que contienen partículas magnéticas injertadas o recubiertas con socios de unión a analito, tales como soluciones que contienen nanopartículas magnéticas funcionalizadas con anticuerpos que corresponden al analito que se va a cuantificar.

45 El dispositivo analítico automático 2 incluye además un rotor o carrusel 7 que presenta un eje de rotación sustancialmente vertical y que es impulsado de forma giratoria alrededor de su eje de rotación por un motor (no mostrado). El rotor 7 delimita cavidades 8 abiertas radialmente hacia el exterior.

50 El dispositivo analítico automático 2 incluye además un dispositivo de carga 9 apto para almacenar cubetas de reacción 11 y para cargar dichas cubetas de reacción 11 en las cavidades 8 del rotor 7.

55 El dispositivo analítico automático 2 también incluye un dispositivo de muestreo y pipeteo 13 apto para muestrear muestras desde los cartuchos de muestra 5 recibidos en la primera zona de almacenamiento 3a, y para muestrear reactivos desde los cartuchos de reactivo 6 recibidos en la segunda zona de almacenamiento 3b. El dispositivo de muestreo y pipeteo 13 también es apto para dispensar las muestras y los reactivos muestreados en las cubetas de reacción 11 recibidas en las cavidades 8 del rotor 7.

60 En particular, el dispositivo de muestreo y pipeteo 13 incluye un cabezal de muestreo 14 que presenta una aguja de muestreo 15. El dispositivo de muestreo y pipeteo incluye además un primer elemento de soporte 16 que puede desplazarse a lo largo de una primera dirección horizontal D1 con respecto a la caja del dispositivo analítico automático 2 y un segundo elemento de soporte 17 soportado por el primer elemento de soporte 16 y que puede desplazarse con respecto al primer elemento de soporte 16 a lo largo de una segunda dirección horizontal D2 ortogonal a la primera dirección horizontal D1. El cabezal de muestreo 14 está soportado por el segundo elemento de soporte 17 y puede desplazarse con respecto al segundo elemento de soporte 17 a lo largo de una dirección vertical D3.

65 El dispositivo de muestreo y pipeteo 13 incluye además primeros medios de desplazamiento 18 adecuados para

desplazar el primer elemento de soporte 16 a lo largo de la primera dirección horizontal D1, segundos medios de desplazamiento 19 adecuados para desplazar el segundo elemento de soporte 17 a lo largo de la segunda dirección horizontal D2 y terceros medios de desplazamiento adecuados para desplazar el cabezal de muestreo 14 a lo largo de la dirección vertical D3.

5 Ventajosamente, el cabezal de muestreo 14 es apto para oscilar la aguja de muestreo 15. Este mecanismo permite mezclar el contenido de una cubeta de reacción 11 cuando la aguja de muestreo 15 está situada en esta última.

10 El dispositivo analítico automático 2 incluye además por lo menos uno o una pluralidad de módulos de sedimentación magnética y lavado orientados radialmente con respecto al rotor 7. Cada módulo de sedimentación magnética y lavado 23 incluye una parte de sedimentación 24 que presenta un generador de campo magnético, tal como un imán permanente o un electroimán, dispuesto para generar un campo magnético, y un aparato de pipeteo 25 dispuesto para eliminar el contenido líquido de una cubeta de reacción 11 situada en la parte de sedimentación 24 y para introducir una solución de lavado en dicha cubeta de reacción 11.

15 El dispositivo analítico automático 2 también incluye primeros actuadores lineales (no mostrados), cada uno asociado a un módulo de sedimentación magnética y lavado 23. Cada primer actuador lineal es apto para extraer una cubeta de reacción 11 desde el rotor 7 con un movimiento radial centrífugo y para disponer la cubeta de reacción 11 extraída en la proximidad del generador de campo magnético del módulo de sedimentación magnética y lavado 23 correspondiente.

20 Por lo tanto, cuando una cubeta de reacción 11 que contiene partículas magnéticas recubiertas con asociados de unión a analito está situada en una estación de sedimentación magnética y lavado 23, el generador de campo magnético correspondiente atrae las partículas magnéticas contenidas en dicha cubeta de reacción 11 a una parte de pared interior de esta última, y el contenido de la cubeta de reacción 11, excepto las partículas magnéticas y el analito unido a dichas partículas magnéticas, se retira por succión por medio del aparato de pipeteo 25 de dicha estación de sedimentación magnética y lavado 23. Después se introduce una solución de lavado en la cubeta de reacción 11 por medio del aparato de pipeteo 25 para lavar las partículas magnéticas.

