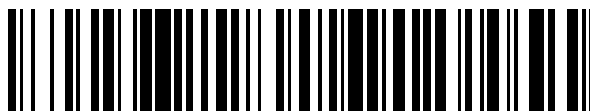


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 773 261**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.10.2012 PCT/EP2012/070211**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.04.2013 WO13053855**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.10.2012 E 12770149 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.12.2019 EP 2766493**

54 Título: **Método de procesamiento de muestras y cartucho de procesamiento de muestras**

30 Prioridad:

11.10.2011 EP 11008214

11.10.2011 US 201161545983 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.07.2020

73 Titular/es:

**QIAGEN GMBH (100.0%)
Qiagen Strasse 1
40724 Hilden, DE**

72 Inventor/es:

**WENDE, ANDY;
DAHLKE, RAINER;
HIMMELREICH, RALF;
ROTHMANN, THOMAS;
EBERHARD, MICHAEL;
GROSSHAUSER, GERD;
JEZIORSKI, MARKUS;
ATTIG, HANS;
DREXLER, JOSEF y
HOLZER, EVA**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 773 261 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

Método de procesamiento de muestras y cartucho de procesamiento de muestras

Campo de la invención

5 La presente invención pertenece al campo de la biotecnología. Se proporcionan métodos para reconstituir una composición seca que comprende reactivos para llevar a cabo un método analítico, aclarar un lisado, métodos analíticos para detectar biomoléculas usando composiciones secas reconstituidas y cartuchos específicos que son útiles para procesar una muestra.

Antecedentes

10 Actualmente existe una gran demanda de métodos analíticos rápidos para procesar una muestra biológica y detectar y analizar las biomoléculas que contiene. El requisito previo para un método analítico de ese tipo es que las biomoléculas que se van a analizar, por ejemplo, ácidos nucleicos, estén disponibles para el método analítico de tal manera que las biomoléculas de interés se proporcionan en una cantidad capaz de ser analizada y con una pureza suficiente para el método analítico pretendido. Para analizar, por ejemplo, para una detección de ácidos nucleicos, un método ampliamente utilizado es, por ejemplo, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), mediante la cual se amplifica el ácido nucleico de interés. La PCR es un método analítico, ya que es posible, al seleccionar cebadores específicos, identificar la presencia de secuencias correspondientes en la población de ácidos nucleicos comprendidos en la muestra. Además, los mismos ácidos nucleicos amplificados mediante la PCR pueden ser objeto de análisis adicionales, por ejemplo, se pueden detectar, secuenciar, identificar o analizar de otra manera. Las reacciones de amplificación y detección isotérmicas de ácidos nucleicos son alternativas bien conocidas a la PCR. Ejemplos para esta categoría de métodos analíticos son LAMP (amplificación isotérmica mediada por bucle), RPA (amplificación con polimerasa recombinasa), tHDA (amplificación dependiente de hélice), NEAR (reacción de amplificación con enzimas de corte), TMA (amplificación mediada por transcripción) y NASBA (amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico).

25 Es deseable emplear métodos económicos y que ahorren tiempo para un análisis de este tipo, ya que con frecuencia se da el caso de que grandes cantidades de diferentes muestras se tienen que procesar simultáneamente. Por lo tanto, es deseable poder analizar las biomoléculas diana sin purificarlas primero y, por lo tanto, poder llevar a cabo el método analítico con el lisado crudo que comprende las biomoléculas de interés. Al superar la necesidad de aislar primero las biomoléculas, se pueden ahorrar tiempo y gastos. Para poder usar el lisado crudo en un método analítico, tal como una reacción de amplificación, las condiciones de la lisis se deben elegir cuidadosamente porque si se eligen condiciones o sistemas de tampón inadecuados, el método analítico no se puede llevar a cabo con una precisión suficiente. En particular, es importante reducir o neutralizar los contaminantes que podrían inhibir el método analítico previsto. Un tampón de lisis adecuado que permite usar el lisado crudo directamente en una reacción de amplificación se describe, por ejemplo, en el documento US 2011/0177516. El tampón de lisis descrito en ese documento comprende aglutinantes o espesantes tales como PVP que se unen o neutralizan los inhibidores de la PCR comprendidos en el lisado. Sin embargo, todavía existe una necesidad de proporcionar un método mejorado para proporcionar un lisado que se pueda emplear directamente en un método analítico, tal como un método de amplificación. En particular, existe una necesidad de proporcionar un método de lisis que permita eliminar contaminantes que puedan interferir potencialmente con el método analítico previsto de manera más eficaz.

40 Para poder llevar a cabo el método analítico de manera rentable y también en instalaciones no especializadas, es necesario proporcionar un procedimiento de análisis de biomoléculas completo, económico y fácil de manejar. Hoy en día, los métodos analíticos que implican la amplificación de ácidos nucleicos para el diagnóstico de enfermedades infecciosas o pruebas genéticas para la detección y vigilancia del cáncer, son un método común dentro de los laboratorios de diagnóstico. Muchos dispositivos especializados hacen que las pruebas sean fáciles de realizar mediante una automatización de muchas etapas del protocolo. La mayoría de las pruebas se realizan actualmente en laboratorios centralizados que utilizan instrumentos no portátiles y de funcionamiento complejo. Actualmente, las pruebas generalmente requieren individuos altamente especializados para realizar los ensayos. Como resultado, el tiempo transcurrido entre la obtención de una muestra sospechosa de contener un fragmento de ácido nucleico específico y la determinación de su presencia o ausencia, suele ser de varias horas e incluso días. Sin embargo, al igual que con otros tipos de pruebas analíticas, los médicos y otras personas a menudo requieren resultados más rápidamente y que se puedan obtener en un formato conveniente y fácil de usar. En consecuencia, existe una necesidad de un sistema de análisis portátil capaz de realizar pruebas de ácido nucleico de manera rápida y conveniente. Mientras tanto, se han diseñado los llamados dispositivos 'integrados', y también se ha producido una tendencia a la miniaturización en su construcción. Esta evolución ha conducido a los sistemas "Lab-on-a-Chip" (LoC), de los cuales los más elaborados son capaces de procesar una prueba de diagnóstico desde la muestra hasta el resultado. Por lo tanto, existen sistemas disponibles, en los que el método analítico se lleva a cabo en un sistema miniaturizado, por ejemplo, un cartucho. Los cartuchos respectivos se describen, por ejemplo, en los documentos WO2006/071770, US2009/0130658, WO 2006/042734 y DE 10 2008 004 646.

Los cartuchos respectivos comprenden frecuentemente los reactivos necesarios para llevar a cabo el método analítico de interés en una forma seca, preferiblemente una forma liofilizada. Las composiciones secas de reactivos

- se usan ampliamente en métodos analíticos, en particular en reacciones de amplificación tales como, por ejemplo, la reacción en cadena de la polimerasa o para detectar otros analitos como las proteínas. Las respectivas composiciones secas generalmente comprenden uno o varios o incluso todos los reactivos necesarios para el método analítico, como por ejemplo, enzimas, compuestos de detección, por ejemplo, anticuerpos o sondas marcados, tampones, sales, oligonucleótidos y similares. El uso de las respectivas composiciones secas, en particular composiciones liofilizadas, tiene la ventaja de que las composiciones secas son estables durante el almacenamiento y, por lo tanto, las respectivas composiciones liofilizadas se usan frecuentemente en cartuchos para proporcionar todos los reactivos necesarios para el método de análisis que se va a llevar a cabo en el cartucho. Proporcionar los reactivos en una forma seca respectiva tiene la ventaja de que el usuario no necesita combinar el mismo los reactivos necesarios. En cambio, solo se añade una cantidad predeterminada de líquido, tal como agua o un tampón adecuado para reconstituir los reactivos secos, proporcionando de este modo una mezcla de reacción que es adecuada para realizar el método analítico previsto una vez que se incorpora la muestra que comprende, por ejemplo, ácidos nucleicos. En este caso, es importante que se añada una cantidad predefinida de líquido para el procedimiento de reconstitución, con el fin de garantizar que los reactivos se proporcionen en la concentración adecuada. Para este fin, se usan frecuentemente bombas o dispositivos dispensadores junto con los cartuchos. Además, los cartuchos respectivos también están diseñados y equipados con reactivos y componentes adecuados, tales como partículas magnéticas para permitir una purificación de las biomoléculas de interés, en particular los ácidos nucleicos, desde la muestra antes de llevar a cabo el método analítico previsto, como en particular un método de PCR. En estos sistemas se realiza una purificación para asegurar que los ácidos nucleicos se proporcionen en una forma suficientemente pura para permitir el método de análisis, como en particular el método de amplificación. Por lo tanto, los sistemas LoC conocidos tienen el inconveniente de que los cartuchos tienen un diseño bastante complejo y, además, también el procedimiento que se realiza en el cartucho suele ser bastante complejo, con el fin de permitir la realización del método analítico. Los sistemas actuales necesitan varios tampones de procesamiento de la muestra y otras soluciones con el fin realizar el procesamiento de la muestra dentro del chip. Además, se necesitan válvulas, bombas y otros medios complicados para procesar volúmenes específicos de dichos tampones para el procesamiento de las muestras. Esto aumenta los costes de los cartuchos respectivos. Por lo tanto, existe una necesidad de métodos más simples para llevar a cabo el método analítico previsto, utilizando un sistema de cartuchos respectivo. Además, existe una necesidad de proporcionar cartuchos con un diseño más simple que, en particular, se puedan producir con menores costes.
- El documento WO2010/003493 se refiere a un método para la amplificación de ácidos nucleicos a partir de muestras biológicas. Las células se lisan en una solución de lisis y el lisado se puede usar inmediatamente para el análisis utilizando un método que amplifica el ácido nucleico. El documento WO2010/003493 no describe un procedimiento de reconstitución para reconstituir una composición seca de reactivos.
- El documento WO01/92569 se dirige a una composición seca de reactivos que incluye un tampón de reacción, dNTPs, al menos dos cebadores y una polimerasa. La composición seca se puede rehidratar con una solución acuosa.
- El documento WO2010/001162 se refiere a composiciones liofilizadas para uso en reacciones bioquímicas. Para la reconstitución de las composiciones secas, se usa un tampón de hidratación.
- El documento EP2202302 se dirige a una composición seca con una polimerasa estabilizada y a un método para prepararla. La composición seca se reconstituye añadiendo una solución acuosa.
- El documento WO2009/057931 se refiere a una composición seca para PCR de inicio en caliente. El documento WO2009/057931 tampoco describe el uso de una muestra lisada para la reconstitución de la composición seca.
- El documento WO2004/036184 proporciona una composición seca que comprende un nucleótido ligado a un colorante fluorescente. Para reconstituir la composición, se añade una solución acuosa.
- El documento WO2006/071770 se refiere a sistemas y métodos de diagnóstico molecular. No describe que un lisado se pueda usar directamente para reconstituir una composición seca.
- El documento WO2006/042734 se dirige a un cartucho de un solo uso en donde un reactivo seco se reconstituye con agua. El cartucho no comprende una barrera de dosificación.
- El documento US2008/172025 describe un cartucho para una reacción química. No describe un método para reconstituir un reactivo seco. El cartucho no comprende una barrera de dosificación.
- El documento WO2011/011391 se refiere a un método rápido para la detección y caracterización del serotipo O157:H7 de la bacteria *Escherichia coli*, basado en la presencia de secuencias de ácido nucleico, en donde una composición seca se reconstituye sin una etapa de aclaramiento.
- El documento EP2248915 se refiere a un método para amplificar y detectar secuencias de ácido nucleico en un cartucho de reacción. El cartucho no comprende una barrera de dosificación.
- El documento EP1935496 describe un dispositivo para la detección de una secuencia de nucleótidos de un

organismo. Además, ese documento no describe un cartucho que comprende una barrera de dosificación.

El objeto de la presente invención es superar al menos un inconveniente y/o mejorar los métodos y sistemas de la técnica anterior descritos anteriormente. Además, el objeto de la presente invención se dirige al menos a una de las necesidades descritas anteriormente.

5 **Compendio de la invención**

La presente invención se puede definir por las reivindicaciones adjuntas. En consecuencia, la presente invención proporciona un método para analizar una muestra que comprende ácidos nucleicos según la reivindicación 1. La presente invención también proporciona un cartucho de procesamiento según la reivindicación 9, un cuerpo de cartucho según la reivindicación 14 y un método operativo según la reivindicación 18.

10 También se describe lo siguiente:

De acuerdo con un primer aspecto, se proporciona un método analítico para analizar una muestra que comprende biomoléculas, en donde dicho método comprende la reconstitución de una composición seca que comprende reactivos para llevar a cabo el método analítico. En este caso, los inventores han encontrado un método rápido que permite reconstituir una composición seca respectiva sin la necesidad de purificar primero las biomoléculas o de
15 usar una solución de reconstitución tal como un tampón de reconstitución o agua con el fin de reconstituir la composición seca.

En un primer subaspecto A, dicho método comprende las siguientes etapas:

- a) lisar la muestra para proporcionar una muestra lisada y opcionalmente aclarar la muestra lisada;
- b) poner en contacto al menos una porción de la muestra lisada con una composición seca que comprende reactivos para llevar a cabo el método analítico, proporcionando de este modo una composición reconstituida;
- c) llevar a cabo un método analítico utilizando la composición reconstituida.

Los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que es posible reconstituir una composición seca que comprende reactivos para llevar a cabo un método analítico utilizando directamente la muestra lisada. Por lo tanto, en contraste con los métodos de la técnica anterior, no es necesario reconstituir la composición seca añadiendo, por ejemplo, agua o un tampón adecuado antes de añadir la muestra lisada. Por el contrario, la muestra lisada, que preferiblemente se aclara eliminando contaminantes tales como precipitados en particular, se puede usar directamente para la reconstitución. Por lo tanto, no existe una necesidad de purificar primero las biomoléculas y/o de reconstituir la composición seca añadiendo un líquido por separado. Por el contrario, después de la lisis, la muestra lisada se pone en contacto directamente con la composición seca para su reconstitución. Esto ahorra
25 un tiempo considerable y hace que el procedimiento respectivo sea particularmente adecuado para el empleo en un cartucho de procesamiento, como los que se utilizan en los sistemas LoC. No se necesitan reactivos por separado para purificar las biomoléculas y/o para reconstituir la muestra. Todo el método (cartucho de procesamiento respectivamente) puede funcionar con la muestra lisada. Por lo tanto, cuando se realiza la lisis de la muestra con una solución de lisis, solo se necesita una solución para llevar a cabo todas las etapas exigidas por el procedimiento. La muestra se puede recoger ventajosamente directamente en una solución de lisis apropiada, ahorrando de este modo una etapa de procesamiento adicional. Por lo tanto, se proporciona un método sorprendentemente simple y rápido para llevar a cabo un método analítico que implica el uso de una composición seca que comprende reactivos para llevar a cabo el método analítico de interés.

De acuerdo con un segundo subaspecto B, dicho método comprende las siguientes etapas:

- a) poner en contacto la muestra con una solución de lisis proporcionando de ese modo una mezcla de lisis;
- b) usar la mezcla de lisis para reconstituir una composición seca que comprende reactivos para llevar a cabo el método analítico, proporcionando de este modo una composición reconstituida;
- c) llevar a cabo un método analítico utilizando la composición reconstituida,

45 en donde la composición reconstituida se aclara opcionalmente y en donde después de la etapa b) se realiza al menos una etapa que favorece la lisis de la muestra.

Los inventores han encontrado que también es posible reconstituir eficazmente la composición seca antes de que la muestra se lise. En esta variante, la mezcla de lisis que comprende la muestra mezclada con una solución de lisis se usa para reconstituir la composición seca que, en consecuencia, se proporciona como una mezcla reconstituida que comprende además de los reactivos para realizar el método analítico, la muestra y la solución de lisis. Después de la reconstitución, se realiza al menos una etapa, preferiblemente una etapa de calentamiento, para lisar (completamente) la muestra que está comprendida en la mezcla reconstituida. Dicha etapa puede realizarse antes de la etapa c), por ejemplo, como una etapa intermedia separada. Sin embargo, la lisis también se puede lograr o completar durante la ejecución del método de análisis. Esto es particularmente factible si el método de análisis
50

comprende una etapa de calentamiento. De este modo, el método es capaz de ahorrar etapas del procedimiento.

De acuerdo con un segundo aspecto, la presente descripción se refiere al uso de una muestra lisada, preferiblemente una muestra lisada aclarada, o una muestra mezclada con una solución de lisis para reconstituir una composición seca que comprende reactivos para llevar a cabo un método analítico mediante la adición de la muestra lisada o la muestra mezclada con la solución de lisis, a la composición seca y mezclar.

Como se ha descrito anteriormente, los presentes inventores han encontrado que es posible reconstituir una composición seca que comprende reactivos para llevar a cabo un método analítico, tal como por ejemplo, un método de PCR, mediante la adición de al menos una alícuota de una muestra lisada, preferiblemente de la muestra lisada aclarada o la mezcla de lisis que comprende la muestra mezclada con una solución de lisis. De este modo, se proporciona una composición reconstituida que es adecuada para realizar el método analítico. Al usar directamente la muestra lisada, que preferiblemente se aclara antes del uso, se tiene la ventaja de que se puede ahorrar tiempo y reactivos de reconstitución. Además, los inventores han descubierto que es posible lograr una reconstitución eficaz de la composición seca mediante la adición de una mezcla de lisis, que comprende la muestra y la solución de lisis. De este modo, el procedimiento de reconstitución se puede simplificar considerablemente.

De acuerdo con un tercer aspecto, la presente descripción se refiere a un método para aclarar una muestra eliminando precipitados, en donde la muestra se pone en contacto antes, durante o después de la lisis con al menos un soporte sólido que se une a los precipitados procedentes de la muestra lisada, formando de este modo un complejo con los precipitados, y en donde dicho complejo está opcionalmente separado de la muestra restante.

Este método es particularmente eficaz para proporcionar una muestra lisada aclarada. Los presentes inventores han desarrollado métodos que son particularmente adecuados para aclarar una muestra lisada eliminando contaminantes tales como precipitados que podrían inhibir el método analítico. Como se muestra en los ejemplos, la unión eficaz de los precipitados mejora el rendimiento del método analítico posterior, en particular cuando se pretende realizar una reacción de amplificación, ya que los métodos respectivos pueden ser inhibidos por los precipitados que se transportan desde la muestra lisada a la reacción analítica. Además, como se muestra en los ejemplos, el uso de dicho método también es adecuado para aclarar una composición reconstituida eliminando los contaminantes inhibidores respectivos.

De acuerdo con un cuarto aspecto, se proporciona un método para elevar el valor del pH de una muestra ácida, comprendiendo dicho método la adición de un tamiz molecular, preferiblemente una zeolita, a la muestra para elevar el valor del pH de la muestra ácida. Este método se puede usar ventajosamente, por ejemplo, para ajustar el valor del pH de una muestra lisada desde un intervalo de pH ácido a neutro, a uno alcalino.

De acuerdo con un quinto aspecto, la presente descripción se refiere a un cartucho de procesamiento adecuado para el uso en un método para analizar una muestra que comprende biomoléculas de acuerdo con el primer aspecto, en donde el cartucho de procesamiento comprende un cuerpo de cartucho y al menos una cámara de reacción que comprende una composición seca que comprende reactivos para llevar a cabo un método analítico, en donde el cuerpo de cartucho comprende una abertura de entrada de muestra, al menos una salida de muestra y un conducto de paso de fluido que conecta la abertura de entrada de muestra y la salida de muestra, en donde la salida de muestra se abre en la cámara de reacción, en donde el cartucho está diseñado de tal manera que la reconstitución de la composición seca comprendida en la cámara de reacción se logra mediante una muestra que entra en el cartucho a través de la abertura de entrada de muestra.

Los inventores han desarrollado un diseño de cartucho, que es marcadamente simple en comparación con los cartuchos de la técnica anterior. Todo el procedimiento que tiene lugar dentro del cartucho está operado por la muestra que entra en el cartucho a través de la abertura de entrada de muestra. La muestra se proporciona en una forma adecuada para reconstituir la composición seca, de modo que el método de análisis previsto se puede llevar a cabo con una sensibilidad y/o especificidad adecuadas. Para ese fin, la muestra en una realización es una muestra tratada previamente, por ejemplo, una muestra lisada como se ha descrito anteriormente. El pretratamiento puede tener lugar ventajosamente en el recipiente que se usa para recoger la muestra y que se puede ensamblar con el cartucho de procesamiento para que la abertura del recipiente de muestra esté en conexión fluida con la abertura de entrada de muestra, permitiendo de este modo la entrada de la muestra pretratada en el cuerpo de cartucho. La muestra que entra en el cartucho a través de la abertura de entrada de muestra es preferiblemente una muestra lisada, más preferiblemente una muestra lisada aclarada.

Además, la muestra puede ser una mezcla de lisis que comprende la muestra y una solución de lisis. En una mezcla de lisis respectiva, la lisis de la muestra aún no se ha completado. Como se muestra en esta memoria, la lisis se puede completar después de la reconstitución de la composición seca, usando dicha mezcla de lisis, por ejemplo, mediante una simple etapa de calentamiento que se realiza durante el análisis, por ejemplo, una reacción de PCR. Por lo tanto, ventajosamente, no se proporcionan medios separados al cartucho de procesamiento para purificar las biomoléculas comprendidas en la muestra, ni medios para dispensar un líquido tal como agua o un tampón desde un depósito hasta la cámara de reacción, para lograr la reconstitución de la composición seca. Por el contrario, la muestra que entra en el cartucho a través de la abertura de entrada de muestra logra la reconstitución de la composición seca dentro de la cámara de reacción. Debido a su diseño simple, la producción del cartucho es posible

con costes muy bajos. Además, un diseño de cartucho simple respectivo es menos propenso a errores que los diseños más complejos.

De acuerdo con un sexto aspecto, se proporciona un cuerpo de cartucho que es adecuado para proporcionar una conexión fluida desde un recipiente de muestra que contiene un fluido y que se puede ensamblar con el cuerpo de cartucho, con al menos una cámara de reacción que se puede ensamblar con el cuerpo de cartucho o que se proporciona como una parte integral del cuerpo de cartucho, que comprende

- una abertura de entrada de muestra y una salida de muestra,
- un conducto de paso de la muestra que conecta la abertura de entrada de muestra y la salida de muestra,
- un saliente de conexión del recipiente de muestra para conectar el recipiente de muestra, en donde al ensamblar el recipiente de muestra con dicho saliente de conexión, la abertura de entrada de muestra está en comunicación fluida con el recipiente de muestra,
- al menos un saliente de conexión de la cámara de reacción para conectar una cámara de reacción en donde al ensamblar la cámara de reacción con dicho saliente de conexión, la salida de muestra está en comunicación fluida con la cámara de reacción y/o comprende al menos una cámara de reacción que se proporciona como una parte integral del cuerpo de cartucho

en donde se proporciona al menos una abertura de fluido A en el saliente de conexión de la cámara de reacción y/o en la cámara de reacción y en donde dicha abertura de fluido A comprende una barrera, en donde dicha barrera permite el paso de aire al menos antes de que dicha barrera entre en contacto con un líquido, pero en donde dicha barrera impide sustancialmente el paso de líquido.

El cuerpo de cartucho de acuerdo con el sexto aspecto tiene la ventaja de que comprende un diseño inteligente y rentable que permite la reconstitución de modo sencillo de una composición seca comprendida en la cámara de reacción, tal y como se explicará más adelante en la descripción detallada de la presente descripción. El llenado de la al menos una cámara de reacción con la muestra que entra en el cuerpo de cartucho a través de la abertura de entrada de muestra y que llega a través del conducto de paso de fluido proporcionado en la al menos una cámara de reacción, está controlado por una barrera para líquidos que está comprendida en la abertura de fluido A. Dicha barrera es preferiblemente una membrana hidrófoba porosa, que permite el paso del aire (al menos antes de que se humedezca) pero que sustancialmente no permite el paso de la muestra. Tan pronto como la muestra alcanza la membrana hidrófoba, no puede pasar por dicha membrana y el llenado de la cámara de reacción se detiene automáticamente, asegurando de este modo que la composición seca se reconstituye con una cantidad adecuada predeterminada de muestra, que preferiblemente es una muestra lisada aclarada como se ha descrito anteriormente. Dicho cuerpo de cartucho se puede usar ventajosamente como cuerpo de cartucho en el cartucho de procesamiento de acuerdo con el quinto aspecto.

De acuerdo con un séptimo aspecto, se proporciona un método para la producción de un cartucho de procesamiento según el quinto aspecto, que comprende una cámara de reacción que comprende una composición seca, que comprende reactivos para llevar a cabo un método analítico, comprendiendo dicho método las siguientes etapas:

- (a) preparar a partir de un polímero, un cuerpo de cartucho con al menos un canal y/o una cavidad para proporcionar un conducto de paso de fluido entre la abertura de entrada de muestra del cuerpo de cartucho y la al menos una salida de muestra del cuerpo de cartucho;
- (b) depositar los reactivos en al menos una cámara de reacción y secar los reactivos en la misma, proporcionando de este modo una cámara de reacción que comprende una composición seca que comprende reactivos para llevar a cabo un método analítico;
- (c) cerrar el al menos un canal y/o una cavidad del cuerpo de cartucho con una tapa.

Debido al diseño simple y efectivo del cartucho, su producción es muy rentable.

De acuerdo con un octavo aspecto, se proporciona un sistema para llevar a cabo un método analítico de una muestra que comprende biomoléculas, comprendiendo dicho sistema

- a) un cartucho de procesamiento de acuerdo con el quinto aspecto, en donde el cartucho de procesamiento comprende al menos una cámara de reacción que comprende una composición seca que comprende reactivos para el método analítico;
- b) un recipiente para recibir una muestra que comprende biomoléculas, en donde el recipiente se puede ensamblar con el cartucho de procesamiento;
- c) un dispositivo de procesamiento para recibir el cartucho de procesamiento que comprende el recipiente ensamblado con el mismo y para llevar a cabo el método de análisis junto con el cartucho de procesamiento.