25 Después de un periodo de tiempo predeterminado, dicha solución de lavado se retira por succión por medio del aparato de pipeteo 25. Una vez se ha procesado la cubeta de reacción 11, se vuelve a introducir en el rotor 7 por medio de un movimiento centrípeto del primer actuador lineal asociado a dicho módulo de sedimentación magnética y lavado 23.

30 El dispositivo analítico automático 2 incluye además un módulo de atracción magnética 26, también denominado módulo de separación magnética, orientado radialmente con respecto al rotor 7 y situado en la proximidad del dispositivo de muestreo y pipeteo 13. El módulo de atracción magnética 26 incluye una caja que delimita una carcasa abierta hacia arriba 27 apta para recibir una cubeta de reacción 11 extraída del rotor 7, y un generador de campo magnético 28, tal como un imán permanente o un electroimán, montado en la caja y situado en la proximidad de la carcasa abierta hacia arriba 27. El dispositivo analítico automático 2 incluye un segundo actuador lineal (no mostrado) asociado al módulo de atracción magnética 26, y apto para extraer una cubeta de reacción 11 desde el rotor 7 con un movimiento radial centrífugo y para disponer la cubeta de reacción 11 extraída en la carcasa abierta hacia arriba 27, que se encuentra en la proximidad del generador de campo magnético 28. Ventajosamente, la carcasa abierta hacia arriba 27 también se abre radialmente hacia el exterior y hacia el interior.

35 Debe indicarse que el dispositivo de muestreo y pipeteo 13 es apto para muestrear un volumen del contenido de una cubeta de reacción 11 recibida en la carcasa abierta hacia arriba 27 del módulo de atracción magnética 26, y para dispensar dicho volumen en una cubeta de reacción recibida en el rotor 7.

40 De esta forma, cuando una cubeta de reacción 11 que contiene una solución de elución, un analito y partículas magnéticas está situada en el módulo de atracción magnética 26, el generador de campo magnético correspondiente 28 atrae las partículas magnéticas contenidas en dicha cubeta de reacción 11 a una parte de pared interior de esta última, y el contenido de la cubeta de reacción 11, excepto las partículas magnéticas, se retira por succión por medio del dispositivo de muestreo y pipeteo 13 y se dispensa en otra cubeta de reacción 11 recibida en el rotor 7.

45 Preferentemente, el módulo de atracción magnética 26 está situado encima de un recipiente para residuos, y está configurado de tal forma que, cuando una cubeta de reacción 11 se introduce de nuevo en la carcasa abierta hacia arriba 27, dicha cubeta de reacción 11 introducida de nuevo empuja la cubeta de reacción 11 introducida previamente hacia el exterior de la carcasa abierta hacia arriba 27. Dicha cubeta de reacción empujada 11 cae posteriormente por gravedad en el recipiente para residuos.

60 El dispositivo analítico automático 2 incluye además un dispositivo de cuantificación 29 apto para cuantificar un analito contenido en una cubeta de reacción 11. El dispositivo de cuantificación 29 es preferentemente un luminómetro para desarrollar y leer luminiscencia. El dispositivo de cuantificación 29 puede incluir notablemente

5 una cámara resistente a la luz 31 apta para recibir una cubeta de reacción 11 extraída desde el rotor 7, y un fotomultiplicador conocido (no mostrado) apto para cuantificar la luminiscencia producida. Esta medición depende de la concentración del analito que se va a medir. Una vez que se completa la medición, la cubeta de reacción 11 se extrae del dispositivo de cuantificación 29 y se evacua en el recipiente para residuos mediante la acción de actuadores lineales con los que está equipado el dispositivo de cuantificación 29.

El dispositivo analítico automático 2 también incluye una unidad de control 31 configurada para controlar los dispositivos y módulos del dispositivo analítico automático 2 mencionados anteriormente.

10 El dispositivo analítico automático 2 incluye además un sistema de enjuague y descontaminación (no mostrado) apto para enjuagar y descontaminar la aguja de muestreo 15 del dispositivo de muestreo y pipeteo 13.

15 El procedimiento para determinar la cantidad de un analito en una muestra según la presente invención se representa en la figura 4. Dicho procedimiento se lleva a cabo mediante el dispositivo analítico automático 2 según la presente invención.