Un sistema respectivo debido al diseño único del cartucho y a la posibilidad de procesar la muestra dentro del recipiente de muestra para proporcionar una muestra pretratada que sea adecuada para reconstituir la composición seca, por ejemplo, una muestra lisada aclarada, tiene la ventaja de que dicho sistema puede procesar automáticamente una muestra con costes reducidos. Además, como el dispositivo de procesamiento es bastante simple y de tamaño pequeño, se puede usar en cualquier laboratorio o instalación en donde la muestra se recoja y analice, por ejemplo, junto con diagnósticos en el punto de atención.

De acuerdo con un noveno aspecto, se proporciona un método operativo para llevar a cabo un método de análisis usando el sistema según el séptimo aspecto, comprendiendo el método:

a) conectar un recipiente que comprende una muestra con el cartucho de procesamiento de acuerdo con el cuarto aspecto, en donde dicho cartucho de procesamiento comprende al menos una cámara de reacción que comprende una composición seca que comprende reactivos para el método analítico;

b) insertar el cartucho de procesamiento con el recipiente de muestra ensamblado al mismo, en un dispositivo de procesamiento; y

c) comenzar un ensayo completamente automático.

El diseño simple del cartucho de procesamiento y la característica de que todo el procedimiento dentro del cartucho, incluyendo la reconstitución de la composición seca, está accionado por la muestra pretratada, que preferiblemente es un lisado aclarado o una mezcla de lisis, que entra en el cartucho desde el recipiente, da como resultado que se proporciona un método muy rentable y fiable. No se necesitan etapas de trabajo manual para preparar la muestra para el método analítico, aparte de conectar el recipiente que comprende la muestra recogida con el cartucho e insertar el cartucho en el dispositivo de procesamiento. Todas las sustancias y reactivos (excepto la muestra que se recoge preferiblemente en una composición de pretratamiento, preferiblemente una solución de lisis) se proporcionan en un cartucho cerrado de un solo uso. Además, todos los procedimientos se realizan dentro del sistema de cartucho cerrado. No hay un contacto directo del usuario con sustancias que sean potencialmente peligrosas para la salud (la muestra y los residuos de los reactivos permanecen en el cartucho cerrado). El cartucho de procesamiento es pequeño, estructurado de forma simple y de producción económica.

Otros objetos, características, ventajas y aspectos de la presente solicitud serán evidentes para los expertos en la materia a partir de la siguiente descripción y las reivindicaciones adjuntas.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se puede definir por las reivindicaciones adjuntas.

En un primer aspecto, se proporciona un método analítico para analizar una muestra que comprende biomoléculas, en donde dicho método comprende la lisis de la muestra y la reconstitución de una composición seca que comprende reactivos para realizar el método analítico.

En un primer subaspecto A, dicho método comprende las siguientes etapas:

a) lisar la muestra para proporcionar una muestra lisada y opcionalmente aclarar la muestra lisada;

b) poner en contacto al menos una porción de la muestra lisada con una composición seca que comprende reactivos para llevar a cabo el método analítico, proporcionando de ese modo una composición reconstituida;

c) llevar a cabo un método analítico utilizando la composición reconstituida.

Sorprendentemente, los inventores han descubierto que es posible reconstituir una composición seca que comprende reactivos para llevar a cabo el método analítico utilizando una muestra lisada en lugar de líquidos que se emplean generalmente para ese fin, como por ejemplo, agua o tampones de reconstitución. El uso de la muestra lisada para la reconstitución proporciona una composición reconstituida que es adecuada para llevar a cabo el método analítico previsto. Por lo tanto, en contraste con los métodos de la técnica anterior, es posible ventajosamente ahorrar un tiempo considerable y etapas del procedimiento al volverse obsoleta la purificación previa de las biomoléculas y/o un procedimiento de reconstitución por separado de la composición seca. Como se muestra en los ejemplos, un método analítico, tal como por ejemplo, una reacción de amplificación, se puede realizar eficazmente cuando se reconstituye una composición seca que comprende los reactivos necesarios para realizar dicho método, usando directamente la muestra lisada. El hecho de que el lisado se pueda usar directamente para la reconstitución era muy sorprendente porque, por lo general, la reconstitución se logra sustancialmente mediante agua u otros líquidos que no comprenden cantidades considerables de contaminantes que podrían interferir con el método analítico previsto. Esa reconstitución es exitosa y proporciona una composición reconstituida que es adecuada para el método de análisis previsto, usando incluso exclusivamente la muestra lisada lo que era muy sorprendente.

El término "lisis", tal y como se usa en el presente documento, se refiere a la destrucción, degradación y/o digestión de una muestra. En una etapa de lisis respectiva, biomoléculas, tales como en particular los ácidos nucleicos,

pueden liberarse de las células o pueden liberarse de otros componentes de la muestra, como por ejemplo, proteínas. En este caso, nos referimos a una etapa respectiva para destruir, degradar y/o digerir una muestra, generalmente como una etapa de lisis, independientemente de si las biomoléculas, tales como en particular los ácidos nucleicos, se liberan de las células o si la lisis se realiza para liberar biomoléculas, tales como ácidos nucleicos, por ejemplo, a partir de proteínas u otras sustancias comprendidas en la muestra. Se conocen varios métodos en la técnica anterior que permiten lograr una lisis eficaz de diferentes materiales de una muestra. Los métodos de lisis adecuados incluyen, pero no se limitan a, acciones mecánicas, químicas, físicas o enzimáticas sobre la muestra. Los ejemplos de etapas de lisis respectivas incluyen, pero no se limitan a, triturar la muestra en un molino de bolas, someter a ultrasonidos, ondas acústicas superficiales (SAW), ciclos repetidos de congelación y descongelación, calentamiento, la adición de detergentes y/o la adición de compuestos degradantes de proteínas, tales como por ejemplo, enzimas degradantes de proteínas, por ejemplo, hidrolasas o proteasas o sales. De acuerdo con una realización, se usa un compuesto degradante de proteínas durante la lisis. De acuerdo con una realización preferida, el compuesto degradante de proteínas es una enzima proteolítica. Una enzima proteolítica se refiere a una enzima que cataliza la escisión de enlaces peptídicos, por ejemplo, en proteínas, polipéptidos, oligopéptidos y péptidos. Las enzimas proteolíticas ejemplares incluyen, pero no se limitan a, proteinasas y proteasas, en particular subtilisinas, subtilasas, serina proteasas alcalinas y similares. Las subtilasas son una familia de las serina proteasas, es decir, enzimas con un residuo de serina en el lado activo. Las subtilisinas son serina proteasas bacterianas que tienen especificidades de sustrato amplias. Las subtilisinas ejemplares incluyen, pero no se limitan a, proteinasa K, proteinasa R, proteinasa T, subtilisina, subtilisina A, proteasa de QIAGEN y similares. Se pueden encontrar descripciones de subtilasas, subtilisinas, proteinasas K y otras proteasas, entre otros lugares en Genov et al., Int. J. Peptide Protein Res. 45: 391-400, 1995. Preferiblemente, la enzima proteolítica es proteinasa K. Preferiblemente, la enzima proteolítica se usa con calentamiento y/o agitación. Además, se pueden usar para la lisis una o varias enzimas que digieren la pared celular, tales como por ejemplo, lisozima, zimolasa y/o pectinasas. El método de lisis adecuado también depende del método analítico previsto. Como la reconstitución de la composición seca que comprende los reactivos para el método analítico, se logra mediante la adición de la muestra lisada, es importante asegurarse de que la lisis realizada no introduzca uno o varios inhibidores del método de análisis posterior, en una concentración que podría inhibir el desarrollo del método analítico posterior hasta un punto en donde el método analítico no se pudiera realizar adecuadamente. La concentración tolerable depende del método analítico que se va a realizar, por ejemplo, las enzimas utilizadas y su susceptibilidad frente a inhibidores y la sensibilidad que se requiere para el desarrollo adecuado de los métodos analíticos. Estos parámetros también pueden variar de una muestra a otra. En este caso, se debe considerar que debido al hecho de que la reconstitución se logra mediante la adición de la muestra lisada, generalmente se introduce una mayor cantidad de biomoléculas en el método analítico que en comparación con los métodos en los que solo se añade una alícuota más pequeña de una muestra lisada a una composición ya reconstituida de reactivos secos. Esta mayor cantidad de biomoléculas también puede compensar una posible inhibición de la reacción analítica mediante contaminantes comprendidos en la muestra lisada.

De acuerdo con un segundo subaspecto B, dicho método comprende las siguientes etapas:

a) poner en contacto la muestra con una solución de lisis proporcionando de ese modo una mezcla de lisis;

b) usar la mezcla de lisis para reconstituir una composición seca que comprende reactivos para llevar a cabo el método analítico, proporcionando de ese modo una composición reconstituida;

c) llevar a cabo un método analítico utilizando la composición reconstituida,

en donde la composición reconstituida se aclara opcionalmente y en donde después de la etapa b) se realiza al menos una etapa que favorece la lisis de la muestra.

Como se ha descrito anteriormente, Los inventores han encontrado que también es posible reconstituir eficazmente la composición seca antes de que la muestra se lise completamente. En esta variante, la mezcla de lisis que comprende la muestra mezclada con una solución de lisis, se usa para reconstituir la composición seca que, en consecuencia, se proporciona como una mezcla reconstituida que comprende, además de los reactivos para realizar el método analítico, la muestra y la solución de lisis. En la mezcla de lisis, la lisis de la muestra es al menos incompleta. Después de la reconstitución, se realiza al menos una etapa, preferiblemente una etapa de calentamiento, con el fin de lisar (completamente) la muestra que está comprendida en la mezcla reconstituida. Dicha etapa se puede realizar antes de la etapa c), por ejemplo, como una etapa intermedia separada. Sin embargo, la lisis también se puede lograr o completar durante la realización del método de análisis. Esto es particularmente factible si el método de análisis comprende una etapa de calentamiento como es, por ejemplo, el caso con una PCR. Por lo tanto, esta variante del método es capaz de ahorrar etapas del procedimiento.

Como ambos subaspectos del método de acuerdo con el primer aspecto comparten muchas características comunes, las etapas comunes de ambos métodos se exponen juntas posteriormente.

De acuerdo con una realización, la muestra se pone en contacto con una composición de lisis, preferiblemente una solución de lisis, que comprende productos químicos y/o reactivos que logran y/o favorecen la lisis de la muestra biológica. Dependiendo de la composición de la solución de lisis, la lisis se puede iniciar directamente. De acuerdo

con algunas realizaciones, la lisis se favorece y, por lo tanto, se facilita con medios adicionales, por ejemplo, realizando una etapa de calentamiento. De acuerdo con una realización preferida, la lisis de la muestra se consigue poniendo en contacto la muestra con un tampón de lisis apropiado y calentando. Como se muestra más arriba y en los ejemplos, la lisis de la muestra se puede lograr antes de poner en contacto la muestra lisada con la composición seca para la reconstitución. Sin embargo, también se puede lograr la lisis, respectivamente completada, después de que la muestra y la solución de lisis se hayan añadido, preferiblemente como una mezcla, a la composición seca. Por ejemplo, la mezcla reconstituida se puede calentar para lograr y/o completar la lisis de la muestra dentro de la mezcla reconstituida. Esta realización es particularmente adecuada cuando se realiza un método analítico que implica una etapa de calentamiento, tal como una reacción de PCR.

De acuerdo con una realización, que es particularmente adecuada si los ácidos nucleicos son la biomolécula de interés, se añade una solución de lisis a la muestra que comprende como componente (a) un tensioactivo no iónico o una mezcla de detergentes no iónicos. El detergente no iónico se selecciona preferiblemente a partir del grupo que consiste en éteres de alcohol graso de polioxietileno, éteres de polioxietileno alquilfenilo, copolímeros de bloques de polioxietileno-polioxipropileno, polisorbatos y etoxilatos de alquilfenol, preferiblemente etoxilatos de nonilfenol, alquilglucósidos y/o éteres de polioxietileno alquil fenilo. La expresión "alcohol graso" en particular significa para los fines de la presente invención, alcoholes que tienen una longitud de cadena de 6 a 22 átomos de carbono, preferiblemente de 8 a 20 átomos de carbono, preferiblemente de 10 a 18 átomos de carbono, particularmente preferible de 12 a 18 átomos de carbono. Se da preferencia en particular a los alcoholes que tienen 12, 14, 16 o 18 átomos de carbono. Aunque los alcoholes grasos pueden ser monoinsaturados o poliinsaturados, son preferiblemente alcoholes grasos saturados. El término "polioxietileno" en particular significa para los fines de la presente invención, una unidad $\text{HO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$, siendo n preferiblemente un número entero de 2 a 150, más preferiblemente de 4 a 120, aún más preferiblemente de 8 a 80, y lo más preferiblemente un número entero seleccionado a partir de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 y 50. Ejemplos preferidos de éteres de alcohol graso de polioxietileno adecuados son alcoholes laurílico, cetílico, oleílico o estearílico polietoxilados que se pueden usar solos o como una mezcla. De acuerdo con una realización preferida de la invención, el al menos un éter de alcohol graso de polioxietileno comprende un componente de alcohol graso que tiene de 6 a 22 átomos de carbono y un componente de polioxietileno que tiene de 2 a 150 unidades $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})$. Preferiblemente, el éter de alcohol graso de polioxietileno se selecciona a partir del grupo que consiste en polioxietileno lauril éter, polioxietileno cetil éter, polioxietileno estearil éter y/o polioxietileno oleil éter. Como alquilglucósido, preferiblemente se emplea un detergente no iónico procedente del grupo de los polisorbatos, preferiblemente polisorbato 20 (Tween 20), polisorbato 40 o polisorbato 80, más preferido polisorbato 20. Ejemplos preferidos de polioxietileno alquil fenil éteres incluyen Triton X-100 y Nonidet P-40. Preferiblemente, al menos dos detergentes no iónicos respectivos están comprendidos en la solución de lisis. De acuerdo con una realización, el componente (a) en la solución de lisis se selecciona a partir del grupo que consiste en Tween, Triton X 100, Nonidet P40 (nonilfenilpolietilenglicol) y Brij58. Preferiblemente, al menos dos detergentes no iónicos respectivos están comprendidos como componente (a) en la solución de lisis. La concentración del tensioactivo no iónico o de la mezcla de detergentes no iónicos en la solución de lisis empleada está entre 0,05 y 5%, preferiblemente entre 0,1% y 2%, más preferiblemente entre 0,2% y 1,5% y lo más preferiblemente entre 0,4% y 1%. Preferiblemente, Triton X-100 y/o Tween 20 están comprendidos como componente (a) en la solución de lisis.