El procedimiento para determinar la cantidad de un analito en una muestra según la presente invención comprende las etapas siguientes:

- 20 - mezclar, en una primera cubeta de reacción 11 recibida en el rotor 7 y utilizando el dispositivo de muestreo y pipeteo 13, la muestra que contiene un analito 33 que se va a cuantificar, un agente de deslipidación 34 y una primera solución que contiene partículas magnéticas 35 recubiertas con unos primeros socios de unión a analito 36 (etapa S1);
- 25 - incubar, utilizando el rotor 7, la mezcla contenida en la primera cubeta de reacción 11 de forma que los lípidos precipiten gracias al agente de deslipidación 34 y el analito 33 se una a los primeros socios de unión a analito 36 (etapa S2);
- 30 - transportar, utilizando el rotor 7, la primera cubeta 11 delante de un módulo de sedimentación magnética y lavado 23;
- 35 - extraer la primera cubeta de reacción 11 del rotor 7 y disponer dicha primera cubeta de reacción 11 en la proximidad del generador de campo magnético de dicho módulo de sedimentación magnética y lavado 23 de forma que el generador de campo magnético del mismo atraiga las partículas magnéticas 35 a una parte de pared interior de la primera cubeta de reacción 11;
- aspirar los reactivos no unidos desde la primera cubeta 11 utilizando el aparato de pipeteo 25 del módulo de sedimentación magnética y lavado 23 (etapa S3);
- 40 - dispensar una solución de lavado en la primera cubeta 11 utilizando el aparato de pipeteo 25 para lavar las partículas magnéticas;
- aspirar la solución de lavado desde la primera cubeta 11 utilizando el aparato de pipeteo 25;
- 45 - volver a cargar la primera cubeta de reacción 11 que se ha lavado en el rotor 7;
- suministrar una solución de elución a la primera cubeta de reacción 11, utilizando el dispositivo de muestreo y pipeteo 13, de manera que eluya el analito unido, es decir, separar el analito 33 de las partículas magnéticas 35 (etapa S4);
- 50 - transportar la primera cubeta 11 delante del módulo de atracción magnética 26, utilizando el rotor 7;
- extraer la primera cubeta de reacción 11 del rotor 7 y disponer la primera cubeta 11 en el módulo de atracción magnética 26 de forma que el generador de campo magnético 28 del mismo atraiga las partículas magnéticas 35 a una parte de pared interior de la primera cubeta de reacción 11;
- 55 - aspirar, utilizando el dispositivo de muestreo y pipeteo 13, la solución de elución y el analito desde la primera cubeta de reacción 11 (etapa S5);
- 60 - dispensar, utilizando el dispositivo de muestreo y pipeteo 13, la solución de elución y el analito 33 a una segunda cubeta de reacción 11' vacía recibida en el rotor 7 (etapa S6);
- suministrar a la segunda cubeta de reacción 11' una segunda solución que contiene partículas magnéticas 37 recubiertas con unos segundos socios de unión a analito 38, utilizando el dispositivo de muestreo y pipeteo 13 (etapa S7); y
- 65

- cuantificar el analito en la solución de elución contenida en la segunda cubeta de reacción 11'.

La invención se ilustrará haciendo referencia a los ejemplos siguientes, todos ellos no limitados y no exhaustivos:

5 Ejemplos:

Ejemplo 1: medición de la cantidad de concentración de 1,25D en una muestra según la invención

10 El ensayo de 1,25D en sangre humana sirve como un excelente indicador de la eficacia del metabolismo de la vitamina D en el cuerpo.

El desarrollo de procedimientos de ensayo para determinar los niveles de 1,25D ha sido difícil, principalmente debido a las concentraciones extremadamente bajas de 1,25D en los fluidos sanguíneos.

15 La 1,25D es bien conocida por sus múltiples etapas de extracción que implican mucho trabajo antes del análisis en un sistema automatizado o mediante un procedimiento manual. Los procedimientos de extracción existentes disponibles actualmente en el mercado requieren una gran cantidad de equipos que incluyen columnas de purificación, rotador, centrifugadora y evaporador de nitrógeno. A menudo es necesario un disolvente. La identificación positiva de las muestras está comprometida.

20 La medición de 1,25D en una muestra según la invención se inicia con el pretratamiento de la muestra para 1,25D en una primera cubeta con deslipidación de la muestra. La deslipidación se realiza con 22 µl de 10 g de sulfato de dextrano (50 k), número de catálogo de Sigma D8787, en un litro de cloruro de magnesio 0,5 M y 218 µl de muestra.