Como componente (b), la solución de lisis comprende al menos un polímero que evita o reduce una inhibición del método analítico posterior. Por lo tanto, la incorporación del polímero a la solución de lisis tiene el efecto de que el método de análisis posterior, tal como por ejemplo, una reacción de amplificación, muestra un rendimiento mejorado cuando dicho polímero se incorpora a la solución de lisis, en comparación con cuando dicho polímero no se incorpora a la solución de lisis. Se supone que el polímero evita o reduce la inhibición mediante la formación de un complejo de forma inespecífica con inhibidores potenciales. Qué compuestos actúan como inhibidores también depende del método analítico que se realice posteriormente. Por ejemplo, los inhibidores típicos de una reacción de amplificación de ácido nucleico que generalmente se originan a partir de la muestra que comprende los ácidos nucleicos, incluyen, pero no se limitan a, proteoglicanos, proteínas y azúcares. El polímero está comprendido en la solución de lisis preferiblemente en una concentración en el intervalo de 0,05 a 0,5%, preferiblemente de 0,085% a 0,2%. También se puede usar una mezcla de polímeros. De acuerdo con una realización, el polímero actúa como un aglutinante y/o espesante y preferiblemente se selecciona a partir de polivinilpirrolidona (PVP), polioxazolina, polietilenglicol, poli(alcohol vinílico) y Luvitec. Preferiblemente, la polivinilpirrolidona se incorpora a la solución de lisis. Los aglutinantes y/o espesantes adecuados que se pueden usar para este fin, también se describen en el documento WO 2010/003493. Como se muestra en los ejemplos, esos aglutinantes y/o espesantes tales como PVP, son muy eficaces para evitar la inhibición de las reacciones de amplificación. Los compuestos adicionales para evitar o reducir los efectos inhibidores de los contaminantes comprendidos en la muestra lisada o la muestra lisada aclarada, también se pueden incorporar a la solución de lisis.

Como componente (c), la solución de lisis puede comprender al menos una enzima, preferiblemente una enzima proteolítica. Las enzimas proteolíticas adecuadas se han descrito anteriormente. Se prefiere emplear una proteinasa termofílica, especialmente preferible una proteinasa termofílica seleccionada a partir de proteinasa K o subtilisina. Se prefiere especialmente usar una proteinasa K termofílica en la solución de lisis. La proteinasa se emplea preferiblemente en una cantidad tal que proporciona de 0,5 a 10 unidades, preferiblemente de 1,5 a 4 unidades

(unidades internacionales) por mililitro de solución de lisis. Sin embargo, la enzima proteolítica también se puede añadir por separado.

De acuerdo con una realización, la solución de lisis comprende como componente (d) al menos un agente quelante para cationes divalentes. Los agentes quelantes adecuados incluyen, pero no están limitados a, ácido dietilentríaminopentaacético (DTPA), ácido etilendinitrilotetraacético (EDTA), ácido etilenglicol tetraacético (EGTA) y N,N-bis(carboximetil)glicina (NTA). De acuerdo con una realización preferida, se usa EDTA. Tal y como se usa en este documento, el término "EDTA" indica entre otras cosas, la porción de EDTA de un compuesto de EDTA tal como, por ejemplo, K₂EDTA, K₃EDTA o Na₂EDTA. El uso de un agente quelante como EDTA tiene el efecto ventajoso de que se inhiben nucleasas tales como las ADNasas y las ARNasas. El agente quelante se emplea preferiblemente en una concentración de 0,5 mM a 5 mM, preferiblemente de 0,75 mM a 2 mM, lo más preferido de 1 mM a 1,5 mM en la solución de lisis. Preferiblemente, se usa EDTA.

De acuerdo con una realización, la solución de lisis comprende como componente (e) al menos una sustancia tamponadora. La sustancia tamponadora debe ser capaz de tamponar la solución de lisis en un intervalo de pH que sea compatible con el intervalo de pH requerido para llevar a cabo el método analítico posterior. Esto, ya que el pH de la muestra lisada se ve fuertemente afectado por la solución que se usa para la lisis, y la muestra lisada se usa para reconstituir la composición seca que comprende los reactivos para el método analítico. Preferiblemente, se usa un tampón en la solución de lisis de modo que el pH de la solución esté entre 7,5 y 11, más preferiblemente de 7,5 a 9. Las soluciones de lisis tamponadas respectivamente son particularmente adecuadas para reconstituir una composición seca que comprende reactivos adecuados para realizar una reacción de amplificación de ácido nucleico. La sustancia tamponadora del pH puede estar comprendida en la solución de lisis en una concentración de 5 mM a 100 mM, preferiblemente de 10 mM a 80 mM, más preferiblemente de 30-50 mM. Preferiblemente, la sustancia tamponadora se selecciona a partir del grupo que consiste en Tris, MOPS, HEPES o fosfato.

Una solución de lisis particularmente preferida comprende

- como componente (a), una mezcla de dos detergentes no iónicos, preferiblemente Polisorbato 20 (Tween 20) y nonilfenilpolietilenglicol (Nonidet P40), en donde cada detergente no iónico está comprendido en una concentración de 0,2% a 0,6%, preferiblemente de 0,4% a 0,5%;
- componente (b), el polímero, que preferiblemente es PVP, en una concentración de 0,05% a 0,15%, preferiblemente 0,1%;
- opcionalmente una enzima proteolítica tal como la proteinasa K como componente (c);
- como componente (d), EDTA en una concentración inferior a 1,5 mM;
- como componente (e), una sustancia tamponadora, preferiblemente TRIS, en una concentración de 7,5 mM a 20 mM, preferiblemente 10 mM.

El valor del pH de la solución de lisis respectiva es preferiblemente de aprox. entre 8,0 y 9,0, preferentemente pH 8,5.

Una solución de lisis tal y como se ha descrito anteriormente es particularmente efectiva en la lisis de una muestra cuando se combina con una etapa de calentamiento. Para este fin, la mezcla de lisis que comprende la muestra y la solución de lisis se calientan durante al menos 3 minutos, preferiblemente al menos 5 minutos a una temperatura de al menos 90°C, preferiblemente al menos 95°C. Preferiblemente, la muestra calentada se enfría luego a una temperatura inferior a 50°C, más preferiblemente se enfría al menos hasta la temperatura ambiente. En este caso, se descubrió que una etapa de enfriamiento respectivo favorece la formación de precipitados que se componen o que están constituidos respectivamente por contaminantes. La formación eficaz de precipitados y la eliminación/unión de los precipitados al realizar una etapa de aclaramiento como se describe a continuación, proporcionan una muestra lisada restante de la cual se han eliminado los contaminantes de forma eficaz. Si la solución de lisis comprende y/o se usa en combinación con una enzima proteolítica, se prefiere incubar la mezcla de lisis a temperaturas adecuadas para que la enzima proteolítica actúe, por ejemplo, a una temperatura inferior a 70°C, preferiblemente inferior a 65°C, más preferiblemente inferior a 60°C, preferiblemente junto con agitación. Después de dicha incubación, se realiza la etapa de calentamiento a temperaturas más altas. Esa etapa de calentamiento también se denomina en esta memoria lisis por ebullición. Esta secuencia de etapas del procedimiento para lograr una lisis eficaz de la muestra tiene la ventaja de que la muestra se lisa eficazmente y que la enzima proteolítica se desnaturaliza. La solución de lisis descrita es compatible en particular para realizar una reacción de amplificación tal como una PCR, ya que no comprende componentes en una concentración que pudieran inhibir sustancialmente una reacción de amplificación respectiva.

Después de que la muestra se ha puesto en contacto con la composición de lisis, la mezcla resultante se agita preferiblemente para asegurar una mezcla a fondo. La mezcla se puede facilitar con una agitación excéntrica, la introducción de gas, tal como aire, en la mezcla o mediante una agitación magnética como se describirá con más detalle a continuación. De acuerdo con una realización, la solución de lisis comprende al menos una barra de

agitación magnética que se puede emplear para facilitar la mezcla de la muestra cuando se usa un imán para mover la barra de agitación.

Para mejorar el rendimiento del método analítico posterior, en particular cuando se realiza una reacción de amplificación tal como una reacción de PCR, se prefiere aclarar el lisado antes de ponerlo en contacto con la composición seca para la reconstitución. Por lo tanto, de acuerdo con esta realización, la reconstitución de la composición seca implica poner en contacto la composición seca con al menos una porción (alícuota) de la muestra lisada aclarada y mezclar. Existen diversas opciones para aclarar la muestra lisada. Ejemplos no limitativos se describirán a continuación. Además, una etapa de aclaramiento respectiva también es ventajosa para eliminar y/o inactivar contaminantes que están comprendidos en la composición reconstituida. Como se ha descrito anteriormente, en el método de acuerdo con un subaspecto B del método según el primer aspecto, la lisis de la muestra se logra y/o completa después de que la composición seca se haya reconstituido con la mezcla de lisis. Por lo tanto, los contaminantes que se originan, respectivamente, se liberan durante la lisis de la muestra, tales como por ejemplo, proteoglicanos, proteínas y azúcares, se liberan en la composición reconstituida y los contaminantes respectivos pueden formar precipitados en la misma, en particular si se realiza un tratamiento térmico como se ha descrito anteriormente. De acuerdo con una realización, la composición reconstituida respectivamente se aclara antes de realizar el método de análisis. Existen varias opciones para aclarar la composición reconstituida. Ejemplos no limitativos se describirán a continuación.

De acuerdo con una realización, la muestra se pone en contacto antes, durante o después de la lisis con medios para eliminar contaminantes que se originan desde la muestra lisada. De este modo, se puede proporcionar una muestra lisada aclarada o una composición reconstituida aclarada. No todos los contaminantes deben eliminarse. Más bien, solo se tiene que eliminar una cantidad de contaminantes hasta un nivel en donde el método analítico previsto se pueda llevar a cabo adecuadamente y, en particular, proporcione la sensibilidad y/o especificidad necesarias. De acuerdo con una realización, los reactivos químicos se usan para eliminar o inactivar inhibidores del método de análisis posterior. Los compuestos adecuados, tales como polímeros, en particular PVP, ya se describieron anteriormente. Se prefiere añadir estos reactivos antes o durante la lisis para lograr una eliminación eficaz de los contaminantes directamente durante la lisis. Se incorporan preferiblemente en la solución de lisis.

Una fuente importante de contaminaciones, en particular cuando se procesa una muestra que contiene células, es la formación de precipitados durante la lisis. Los precipitados respectivos se forman en particular cuando la muestra se calienta durante la lisis. La transferencia de precipitados desde la muestra lisada al método analítico, como por ejemplo, una reacción de amplificación o una reacción de detección, puede alterar gravemente dicho método de análisis y/o la interpretación de los resultados obtenidos. Por lo tanto, es ventajoso formar complejos con los precipitados respectivos y preferiblemente separar los complejos de la muestra lisada restante, por ejemplo, para proporcionar una muestra lisada aclarada. La separación se puede facilitar, por ejemplo, mediante sedimentación o centrifugación. Los precipitados se pueden sedimentar, por ejemplo, en el fondo del tubo, dejando atrás un material sobrenadante que corresponde al lisado aclarado o la composición reconstituida aclarada, si dicha etapa se realiza para ese fin. La sedimentación se puede acelerar y mejorar, por ejemplo, mediante centrifugación. Sin embargo, se prefiere facilitar la separación de los precipitados. La formación de complejos con los precipitados ya tiene un efecto de aclaramiento, ya que los contaminantes se eliminan de la muestra restante. Sin embargo, se prefiere separar al menos una porción de los contaminantes de la muestra restante.