25 Inmediatamente después se captura 1,25D sobre 46 µl de partículas magnéticas (MP) recubiertas con anticuerpo anti-1,25D junto con 314 µl de solución de desplazador optimizada. El reactivo desplazador está compuesto por 4.035 g de fosfato de potasio dibásico trihidratado, 0.489 g de fosfato de potasio monobásico, 19.5 g de cloruro de sodio, 4.19 g de ANSA, 0.209 g de warfarina y 104.7 ml de metanol en 1 litro. La MP recubierta con anti-1,25D se produce por medio del acoplamiento del anticuerpo anti-1,25D a 36-144 mg de anticuerpo por 1 g de partícula modificada con carboxilato Sera-Mag® Speedbeads. El diámetro de las MP es de 0.8 µm obtenido del número de catálogo de Thermo Scientific 45152105050350. Se observó que una incubación de diez minutos de la muestra deslipidada con MP a 37 °C era suficiente para capturar 1,25D sobre partículas.

35 Las MP se lavan con una solución de lavado que contenga 0.6 g de fosfato de potasio dibásico trihidratado, 0.97 g de fosfato de potasio monobásico, 1.0 g de cloruro de sodio, 1.0 g de tween-20, 1.0 g de proclin-300 y 0.1 g de azida de sodio en 1 litro de agua (número de catálogo IDS IS-CW100). Se necesitan por lo menos 4 lavados separados de MP seguidos de 1 lavado de tampón MOPS, compuesto por 231 mg de sal sódica de MOPS, 209 mg de MOPS y 0.9 g de azida de sodio, para eliminar el material no unido y realizar la precipitación en la mezcla de reacción.

40 El eluido capturó 1,25D sobre MP con 75 µl de hidróxido de sodio 0,4 N durante 6 minutos. A continuación se realiza una etapa de neutralización con 25 µl de ácido cítrico 0,4 M y 100 µl de tampón de ensayo para obtener la misma composición básica que un calibrador de ensayo. Se transfieren 120 µl de eluido desde la primera cubeta a una segunda cubeta para la medición de 1,25D.

45 La 1,25D se mide utilizando el reactivo de ensayo de 1,25-dihidroxivitamina D (número de catálogo IDS IS-2400). Se incuban 120 µl de eluido que contiene 1,25D extraída con el anticuerpo anti-1,25D de oveja biotinilado. Después se añade el conjugado 1,25D-acridinio, que compite por los sitios de unión al anticuerpo. Después se añaden partículas magnéticas recubiertas con estreptavidina y, después de una etapa de incubación adicional, las partículas magnéticas se lavan para eliminar materiales no unidos. Tras la adición de reactivos de activación, se inicia una reacción de quimioluminiscencia súbita. La señal luminosa se mide con el fotomultiplicador como unidades de luz relativas (RLU) y es inversamente proporcional a la cantidad de 1,25D presente en la muestra.

55 El procedimiento es capaz de gestionar muestras con un alto contenido en lípidos de hasta 3 g/dl de triglicéridos, 300 mg/dl de colesterol y 7,55 g/dl de albúmina. El procedimiento completamente automatizado observó una buena correlación con el procedimiento de extracción de inmunocápsulas IDS-iSYS 1,25D en el ejemplo 2.

60 El hallazgo del presente documento es que es posible extraer directamente 1,25D de suero humano con partículas magnéticas recubiertas con anticuerpo anti-1,25D y reactivos de extracción optimizados sin tener que utilizar múltiples equipos distintos de un separador magnético para lavar MP y recoger el eluido desde las MP. El proceso de extracción total dura aproximadamente 21 minutos. El tiempo para el primer resultado es de 93 minutos.

Ejemplo 2: medición de la cantidad de concentración de 1,25D en una muestra según el procedimiento conocido anterior