De acuerdo con una realización, se proporcionan medios antes, durante o después de la lisis para eliminar los precipitados, proporcionando de este modo un lisado aclarado o una composición reconstituida aclarada. El término eliminación, tal y como se usa en esta conjunción, significa que la cantidad de precipitados se reduce al menos hasta el punto en que el método analítico posterior se puede llevar a cabo de forma adecuada. De acuerdo con una realización, al menos una porción del lisado y/o al menos una porción de la composición reconstituida, en donde se ha llevado a cabo la etapa para favorecer o incluso lograr la lisis de la muestra, se hace pasar a través de medios que pueden retener o eliminar los precipitados durante el paso de la muestra lisada o el paso de la composición reconstituida. Se pueden seleccionar medios adecuados a partir del grupo que comprende materiales de filtro, membranas o capas o rellenos de partículas que se unen a precipitados. La muestra lisada o la composición reconstituida pasa a través de dichos medios y los precipitados son atrapados, respectivamente son retenidos por dichos medios, proporcionando de este modo una muestra aclarada una vez que la muestra ha pasado por el filtro. Dichos medios, tales como por ejemplo, un filtro o membrana, pueden ser porosos. Los poros deben ser suficientemente pequeños como para retener de manera eficaz y eliminar de este modo los precipitados que están presentes en la muestra lisada o en la composición reconstituida.

De acuerdo con una realización preferida, la muestra se pone en contacto antes, durante o después de la lisis con al menos un soporte sólido al que se unen los precipitados, formando de este modo un complejo con los precipitados. Por supuesto, también se puede formar más de un complejo, por ejemplo, cuando se usan partículas tales como perlas como soporte sólido. Por lo tanto, el término "complejo" tal y como se usa en el presente documento, también se refiere a una pluralidad de complejos. La unión al soporte sólido preferiblemente no es específica y se logra mediante adsorción. El complejo se separa preferiblemente del lisado restante, respectivamente de la composición reconstituida restante, proporcionando de ese modo un lisado aclarado. La separación del complejo se puede facilitar por sedimentación, centrifugación o separación magnética si se utiliza un soporte sólido magnético. Por ejemplo, el complejo se puede concentrar en el fondo del recipiente y se puede obtener el material sobrenadante,

que corresponde a la muestra lisada aclarada. La unión de los precipitados al soporte sólido ayuda a la sedimentación del complejo y, por lo tanto, facilita la eliminación de los precipitados desde la muestra restante. Sin embargo, como se muestra en los ejemplos, la adición del soporte sólido también es beneficiosa y proporciona un efecto de aclaramiento porque se reduce el efecto inhibitorio de los contaminantes comprendidos tales como los precipitados, si los complejos no se eliminan sino que están presentes por ello durante el método analítico. Aparentemente, la formación de complejos con los precipitados al unirlos al soporte sólido, ya proporciona un efecto beneficioso porque los precipitados unidos no son accesibles y, por lo tanto, están inactivos.

De acuerdo con una realización, el soporte sólido se selecciona a partir del grupo que consiste en partículas, placas y otras partículas. De acuerdo con una realización, el soporte sólido comprende una superficie que se une a contaminantes, en particular precipitados, que están presentes en el lisado o la composición reconstituida. El término "unión" se usa en un sentido amplio y se refiere a cualquier interacción de los contaminantes, en particular los precipitados con el soporte sólido que permite eliminar al menos una porción de dichos contaminantes junto con el soporte sólido. La unión se consigue preferiblemente mediante adsorción.

De acuerdo con una realización, las partículas minerales que comprenden o consisten en óxidos metálicos se usan como soporte sólido para aclarar la muestra lisada o para aclarar la composición reconstituida. Ejemplos de soportes sólidos adecuados incluyen, pero no se limitan a, soportes sólidos que tienen una superficie de sílice, tal como por ejemplo, partículas de sílice o partículas de vidrio y soportes poliméricos. De acuerdo con una realización, el soporte sólido tiene una superficie adsorbente de óxido silíceo hidratado. Sin embargo, el soporte sólido también puede comprender uno o varios ligandos para proporcionar una superficie adecuada para unir el precipitado o para mejorar la unión de los precipitados. De acuerdo con una realización, los ligandos se seleccionan a partir del grupo que consiste en grupos de intercambio iónico, preferiblemente a partir del grupo de grupos de intercambio catiónico tales como grupos carboxilo, grupos sulfonato y ligandos de silano. También se pueden usar combinaciones de ligandos respectivos. El soporte sólido puede comprender adicional o alternativamente ligandos o compuestos en su superficie que se unen a inhibidores del método de análisis posteriormente, por ejemplo, inhibidores de una reacción de amplificación. Ejemplos adecuados se han descrito anteriormente. Preferiblemente, el soporte sólido tiene una superficie que comprende grupos carboxilo.

Los soportes sólidos ejemplares que proporcionan una superficie que son adecuados para eliminar precipitados desde la muestra lisada, incluyen pequeñas esferas, también conocidas como perlas o partículas, por ejemplo a base de vidrio, sílice, polímeros o materiales recubiertos. En una realización especialmente preferida, el soporte sólido tal como las partículas, es magnético. Sin embargo, también se describe modificar, por ejemplo, la superficie interna del consumible que se usa para recibir la muestra, como, por ejemplo, un recipiente. Si al menos una porción de la pared interna del recipiente que está en contacto con la muestra comprende ligandos respectivos, los precipitados se pueden unir, preferiblemente adsorber, a dicha superficie y de ese modo quedar inmovilizados sobre la pared del recipiente. Esto permite recuperar una muestra lisada aclarada, por ejemplo, como material sobrenadante, en donde se reduce la cantidad de precipitados.

La unión de contaminantes, tales como en particular precipitados, al soporte sólido, respectivamente la superficie proporcionada para que se unan dichos contaminantes, se produce en condiciones en las que los contaminantes se unen al soporte sólido pero en las que las biomoléculas de interés no se unen o se unen en menor medida que la biomolécula de interés. Por lo tanto, las condiciones de lisis utilizadas son selectivas porque predominantemente los contaminantes tales como, en particular, los precipitados se unen, preferiblemente se adsorben, al soporte sólido, respectivamente a la superficie, pero en donde no hay una unión sustancial de las biomoléculas de interés, de modo que permanecen en una cantidad suficiente en la muestra lisada o en la composición reconstituida para permitir realizar el método analítico previsto.

Preferiblemente, el soporte sólido al que se une el precipitado está comprendido en la solución de lisis. De este modo, se garantiza que cualquier precipitado que se forme tras la lisis de la muestra, se una directamente al soporte sólido después de su formación, formando de este modo un complejo. De este modo, los precipitados se agotan en la muestra restante. La realización de la lisis en presencia del soporte sólido que se utiliza para eliminar contaminantes como los precipitados, mejora el resultado del aclaramiento alcanzado. Esto probablemente debido a que los precipitados se pueden unir directamente durante su formación. Esto es independientemente de si la lisis se logra antes de la reconstitución de la composición seca, o después.

De acuerdo con una realización, el soporte sólido comprende o es un tamiz molecular. Un tamiz molecular es un material que contiene poros pequeños de un tamaño preciso y uniforme que se puede usar como adsorbente. Preferiblemente, el tamiz molecular comprende minerales de silicato de aluminio, arcillas, vidrios porosos, carbones microporosos, zeolitas, carbones activos o compuestos sintéticos que tienen estructuras abiertas a través de las cuales pueden difundir moléculas pequeñas, como el agua. Como se muestra en los ejemplos, los tamices moleculares tales como las zeolitas, son particularmente efectivos para eliminar contaminantes, tales como los precipitados de una muestra lisada. El tamiz molecular se puede añadir a la composición de lisis que es preferiblemente una solución de lisis. También se pueden usar además de los soportes sólidos descritos anteriormente.

Cuando se procesan muestras ácidas, tales como muestras de una torunda vaginal, utilizando un tamiz molecular

como una zeolita como soporte sólido, se tiene la ventaja específica de que las zeolitas son capaces de elevar el valor del pH de la muestra lisada y/o de la mezcla de lisis. Esto es beneficioso ya que muchos métodos de análisis, como por ejemplo las reacciones de amplificación, no funcionan correctamente con valores de pH ácidos. Las sustancias tamponadoras que a menudo están comprendidas en la composición seca que comprende los reactivos necesarios para realizar la reacción de amplificación, frecuentemente no son capaces de mantener el valor del pH de la composición reconstituida en el intervalo de pH deseado, respectivamente necesario, debido a la cantidad de muestra lisada ácida, respectivamente, la mezcla de lisis ácida que se añade para la reconstitución. Este problema se puede superar cuando se incorporan zeolitas durante la preparación de la mezcla de lisis y, en particular, durante la preparación de un lisado aclarado. Por ejemplo, la adición de zeolitas permite elevar el valor del pH desde un valor de pH ácido a un valor de pH entre 7 y 9,5, preferiblemente de 7,5 a 9, lo que mejora adicionalmente el rendimiento del método analítico que requiere un valor de pH en un intervalo respectivo, tal como por ejemplo, una reacción de amplificación, en particular una PCR. Por lo tanto, de acuerdo con una realización, se añade al menos un tipo de soporte sólido antes, durante o después de la lisis, lo que tiene el efecto de que el valor del pH de la muestra lisada se eleve. Esta realización es particularmente adecuada cuando se procesan muestras ácidas que tienen un pH inferior a 7, inferior a 6,5, inferior a 6, inferior a 5,5, inferior a 5 o inferior a 4,5. Preferiblemente, para este fin se usa un tamiz molecular, más preferidas son las zeolitas. El tamiz molecular también se puede añadir además de otros soportes sólidos que se unen a precipitados, tales como partículas carboxiladas.

Tal y como se ha descrito anteriormente, el soporte sólido es preferiblemente magnético. Preferiblemente, el soporte sólido se incorpora en la composición de lisis, preferiblemente la solución de lisis. Cuando se usan partículas magnéticas como soporte sólido junto con una barra de agitación magnética, la agitación durante la lisis se puede lograr de manera muy efectiva. Dicho método se puede corresponder entonces con el descrito en el documento DE102007045474, incorporado en esta memoria como referencia. De acuerdo con una realización, la solución de lisis comprende una multiplicidad de partículas magnéticas como soporte sólido, así como al menos un elemento central magnético y/o magnetizable, que preferiblemente está configurado en forma de varilla, mancuerna y/o elipsoide, el cual se usa como barra de agitación. El elemento central magnético y/o magnetizable es más grande que la multiplicidad de las partículas magnéticas. Las partículas magnéticas se distribuyen en la solución de lisis que se mezcla con la muestra. Posteriormente se acumulan en al menos un elemento central. La agitación y/o la mezcla usando el material magnético se realiza mediante el uso de al menos un imán externo, por ejemplo, un imán permanente o electroimán, que está configurado para interactuar con el material magnético. Como partículas magnéticas, se emplea preferiblemente un soporte sólido magnético como se ha descrito anteriormente, porque las partículas magnéticas respectivas proporcionan adicionalmente un efecto de aclaramiento beneficioso.

De acuerdo con una realización, la etapa de aclaramiento implica adicional o alternativamente el uso de al menos un compuesto o una composición que se une y/o neutraliza uno o varios inhibidores del método de análisis posterior, en particular inhibidores de una reacción de amplificación. Preferiblemente, dicho compuesto o composición está comprendido en la solución de lisis que se añade a la muestra para la lisis.

En una realización preferida, la lisis y la reconstitución de la muestra se logran mediante las siguientes etapas:

(i) poner en contacto la muestra con una solución de lisis como se ha descrito anteriormente y un soporte sólido para eliminar los precipitados, formando de este modo una mezcla de lisis; preferiblemente, la mezcla se agita, preferiblemente se agita vorticialmente para proporcionar una mezcla homogénea;

(ii) calentar la mezcla a una temperatura de al menos 50°C, al menos 60°C, al menos 70°C, al menos 80°C, preferiblemente al menos 90°C, más preferiblemente al menos 95°C; esta etapa de calentamiento favorece o completa la lisis de la muestra;

(iii) opcionalmente enfriar la muestra lisada a una temperatura inferior a 50°C, preferiblemente a temperatura ambiente;

(iv) aclarar la muestra lisada separando los complejos que comprenden el soporte sólido y los precipitados formados; y

(v) usar el lisado aclarado para reconstituir la composición seca.

Los precipitados se forman en particular debido a, respectivamente, durante el proceso de calentamiento. Incorporar el soporte sólido directamente en la mezcla de lisis, por ejemplo, al añadirlo a la solución de lisis, tiene la ventaja de que los precipitados se pueden unir, por ejemplo, adsorber, directamente al soporte sólido tras la formación y/o la liberación. La etapa de enfriamiento opcional (iii) favorece la formación de precipitados y, por lo tanto, mejora el aclaramiento del lisado. Para asegurar que los precipitados se eliminan de forma eficaz uniéndolos al soporte sólido, la mezcla de lisis se agita preferiblemente, por ejemplo, mediante agitación magnética. Esto aumenta la posibilidad de que contaminantes, tales como los precipitados entren en contacto con el soporte sólido y, en consecuencia, formen un complejo junto con el cual se pueden separar fácilmente. Para facilitar la agitación, se puede incorporar una barra de agitación magnética en la mezcla de lisis. Una barra de agitación magnética respectiva preferiblemente ya está incorporada en la solución de lisis. Esta realización es simple y fácil de usar para el consumidor, porque un recipiente de recogida de muestras puede estar previamente equipado con una composición de lisis tal como la

composición de lisis descrita anteriormente y una barra de agitación magnética.

En una realización adicional, la lisis y la reconstitución de la muestra se logran mediante las siguientes etapas:

(i) poner en contacto la muestra con una solución de lisis y un soporte sólido para eliminar los contaminantes, preferiblemente precipitados, formando de este modo una mezcla de lisis;

5 (ii) usar la mezcla de lisis para reconstituir la composición seca;

(iii) calentar la composición reconstituida a una temperatura de al menos 90°C, preferiblemente al menos 95°C para lograr o completar la lisis de la muestra;

10 (iv) opcionalmente enfriar la composición reconstituida que comprende la muestra lisada hasta una temperatura inferior a 50°C; como se ha descrito anteriormente, esta etapa de enfriamiento opcional ayuda a la formación de precipitados y, por lo tanto, al aclaramiento y

(v) aclarar la composición reconstituida separando el complejo formado que comprende el soporte sólido y los precipitados, proporcionando de ese modo una composición reconstituida aclarada.

15 En este caso, se logra la lisis, respectivamente completada después de que la composición seca ya se haya reconstituido. Esto puede ahorrar tiempo, en particular cuando se pretende realizar una reacción de PCR de arranque en caliente. La etapa de calentamiento realizada en (iii) ya activa la polimerasa de arranque en caliente, haciendo que sea obsoleta una etapa de calentamiento adicional para activar la duración de la PCR real.

En una realización adicional, la lisis y la reconstitución de la muestra se logran mediante las siguientes etapas:

(i) poner en contacto la muestra con una solución de lisis y un soporte sólido para eliminar contaminantes, preferiblemente precipitados, formando de este modo una mezcla de lisis;

20 (ii) usar la mezcla de lisis para reconstituir la composición seca;

(iii) someter la composición reconstituida a una reacción de amplificación que comprende al menos una etapa de calentamiento que implica una temperatura de al menos 90°C, preferiblemente al menos 95°C, preferiblemente durante al menos 3 minutos, más preferiblemente al menos 5 minutos.

25 Este método es muy rápido y también conduce a resultados aceptables, dependiendo de la muestra procesada. Aquí, también se usa la mezcla de lisis para la reconstitución de la composición seca. Sin embargo, la lisis de la muestra se logra o se completa durante la reacción de amplificación, por ejemplo, durante el calentamiento inicial de la muestra, por ejemplo, una etapa de calentamiento que se realiza para activar la enzima, por ejemplo, para realizar un arranque en caliente. De acuerdo con esta realización, los complejos que comprenden el soporte sólido y los contaminantes, como en particular los precipitados, pueden permanecer en la composición reconstituida y no están separados. Como se muestra en los ejemplos, esta realización también funciona con ciertas muestras y tiene la ventaja de que otras etapas del procedimiento se vuelven obsoletas. Por lo tanto, ya la presencia del soporte sólido respectivo proporciona una mejora significativa, incluso si los complejos no se eliminan de la composición reconstituida. Sin embargo, según una realización, el soporte sólido se separa de la muestra restante, en este caso la composición reconstituida, una vez que los precipitados se han unido.

35 La composición seca comprende uno o varios reactivos necesarios para realizar el método de análisis previsto. Preferiblemente, la composición seca comprende al menos una proteína, preferiblemente una enzima. Qué reactivos se encuentran en la composición seca depende de la biomolécula que se va a analizar, por ejemplo, detectar y el método de análisis previsto. Ejemplos adecuados se describen a continuación.

40 De acuerdo con una realización, la composición seca es una composición liofilizada. Las composiciones liofilizadas se usan ampliamente para proporcionar reactivos necesarios para métodos analíticos en una forma almacenable. Las composiciones liofilizadas respectivas se usan en particular en el campo de la biotecnología, con el fin de proporcionar los reactivos necesarios para el método de análisis previsto, en una forma preparada y, por tanto, fácil de manejar. Las respectivas composiciones liofilizadas comprenden frecuentemente al menos un producto biológico, por ejemplo, seleccionado a partir del grupo que comprende ácidos nucleicos tales como oligonucleótidos, proteínas, anticuerpos, enzimas y similares. Los métodos para preparar las respectivas composiciones liofilizadas, así como los aditivos adecuados que estabilizan las composiciones de reacción comprendidas, en particular componentes bioquímicos tales como proteínas, son bien conocidos en la técnica anterior (véase, por ejemplo, Freeze-Drying/Lyophilization of Pharmaceutical and Biological Products, segunda edición, documentos WO 01/92569, WO 2010/001162, US 2010/0068716 y US 2010/0159529) y, por lo tanto, no necesita una descripción detallada esta memoria. La composición seca que se usa en el presente método es una composición almacenable. Preferiblemente, es adecuada para un almacenamiento a largo plazo. De acuerdo con una realización, la composición seca es estable durante el almacenamiento durante un período de tiempo de al menos 3 meses, al menos 6 meses, al menos 10 meses o al menos 12 meses. Preferiblemente, la composición seca es estable durante un período de tiempo de 3 a 18 meses o de 6 a 12 meses. De acuerdo con una realización, la composición seca

comprende al menos algunos de los reactivos químicos y/o bioquímicos necesarios para llevar a cabo el método de análisis previsto. Preferiblemente, comprende todos los reactivos necesarios porque después de la adición de la muestra lisada, preferiblemente la muestra lisada aclarada, la composición está lista para realizar el método analítico. Esto es particularmente ventajoso cuando se utiliza el método, por ejemplo, en un sistema LoC como se describirá a continuación. De acuerdo con una realización preferida, la composición seca comprende al menos algunos, preferiblemente todos, los reactivos necesarios para llevar a cabo una reacción de amplificación, preferiblemente una reacción de PCR. Como se ha descrito anteriormente, las respectivas composiciones secas, en particular las composiciones liofilizadas, se usan ampliamente para proporcionar los reactivos necesarios para una reacción de amplificación en forma de una denominada mezcla maestra, en una forma almacenable. Cuando se pretende realizar la reacción de amplificación, la composición seca solo necesita ser reconstituida usando la muestra lisada para formar la mezcla de reacción de amplificación, en donde, sin embargo, opcionalmente se pueden añadir reactivos adicionales, por ejemplo, si no estaban comprendidos ya todos los reactivos en la composición seca, lo que se prefiere sin embargo. Cuando se desea realizar una reacción de amplificación como, por ejemplo, una reacción de PCR, la composición seca comprende uno o varios, preferiblemente todos los reactivos seleccionados a partir del grupo que consiste en una polimerasa, un tampón de reacción adecuado para realizar una reacción de amplificación y dNTPs. Preferiblemente, también comprende cebadores y/o sondas marcadas que permiten, por ejemplo, la detección de la presencia o ausencia de uno o varios ácidos nucleicos diana que son, por ejemplo, indicativos de una determinada enfermedad o infección. Aditivos adicionales tales como enzimas y sales también pueden estar comprendidos. Además, la composición seca puede comprender un material magnético para ayudar al procedimiento de reconstitución, permitiendo la mezcla de la composición durante la reconstitución con la ayuda de un imán. Después de la reconstitución utilizando la muestra lisada, preferiblemente la muestra lisada aclarada, y opcionalmente la adición de aditivos adicionales, la composición reconstituida resultante está lista para realizar el método analítico deseado, por ejemplo, efectuar la amplificación de un ácido nucleico diana en el caso de que se proporcione una composición seca adecuada para uso en una amplificación, por ejemplo, una reacción de PCR. De acuerdo con una realización, la composición seca comprende reactivos adecuados para uso en un método analítico en donde dicho método analítico puede ser cualquier método químico y/o biotecnológico que se puede emplear para analizar una muestra que comprende una biomolécula de interés. Ejemplos de métodos analíticos se describen a continuación.

De acuerdo con una realización, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95% o 100% del líquido que se usa para la reconstitución está proporcionado por la muestra lisada, que preferiblemente es una muestra lisada aclarada, o la mezcla de lisis. La reconstitución se puede lograr de forma ventajosa, exclusivamente mediante la adición de la muestra lisada, que preferiblemente es la muestra lisada aclarada, o la mezcla de lisis. De acuerdo con una realización, al menos una alícuota del lisado aclarado que se había obtenido como se ha descrito anteriormente, se pone en contacto con la composición seca para reconstituir la composición seca. Con el fin de asegurar que la composición reconstituida comprende los reactivos en una concentración apropiada para el método de análisis pretendido, se añade una cantidad predeterminada de muestra lisada o mezcla de lisis a la composición seca. Dicha cantidad predeterminada se elige de tal manera que en la composición reconstituida, los reactivos están comprendidos en la misma en una concentración adecuada para realizar el método de análisis previsto, por ejemplo, una reacción de amplificación. El procedimiento de reconstitución se puede facilitar mediante agitación, por ejemplo, pipeteando la mezcla resultante hacia arriba y hacia abajo, agitando, sacudiendo o agitando vorticialmente. De acuerdo con una realización, la mezcla se logra usando un imán. De este modo, de acuerdo con una realización, un material magnético está comprendido en la composición seca. Dicho material magnético permite agitar y/o mezclar la composición durante y/o después de la reconstitución con la ayuda de un imán. Preferiblemente, el material magnético se incorpora en la composición antes de que se seque, preferiblemente liofilice, para proporcionar la composición seca. De ese modo, el material magnético se incorpora en la composición seca y se puede usar para facilitar el procedimiento de reconstitución. De acuerdo con una realización preferida, el material magnético es una pieza o una pluralidad de piezas de una lámina magnética. Un método adicional que se puede emplear es, por ejemplo, el descrito en el documento DE102007045474, incorporado en esta memoria como referencia. De acuerdo con una realización, la composición seca comprende una multiplicidad de partículas magnéticas, así como al menos un elemento central magnético y/o magnetizable, que preferiblemente está configurado en forma de varilla, mancuerna y/o elipsoide. El elemento central magnético y/o magnetizable es más grande que la multiplicidad de las partículas magnéticas. Preferiblemente, esos elementos se incorporan a la composición antes de que se seque, preferiblemente se liofilice. La composición que se había puesto en contacto para la reconstitución con un líquido comprende una multiplicidad de las primeras partículas magnéticas, así como al menos un elemento central, que preferiblemente está configurado en forma de varilla, mancuerna y/o elipsoide. Las partículas magnéticas se distribuyen en el líquido y posteriormente se acumulan en al menos un elemento central. La agitación y/o la mezcla usando el material magnético se facilita mediante el uso de al menos un imán externo, por ejemplo, un imán permanente o electroimán, que está configurado para interactuar con el material magnético. La agitación de la composición reconstituida también puede ser ventajosa durante la realización de la reacción o las reacciones que se realizan en la cámara de reacción. Por ejemplo, si se realiza una reacción que comprende una etapa de calentamiento, tal como en una amplificación con PCR, la agitación, preferiblemente a intervalos, tiene el efecto de favorecer que el calor se distribuya más rápido y de forma más uniforme. El material magnético puede comprender o consistir en un material seleccionado a partir del grupo materiales paramagnéticos, materiales superparamagnéticos, materiales ferromagnéticos, materiales ferrimagnéticos y mezclas de los mismos.

De acuerdo con una realización, la composición seca comprende un soporte sólido para aclarar una muestra como se ha descrito anteriormente. Preferiblemente, las partículas carboxiladas están comprendidas en la composición seca. De acuerdo con una realización, una composición seca respectiva se pone en contacto con la mezcla de lisis que comprende la muestra y una solución de lisis como se ha descrito anteriormente. Esta realización tiene la ventaja de que la composición seca proporciona un soporte sólido que es adecuado para aclarar la composición reconstituida, uniendo los contaminantes, tales como los precipitados, formando de este modo complejos que comprenden el soporte sólido y los contaminantes. Como se ha descrito anteriormente, dichos complejos se eliminan opcional pero preferiblemente antes de realizar el método de análisis, como por ejemplo, la reacción de amplificación.

- 10 El término "biomolécula" o "biomoléculas" tal y como se usa en este documento, se refiere en particular a ácidos nucleicos y polipéptidos y preferiblemente se refiere a ácidos nucleicos. Otras biomoléculas incluyen metabolitos.