- 5 Deslipidar la muestra en un tubo de vidrio o plástico etiquetado añadiendo 500 μ l de muestra a un tubo seguidos de 50 μ l de reactivo de deslipidación, que comprende 10 g de sulfato de dextrano (50 k), número de catálogo Sigma D8787, en un litro de cloruro de magnesio 0,5 M. Mezclar y centrifugar a 2000 g durante 15 minutos.
- 10 Etiquetar la cápsula. Retirar la tapa de rosca de la cápsula. Añadir 150 μ l de muestra deslipidada a una cápsula que contiene una suspensión de fase sólida a la que se une un anticuerpo monoclonal altamente específico para 1,25D. Volver a disponer la tapa de forma segura. La cápsula se gira de extremo a extremo durante 90 minutos a temperatura ambiente para permitir la unión de 1,25D al anticuerpo monoclonal.
- 15 Colocar la cápsula en posición vertical durante 3-5 minutos, permitiendo que el gel se asiente. Retirar el tapón de rosca y desprender el tapón inferior de la cápsula. Disponer cada cápsula en un tubo de vidrio o plástico, centrifugar a 500-1000 g durante 1 minuto.
- 20 La cápsula se lava 3 x con agua, incubación de 1 minuto seguida de centrifugación de 1 minuto a 500-1000 g cada vez, para eliminar potenciales sustancias interferentes.
- 25 Transferir la cápsula a un tubo de base con faldón cónico de polipropileno de 2 ml etiquetado de forma apropiada. El eluido capturó 1,25D con 3 x 150 μ l de etanol, 1-2 minutos de incubación seguidos de 1 minuto de centrifugación a 500-1000 g cada vez.
- 30 Desechar la cápsula. Disponer el microtubo que contiene eluido en un bloque de calentamiento o baño de agua para evaporarlo con un flujo suave de nitrógeno a 40 °C durante 45-60 minutos. Reconstituir cada microtubo con 200 μ l de tampón de ensayo.
- 35 Las muestras inmunopurificadas reconstituidas se miden utilizando el reactivo de ensayo 1,25-dihidroxivitamina D (número de catálogo IDS IS-2400), tal como se describe en el ejemplo 1.
- El proceso de extracción total dura aproximadamente 4 horas. El tiempo para el primer resultado es de aproximadamente 5 horas.
- Por supuesto, la presente invención no está restringida a la forma de realización descrita anteriormente a modo de ejemplo no limitante, sino que, por el contrario, abarca todas las formas de realización de la misma.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para determinar la cantidad de un analito en una muestra que comprende:
 - 5 - una etapa de purificación que comprende las etapas siguientes:
 - a) mezclar la muestra, un agente de deslipidación y unas primeras partículas magnéticas recubiertas con unos primeros socios de unión a analito en el primer recipiente,
 - 10 b) incubar la mezcla contenida en el primer recipiente de manera que precipite los lípidos contenidos en la muestra y unir el analito contenido en la muestra a los primeros socios de unión a analito,
 - c) someter el primer recipiente a un campo magnético de manera que atraiga magnéticamente las primeras partículas magnéticas a una parte de la pared interior del primer recipiente,
 - 15 d) eliminar los reactivos no unidos de la mezcla contenida en el primer recipiente,
 - e) eluir el analito unido en una solución de elución de manera que separe el analito de los primeros socios de unión a analito,
 - 20 - una etapa de transferencia que comprende las etapas siguientes:
 - f) someter el primer recipiente a un campo magnético de manera que atraiga magnéticamente las primeras partículas magnéticas a una parte de pared interior del primer recipiente,
 - 25 g) transferir un volumen de la solución de elución que comprende el analito desde el primer recipiente hasta un segundo recipiente, y
 - una etapa de cuantificación, que se produce en el segundo recipiente, que consiste en la cuantificación del analito.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el analito es un metabolito de vitamina D o un esteroide.
3. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que el analito es 1,25-dihidroxitamina D (1.25D).
- 35 4. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que el analito es un esteroide seleccionado de entre un grupo que consiste en aldosterona, andrógenos, estrógenos, progestágenos y colesterol.
5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la muestra es cualquier medio biológico acuoso.
- 40 6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la cuantificación del analito se realiza utilizando un inmunoensayo.
- 45 7. Procedimiento según la reivindicación 6, en el que el inmunoensayo se lleva a cabo utilizando unas segundas partículas magnéticas recubiertas con unos segundos socios de unión a analito.
8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que por lo menos uno de entre los primeros y segundos socios de unión a analito es un anticuerpo policlonal, monoclonal, quimérico, tecnológico o humanizado, un fragmento scFV o Fab.
- 50 9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el agente de deslipidación es un analito polianiónico.
- 55 10. Procedimiento según la reivindicación 9, en el que el agente de deslipidación es un analito polianiónico seleccionado de entre un grupo que consiste en sulfato de dextrano, ácido fosfolvófrámico y heparina en presencia de un catión del Grupo II.
- 60 11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa de eliminación comprende una etapa de lavado que consiste en lavar las primeras partículas magnéticas con una solución de lavado.
- 65 12. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la solución de elución es obtenida mediante la adición de una solución básica seguida de la adición de una solución de neutralización en un tampón de procedimiento.

13. Procedimiento según la reivindicación 12, en el que el tampón de procedimiento comprende BSA, polipéptido, manitol, sacarosa, mezcla de tritón-antioxidante, ascorbato de sodio, trolox e hidrogenocarbonato de sodio en un tampón MOPS.

5 14. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que la etapa de purificación, la etapa de transferencia y la etapa de cuantificación son llevadas a cabo por un dispositivo analítico automático, tal como un analizador de inmunoensayo automático.

10 15. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, que además incluye las etapas siguientes:
proporcionar un dispositivo analítico automático que incluye:

- una pluralidad de recipientes (11),
- 15 - un rotor (7) que presenta un eje de rotación sustancialmente vertical y que es impulsado de forma giratoria alrededor de su eje de rotación, delimitando el rotor (7) unas cavidades (8) abiertas radialmente hacia el exterior,
- un dispositivo de carga (9) para cargar unos recipientes (11) en las cavidades (8) del rotor (7),
- 20 - por lo menos un dispositivo de muestreo y pipeteo (13) para suministrar reactivos y muestras a unos recipientes (11) recibidos en las cavidades (8) del rotor (7),
- 25 - un módulo de sedimentación magnética y lavado (23) para recibir un recipiente (11) extraído del rotor (7) y para generar un campo magnético, incluyendo el módulo de sedimentación magnética y lavado (23) un aparato de pipeteo (25) para pipetear fluidos desde un recipiente recibido en el módulo de sedimentación magnética y lavado,
- 30 - un módulo de atracción magnética (26) que incluye una carcasa abierta hacia arriba (27) para recibir un recipiente (11) extraído del rotor (7), y un primer generador de campo magnético (28) situado en la proximidad de la carcasa abierta hacia arriba (27) y
- un dispositivo de cuantificación (29) para recibir un recipiente (11) extraído del rotor (7) y para cuantificar un analito contenido en dicho recipiente extraído (11),
- 35

en el que el dispositivo de muestreo y pipeteo (13) está dispuesto para transferir un volumen de solución de un recipiente (11) recibido en el módulo de atracción magnética (26) a otro recipiente (11) recibido en el rotor (7),

40 llevándose a cabo automáticamente la etapa de purificación, la etapa de transferencia y la etapa de cuantificación utilizando el dispositivo analítico automático.