La expresión "ácido nucleico" o "ácidos nucleicos" tal y como se usa en este documento, se refiere en particular a un polímero que comprende ribonucleósidos y/o desoxirribonucleósidos que están unidos covalentemente, típicamente mediante enlaces fosfodiéster entre subunidades, pero en algunos casos mediante fosforotioatos, metilfosfonatos y similares. Los ácidos nucleicos incluyen, pero no se limitan a, todos los tipos de ADN y/o ARN, por ejemplo, ADNg; ADN circular; ADN plasmídico; ADN circulante; PNA; LNA, ácidos nucleicos de ciclohexeno; híbridos de ARN/ADN; hnARN; ARNm; ARN no codificante (ARNnc), que incluye pero no se limita a ARNr, ARNt, ARNmi (micro ARN), ARNsi (ARN interferente pequeño), ARNsno (ARN nucleolar pequeño), ARNsn (ARN nuclear pequeño), ARN que interacciona con pwi (ARNpi), ARN asociado a repeticiones (ARNrasi), como ARN y ARNst (ARN temporal pequeño); ácido nucleico fragmentado; ácido nucleico obtenido a partir de orgánulos subcelulares tales como mitocondrias o cloroplastos; y ácido nucleico obtenido a partir de agentes patógenos, microorganismos, parásitos o virus de ADN o ARN que pueden estar presentes en una muestra biológica, por ejemplo, ácidos nucleicos bacterianos, virales o fúngicos; ácidos nucleicos sintéticos, ácidos nucleicos extracelulares. La expresión "ácidos nucleicos extracelulares" o "ácido nucleico extracelular" tal y como se usa en este documento, se refiere en particular a ácidos nucleicos que no están contenidos en las células. Los respectivos ácidos nucleicos extracelulares también se denominan frecuentemente ácidos nucleicos sin células. Estas expresiones se usan como sinónimos en este documento. La expresión "ácidos nucleicos extracelulares" se refiere, por ejemplo, a un ARN extracelular así como a un ADN extracelular. Ejemplos de ácidos nucleicos extracelulares típicos que se encuentran en la fracción exenta de células (porción respectivamente) de muestras biológicas tales como fluidos corporales, tales como por ejemplo, el plasma sanguíneo incluyen, pero no se limitan a, ácidos nucleicos extracelulares de mamíferos tales como, por ejemplo, ADN y/o ARN extracelular asociado a un tumor o derivado de un tumor, otro ADN y/o ARN relacionado con una enfermedad extracelular, ADN modificado epigenéticamente, ADN y/o ARN fetal, ARN interferente pequeño como por ejemplo, ARNmi y ARNsi, y ácidos nucleicos extracelulares de no mamíferos, tales como por ejemplo, ácidos nucleicos víricos, ácidos nucleicos de agentes patógenos liberados en la población extracelular de ácidos nucleicos, por ejemplo, de procariotas (por ejemplo, bacterias), virus u hongos.

El término "polipéptido", tal y como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula que comprende un polímero de aminoácidos unidos entre sí por un enlace o unos enlaces peptídicos. Los polipéptidos incluyen polipéptidos de cualquier longitud, incluidas proteínas (por ejemplo, que tienen más de 50 aminoácidos) y péptidos (por ejemplo, 2 - 49 aminoácidos). Los polipéptidos incluyen proteínas y/o péptidos con cualquier actividad o bioactividad, incluyendo, por ejemplo, polipéptidos bioactivos tales como proteínas o péptidos enzimáticos, proteínas o péptidos receptores, proteínas o péptidos transportadores, proteínas bactericidas y/o que se unen a endotoxinas, proteínas o péptidos estructurales, polipéptidos inmunes, toxinas, antibióticos, hormonas, factores de crecimiento, vacunas y similares. Dicho polipéptido se puede seleccionar a partir del grupo que consiste en hormonas peptídicas, interleucinas, activadores de plasminógeno tisular, citocinas, inmunoglobulinas, en particular anticuerpos o fragmentos de anticuerpos o variantes de los mismos. También se incluyen polipéptidos modificados tales como por ejemplo, polipéptidos glicosilados.

El método analítico puede ser cualquier método químico y/o biotecnológico que se pueda usar para analizar una muestra que comprende una biomolécula de interés y, en particular, que se pueda usar para analizar una o varias biomoléculas de interés comprendidas en la muestra, por ejemplo, para amplificar, identificar, detectar y/o cuantificar una biomolécula de interés. Preferiblemente, el método analítico comprende una reacción de detección que permite detectar la presencia, ausencia y/o cantidad de al menos una biomolécula comprendida en la muestra lisada. Preferiblemente, dicho método comprende la amplificación de al menos un ácido nucleico diana y la detección posterior del amplicón generado usando, por ejemplo, sondas marcadas. Los métodos analíticos respectivos son bien conocidos en la técnica anterior y también se aplican comúnmente en el campo médico, de diagnóstico y/o pronóstico para analizar una biomolécula, tal como ácidos nucleicos o un ácido nucleico específico comprendido en una muestra. Por lo tanto, el método analítico puede comprender un análisis de las biomoléculas comprendidas en la muestra lisada para identificar la presencia, ausencia y/o gravedad de un estado de enfermedad que incluye, pero no se limita a una multitud de enfermedades neoplásicas, en particular premalignas y malignas tales como diferentes formas de cánceres. Por ejemplo, la muestra lisada se puede analizar para detectar marcadores de diagnóstico y/o pronóstico (p. ej., ácidos nucleicos obtenidos a partir de tumores o fetales) en muchos campos de aplicación, que incluyen, pero no se limitan a, pruebas genéticas prenatales no invasivas, respectivamente escrutinio, detección de enfermedades, oncología, detección de cáncer, detección de cáncer en un estadio temprano, vigilancia de una terapia contra el cáncer, prueba genética (genotipado), prueba de enfermedades infecciosas, prueba de agentes

patógenos, diagnósticos de lesiones, diagnósticos de traumas, medicina de trasplante u otras muchas enfermedades y, por lo tanto, tienen relevancia para el diagnóstico y/o pronóstico.

Cuando la biomolécula de interés es un ácido nucleico, el análisis se puede realizar utilizando cualquier método de análisis de ácido nucleico que incluye, pero no se limita a, tecnologías de identificación, tecnologías de amplificación, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), amplificación isotérmica, reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR), reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qPCR), detección de fluorescencia, ensayos de hibridación, secuenciación de ADN o ARN, análisis de restricción, transcripción inversa, NASBA, LAMP (amplificación isotérmica mediada por bucle), RPA (amplificación con polimerasa recombinasa), tHDA (amplificación dependiente de la hélice), NEAR (reacción de amplificación con enzima de corte), TMA (amplificación mediada por transcripción) y NASBA (amplificación basada en la secuencia de ácidos nucleicos), reacción en cadena de la polimerasa específica de alelo, ensamblaje mediante ciclación con polimerasa (PCA), reacción en cadena de la polimerasa asimétrica, lineal después de la reacción en cadena de la polimerasa exponencial (LATE-PCR), amplificación dependiente de helicasa (HDA), reacción en cadena de la polimerasa de inicio en caliente, reacción en cadena de la polimerasa específica de intersecuencias (ISSR), reacción en cadena de la polimerasa inversa, reacción en cadena de la polimerasa mediada por ligación, reacción en cadena de la polimerasa específica de metilación (MSP), reacción en cadena de la polimerasa múltiple, reacción en cadena de la polimerasa anidada, reacción en cadena de la polimerasa en fase sólida, tecnologías de detección que usan cebadores y/o sondas marcados, preferiblemente marcados con fluorescencia, o cualquier combinación de los anteriores. Las respectivas tecnologías son bien conocidas por los expertos y, por lo tanto, no necesitan una descripción más detallada en este documento. Preferiblemente, el método analítico es un método de amplificación de ácidos nucleicos.

Otros métodos analíticos incluyen, por ejemplo, la detección de la presencia, ausencia y/o cantidad de un polipéptido, utilizando por ejemplo, anticuerpos marcados u otras moléculas de unión marcadas adecuadas que se unen a la biomolécula de interés. Los reactivos respectivos también se pueden proporcionar en forma de una composición seca, tal como una composición liofilizada.

El término "muestra" se usa en esta memoria en un sentido amplio y se entiende que incluye fuentes que contienen biomoléculas, en particular ácidos nucleicos y proteínas. Las muestras ejemplares incluyen, pero no se limitan a, muestras biológicas tales como fluidos corporales en general, sangre completa, suero, plasma, glóbulos rojos, glóbulos blancos, capa leucocitaria; torundas, que incluyen pero no se limitan a, torundas bucales, torundas de garganta, torundas vaginales, torundas uretrales, torundas cervicales, torundas de garganta, torundas rectales, torundas de lesiones, torundas de abscesos, torundas nasofaríngeas, torundas anales, orina, esputo, saliva, semen, líquido linfático, fluido, líquido amniótico, líquido cefalorraquídeo, derrames peritoneales, heces, derrames pleurales, líquido de quistes, líquido sinovial, humor vítreo; humor acuoso, líquido de la bursa, lavados oculares, aspirados oculares, lavado pulmonar, aspirados pulmonares, tejidos, que incluyen pero no se limitan a, hígado, bazo, riñón, pulmón, intestino, cerebro, corazón, músculo, páncreas y cultivos celulares, bacterias, microorganismos, virus, plantas, hongos, incluidas muestras que se obtienen a partir de los anteriores o comprenden los anteriores. Los materiales obtenidos a partir de entornos clínicos o forenses o muestras ambientales como el suelo, que contienen o se sospecha que contienen ácidos nucleicos, también están dentro del significado previsto del término muestra. Además, el experto en la materia apreciará que los extractos, o materiales o porciones de los mismos obtenidos a partir de cualquiera de las muestras ejemplares anteriores, también están dentro del alcance del término muestra. Preferiblemente, la muestra se obtiene a partir de un ser humano, un animal, una planta, una bacteria o un hongo. Preferiblemente, la muestra se selecciona a partir del grupo que consiste en células, tejidos, bacterias, virus y fluidos corporales tales como por ejemplo, sangre, productos sanguíneos tales como capa leucocitaria, plasma y suero, orina, fluido, esputo, heces, LCR y esperma, torundas epiteliales, torundas vaginales, muestras de cuello uterino, biopsias, muestras de médula ósea y muestras de tejido, preferiblemente muestras de tejido orgánico como pulmón e hígado. La muestra puede estar estabilizada. Ciertas muestras, como las muestras de sangre, generalmente se estabilizan después de la recogida, por ejemplo, poniéndolas en contacto con un agente estabilizador tal como un anticoagulante en el caso de la sangre y muestras obtenidas a partir de la sangre.

El presente método no requiere una etapa en donde las biomoléculas de interés se aíslan de la muestra lisada, por ejemplo, uniéndolas a una fase sólida y/o precipitándolas para purificarlas antes de ponerlas en contacto con la composición seca. Por el contrario, los contaminantes que podrían interferir con el método de análisis previsto, como por ejemplo, los precipitados se eliminan, se inactivan respectivamente aclarando la muestra lisada y/o la composición reconstituida que se había reconstituido con la mezcla de lisis y tratado para inducir o completar la lisis de la muestra comprendida, tal y como se ha descrito anteriormente. Esta etapa de aclaramiento asegura que el método de análisis se pueda realizar de manera eficaz, incluso si una gran cantidad de la muestra lisada, que preferiblemente es una muestra lisada aclarada, o la mezcla de lisis, se usa directamente para la reconstitución de la composición seca que comprende reactivos para realizar un método analítico. Por lo tanto, por ejemplo, el método de análisis se puede llevar a cabo justo después de la lisis (y el aclarado opcional) y la reconstitución de la composición seca utilizando la muestra lisada, sin tener la necesidad de realizar una purificación de las biomoléculas entre la lisis y la reconstitución, y sin tener la necesidad de reconstituir la composición seca antes de añadir la muestra lisada, ya que la muestra lisada se usa directamente para la reconstitución. Consideraciones similares se aplican al reconstituir la composición seca con la mezcla de lisis primero y luego logrando o completando la lisis en la composición reconstituida, por ejemplo, realizando una etapa de calentamiento. Por lo tanto, el método es

particularmente adecuado para uso en cartuchos de procesamiento, por ejemplo, en sistemas LoC, para reconstituir una composición seca que está comprendida en la cámara de reacción de un cartucho de procesamiento.

El término "solución" tal y como se usa en el presente documento, por ejemplo, como una solución de lisis, se refiere en particular a una composición líquida, preferiblemente una composición acuosa. Puede ser una mezcla homogénea de solo una fase, pero también está dentro del alcance de la presente invención que una solución que se usa de acuerdo con la presente invención comprenda componentes sólidos tales como por ejemplo, precipitados.

De acuerdo con un segundo aspecto, la presente descripción se refiere al uso de una muestra lisada, preferiblemente una muestra lisada aclarada, o una muestra mezclada con una solución de lisis para reconstituir una composición seca que comprende reactivos para llevar a cabo un método analítico mediante la adición de la muestra lisada o la muestra mezclada con la solución de lisis, a la composición seca y mezclar.

Los detalles con respecto a la reconstitución, los reactivos comprendidos en la composición seca, el método analítico, la preparación de la muestra lisada, la preparación de la muestra reconstituida y la etapa de aclaramiento, se han descrito anteriormente junto con el primer aspecto. Para evitar repeticiones, se hace referencia a la descripción respectiva que también se aplica al segundo aspecto. Como se ha descrito anteriormente, los presentes inventores han encontrado que es posible reconstituir una composición seca que comprende reactivos para llevar a cabo un método analítico, tal como por ejemplo, un método de amplificación añadiendo al menos una alícuota de una muestra lisada, preferiblemente de la muestra lisada aclarada, o una mezcla de lisis a la composición seca y mezclar. Como se ha descrito anteriormente, no es necesario añadir soluciones adicionales, tales como una solución de reconstitución. Además, las biomoléculas tales como por ejemplo, ácidos nucleicos no se purifican antes de la reconstitución. En cambio, preferiblemente, la reconstitución se logra exclusivamente mediante la adición de la muestra lisada, la muestra lisada aclarada o la mezcla de lisis. De este modo, se proporciona una composición reconstituida que es adecuada para realizar el método analítico. El procedimiento de reconstitución se simplifica considerablemente ya que se omite la adición de un líquido distinto para la reconstitución. Esto hace que el método sea particularmente útil para su uso en sistemas LoC, ya que este método permite utilizar un diseño de cartucho mucho más simple, tal y como se describirá a continuación. De acuerdo con una realización, el uso implica llevar a cabo un método analítico usando la composición reconstituida. Los detalles con respecto al método analítico que se puede realizar y las realizaciones preferidas se han descrito anteriormente junto con el primer aspecto. Para evitar repeticiones, se hace referencia a la descripción respectiva que también se aplica al segundo aspecto.