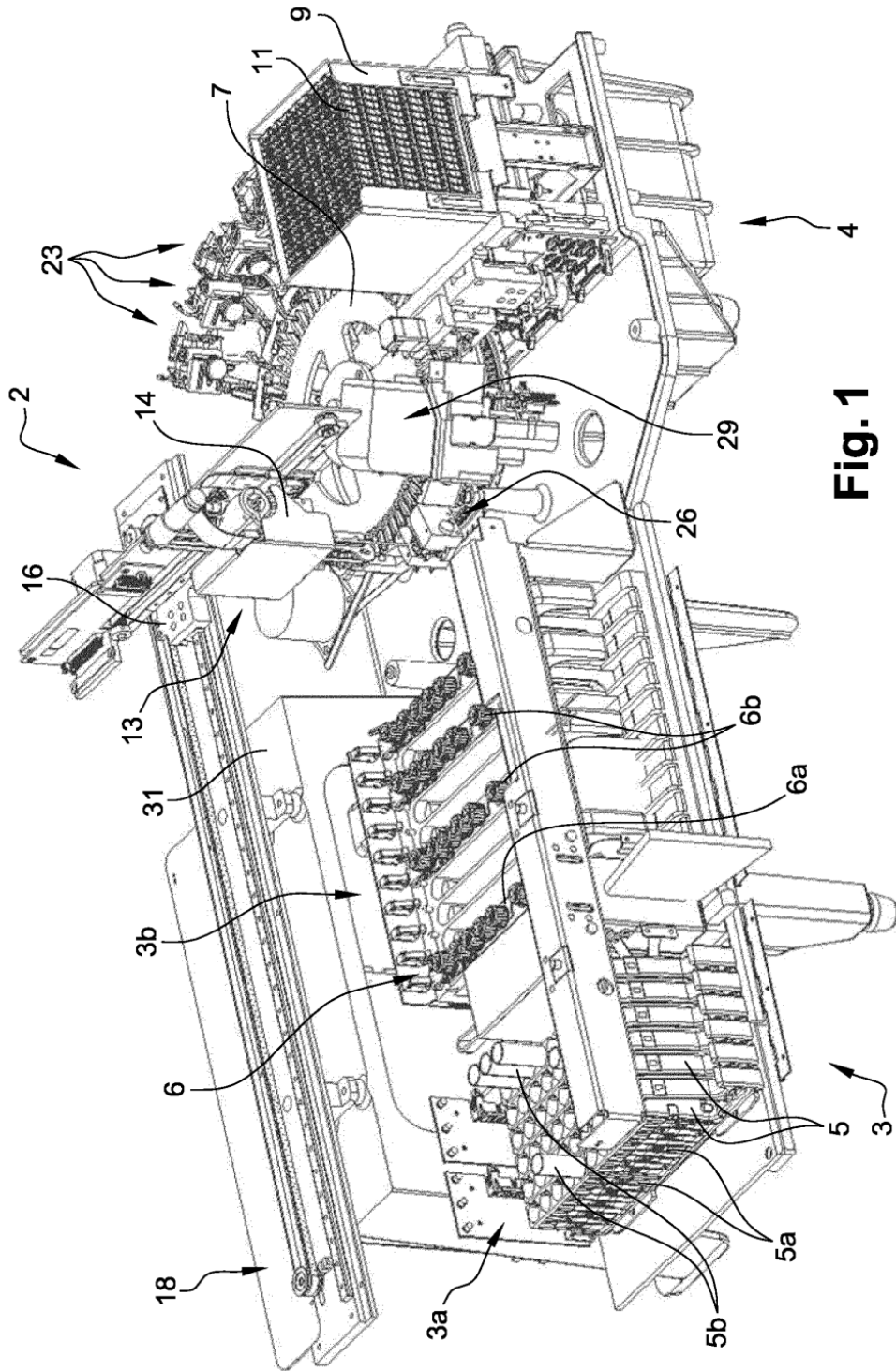


Fig. 1

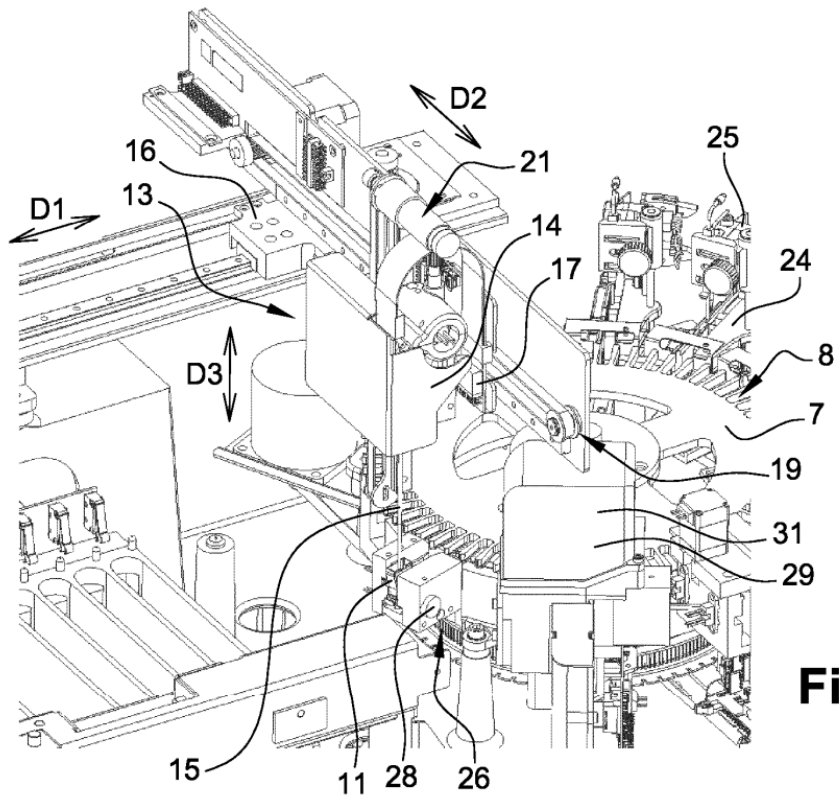


Fig. 2

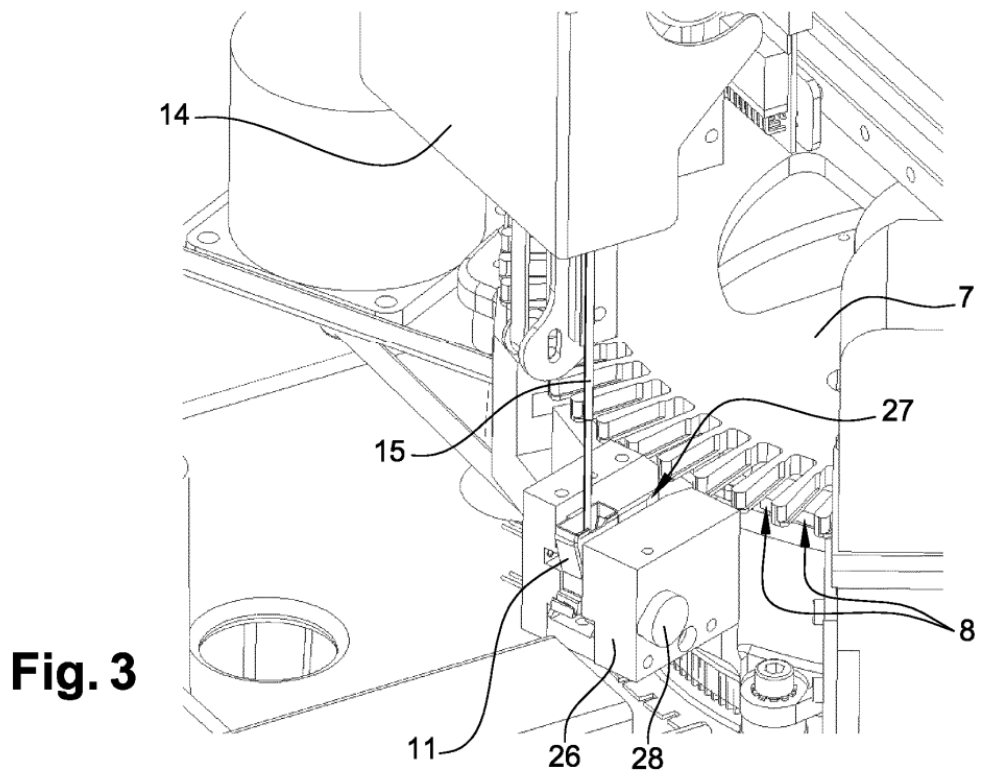


Fig. 3

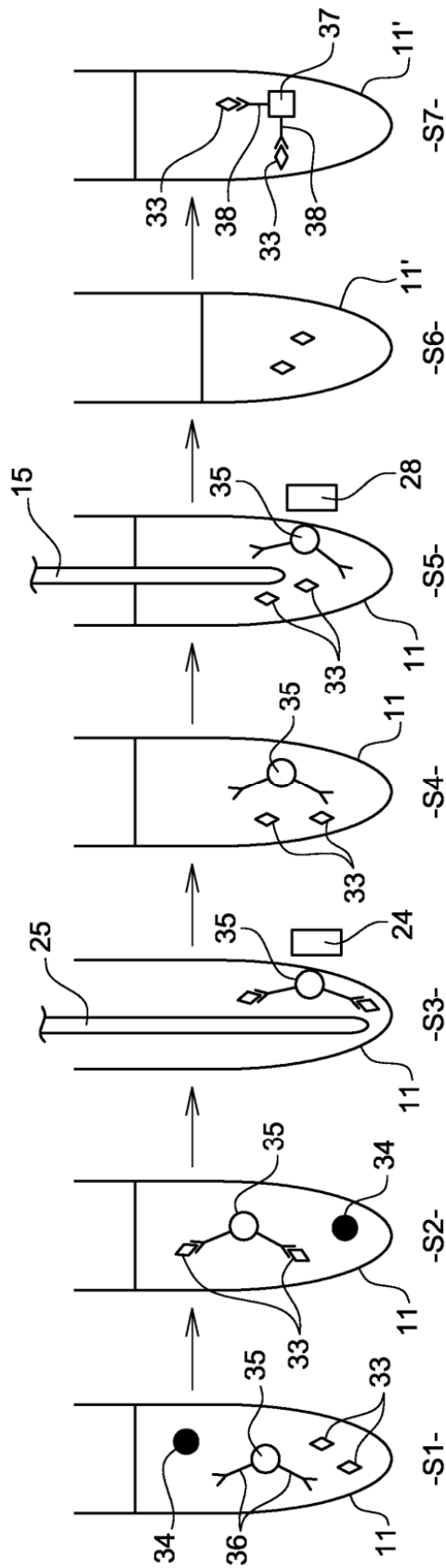


Fig. 4