De acuerdo con un tercer aspecto independiente, la presente descripción se refiere a un método para aclarar una muestra eliminando precipitados, en donde la muestra se pone en contacto antes, durante o después de la lisis con al menos un soporte sólido al cual se se unen los precipitados procedentes de la muestra lisada, formando de este modo un complejo con los precipitados, y en donde dicho complejo se separa opcional pero preferiblemente de la muestra restante. Este método es particularmente adecuado para aclarar una muestra lisada como se ha descrito anteriormente.

Los presentes inventores han desarrollado métodos que son particularmente adecuados para proporcionar una muestra lisada aclarada que comprende, debido al proceso de aclaramiento, una cantidad reducida de precipitados. La eliminación eficaz de los precipitados mejora el rendimiento del método analítico posterior, en particular cuando se pretende realizar una reacción de amplificación, ya que los métodos respectivos pueden ser inhibidos por los precipitados que se transportan desde la muestra lisada a la reacción analítica. Por lo tanto, un lisado aclarado respectivamente se puede usar directamente en un método analítico tal como por ejemplo, una reacción de amplificación. Además, el método de aclaramiento de lisado desarrollado es particularmente adecuado para proporcionar un lisado aclarado que es adecuado para reconstituir una composición seca que comprende reactivos para realizar el método analítico, ya que se reduce la cantidad de contaminantes inhibidores como en particular los precipitados. Además, como se ha descrito anteriormente, un método respectivo también es adecuado para proporcionar una composición reconstituida aclarada, en donde se añade una mezcla de lisis para la reconstitución. En una mezcla de lisis respectiva, la lisis aún no se ha completado. Como se ha descrito anteriormente, la lisis se puede lograr y/o completar calentando la composición reconstituida a una temperatura de al menos 90°C, preferiblemente al menos 95°C. Los detalles se han descrito anteriormente. Los detalles con respecto al método de aclaramiento, los soportes sólidos y las superficies adecuadas y preferidas para que se unan los precipitados, el o los complejos, así como los detalles con respecto al procedimiento de lisis para proporcionar una muestra lisada y las soluciones de lisis adecuadas y preferidas, se han descrito anteriormente junto con el primer aspecto. Para evitar repeticiones, se hace referencia a la descripción respectiva que también se aplica al tercer aspecto.

De acuerdo con un cuarto aspecto independiente, se proporciona un método para elevar el valor del pH de una muestra ácida, comprendiendo dicho método la adición de un tamiz molecular a la muestra para elevar el valor del pH de la muestra ácida. Preferiblemente, dicho método tiene una o varias de las siguientes características

a) el valor del pH de la muestra ácida es $\leq 6,5$, $\leq 6,0$, $\leq 5,5$, ≤ 5 , $\leq 4,5$ o se encuentra en un intervalo seleccionado de 3 a 6,5 y 3,5 a 6;

b) la adición del tamiz molecular da como resultado que el pH se eleva a un intervalo de pH que se selecciona a partir de 7,5 a 9, 8 a 9 y 8 a 8,5;

c) el tamiz molecular añadido es zeolita;

d) el tamiz molecular se añade antes, durante o después de la lisis de la muestra;

e) la muestra lisada, que se ha puesto en contacto con el tamiz molecular, se usa posteriormente en una reacción de amplificación; y/o

5 f) no se realiza ninguna purificación o aislamiento del ácido nucleico al entrar en contacto con el tamiz molecular.

Los detalles del método se describirán a continuación. En su caso, nos referimos a la descripción anterior.

Los ejemplos de tamices moleculares se han descrito anteriormente. Para elevar el valor del pH, se debe emplear un tamiz molecular que dé como resultado que se eleve el valor del pH. Preferiblemente, el tamiz molecular es capaz de elevar el valor del pH de una muestra ácida en al menos 1 unidad de pH, más preferiblemente en al menos 2 unidades de pH. La muestra ácida puede tener un valor de pH $\leq 6,5$, $\leq 6,0$, $\leq 5,5$, ≤ 5 , $\leq 4,5$. Preferiblemente, tiene un valor de pH que se encuentra en un intervalo entre 3 a 6,5, preferiblemente 3,5 a 6. Una muestra ácida típica es una muestra vaginal, por ejemplo, una torunda vaginal o cervical. De acuerdo con una realización, la adición del tamiz molecular da como resultado que el pH se eleva a un intervalo de pH que se encuentra entre 7,5 y 9, preferiblemente entre 8 y 9, más preferiblemente entre 8 y 8,5. Como se muestra en los ejemplos, la adición del tamiz molecular que eleva el pH tiene el efecto sorprendente de que el valor del pH de una muestra ácida se puede configurar en un intervalo de pH predefinido, incluso si el valor del pH inicial de la muestra varía. El tamiz molecular que eleva el pH que se usa de acuerdo con este aspecto, funcionaba incluso mejor que la adición de un tampón químico. Preferiblemente, se usan zeolitas como tamiz molecular. Como se muestra en los ejemplos, las zeolitas son muy eficaces para elevar el valor del pH de las muestras ácidas. Preferiblemente, se añaden en una cantidad de 2-50 mg/ml, preferiblemente de 5 a 30 mg/ml o de 5 a 20 mg/ml de muestra mezclada con una composición de lisis, tal como una solución de lisis. Preferiblemente, el tamiz molecular que eleva el pH se añade antes, durante o después de la lisis de la muestra. Preferiblemente, está presente durante la lisis. De este modo, las muestras ácidas pueden ser particularmente ventajosas preferidas para emplear el lisado proporcionado en una reacción de amplificación posterior. De este modo, una configuración individual del valor del pH del lisado antes de realizar la reacción de amplificación se vuelve obsoleta, respectivamente, es la realización de un método aguas abajo la que está influida por el valor del pH, al igual que una reacción de amplificación como una PCR. Además, añadir un tamiz molecular antes, durante o después de la lisis tiene el efecto de que los contaminantes, tales como los precipitados en particular, se pueden eliminar de manera eficaz. El tamiz molecular, que es preferiblemente una zeolita, no se usa para aislar ácidos nucleicos sino que se usa para preparar la muestra para un método de análisis posterior, en particular para un método de amplificación tal como PCR. Por lo tanto, el tamiz molecular se pone en contacto preferiblemente con la muestra ácida en condiciones en las que no se produce una unión sustancial de los ácidos nucleicos con el tamiz molecular. Por lo tanto, preferiblemente, al menos el 80% de los ácidos nucleicos comprendidos, al menos el 90%, al menos el 95% o al menos el 98% del ácido nucleico diana no se une al tamiz molecular en las condiciones usadas. El ácido nucleico diana puede ser ADN o ARN, o puede referirse a ambos. Como se ha descrito anteriormente, preferiblemente, el tamiz molecular se añade durante la lisis.

De acuerdo con un quinto aspecto, se proporciona un cartucho de procesamiento que es adecuado para usar en un método para analizar una muestra que comprende biomoléculas según el primer aspecto. Dicho cartucho de procesamiento comprende un cuerpo de cartucho y al menos una cámara de reacción que comprende una composición seca que comprende reactivos para llevar a cabo un método analítico, en donde el cuerpo de cartucho comprende una abertura de entrada de muestra, al menos una salida de muestra y un conducto de paso de fluido que conecta la abertura de entrada de muestra y la salida de muestra, en donde la salida de muestra se abre hacia la cámara de reacción, en donde el cartucho está diseñado de tal manera que la reconstitución de la composición seca comprendida en la cámara de reacción se logra mediante una muestra que entra en el cartucho a través de la abertura de entrada de muestra.

45 El término "fluido" tal y como se usa en el presente documento, se usa como término genérico que incluye gases y líquidos.

El conducto de paso de fluido de la muestra puede comprender al menos uno de los canales y/o cavidades y preferiblemente está formado al menos parcialmente en la superficie del cuerpo de cartucho. El conducto de paso de fluido asegura una vía de flujo predefinida de la muestra después de que la muestra ha entrado a través de la abertura de entrada de muestra, asegurando de este modo que llegue a la al menos una cámara de reacción. La cámara de reacción se puede integrar en el cuerpo de cartucho o se puede proporcionar como un elemento separado que se puede ensamblar al cuerpo de cartucho. Preferiblemente, una o varias de las cámaras de reacción se proporcionan como dispositivo(s) separado(s) que se ensambla(n) con el cuerpo de cartucho. En esta realización en donde la cámara de reacción es proporcionada por un dispositivo separado, el cuerpo de cartucho comprende medios, preferiblemente un saliente de conexión, para conectar al menos una cámara de reacción con el cuerpo de cartucho. Después de la conexión, se establece una comunicación fluida entre la salida de muestra y la cámara de reacción para que la muestra pueda entrar en la cámara de reacción. El cuerpo de cartucho también puede comprender una pluralidad de cámaras de reacción. Proporcionar más de una cámara de reacción en el cartucho de procesamiento tiene la ventaja de que se puede realizar más de una reacción y, por lo tanto, más de un análisis con

la misma muestra. Esto permite, por ejemplo, detectar la presencia o ausencia de diferentes dianas (por ejemplo, marcadores de enfermedad o agentes patógenos) en paralelo usando el mismo cartucho. Por lo tanto, un diseño de ese tipo es particularmente adecuado para realizar múltiples ensayos. Sin embargo, también se pueden realizar diversos ensayos en una cámara de reacción, por ejemplo, en una reacción de amplificación usando diferentes cebadores y/o sondas, como es bien sabido en la técnica anterior.

Si se usa una pluralidad de cámaras de reacción que se proporcionan como dispositivo(s) separado(s), el cuerpo de cartucho comprende una pluralidad de medios, preferiblemente salientes de conexión, para conectar las cámaras de reacción con el cuerpo de cartucho. Se pueden proporcionar varias cámaras de reacción como un dispositivo que se puede ensamblar herméticamente con el cuerpo de cartucho. Esto permite realizar diferentes reacciones en las cámaras respectivas, por ejemplo, para detectar diferentes agentes patógenos o marcadores de una enfermedad en paralelo. Las diferentes cámaras de reacción se pueden proporcionar con composiciones secas que comprenden diferentes reactivos, por ejemplo, que comprenden diferentes cebadores y/o sondas cuando se realiza una reacción de amplificación. La incorporación de varias cámaras de reacción en un dispositivo facilita el manejo y, por lo tanto, el ensamblaje del cartucho de procesamiento, lo que ahorra gastos.

Además, el cuerpo de cartucho comprende medios, preferiblemente un saliente de conexión, para conectar un recipiente de muestra con el cuerpo de cartucho. Las conexiones adecuadas para conectar la(s) cámara(s) de reacción y el recipiente de muestra con el cartucho son bien conocidas en la técnica anterior y, por lo tanto, no necesitan ninguna descripción detallada. La conexión se puede establecer basándose en los principios de cierre de forma, cierre forzado y/o bloqueo por fricción. Las realizaciones preferidas se muestran en los ejemplos.

Cuando el cartucho de procesamiento está en uso, la muestra debe entrar en el cartucho a través de la abertura de entrada de muestra. La entrada se puede facilitar mediante una inyección o cualquier otro medio adecuado. Por ejemplo, el recipiente de muestra puede comprender un pistón, que permite transferir la muestra desde el recipiente de muestra al conducto de paso de la muestra.

De acuerdo con una realización preferida, el cuerpo de cartucho comprende una abertura de entrada de fluido B que, a través de un conducto de paso de fluido B, está en comunicación fluida con el recipiente de muestra, si dicho recipiente está ensamblado con el cuerpo de cartucho y lo que permite la introducción de aire en el recipiente de muestra. Para este fin, el cuerpo de cartucho puede comprender una salida de fluido B a través de la cual el aire puede entrar en el recipiente si dicho recipiente está ensamblado con el cuerpo de cartucho. Un aparato generador de presión, tal como una bomba, se puede conectar con la abertura de entrada de fluido B, permitiendo de este modo bombear aire al recipiente de muestra. Si se usa una bomba, la presión preferiblemente se encuentra en un intervalo de 100 a 1000 mbar, preferiblemente de 150 a 500 mbar, más preferiblemente de 200 a 250 mbar. La presión generada por la bomba tiene el efecto de que la muestra se presiona dentro del cartucho a través de la abertura de entrada de muestra y, por lo tanto, llega a la cámara de reacción guiada por el conducto de paso de fluido de muestra. La muestra entra en la cámara de reacción a través de la salida de muestra.

De acuerdo con una realización, se proporcionan medios para controlar la cantidad de líquido que puede entrar en la cámara de reacción para la reconstitución de la composición seca. De acuerdo con una realización, la al menos una cámara de reacción y/o los medios para conectar la cámara de reacción con el cuerpo de cartucho comprenden al menos una abertura de fluido A, a través de la cual un fluido, en particular aire o fluidos similares, puede salir de la cámara de reacción. Por lo tanto, de acuerdo con una realización, la cámara de reacción y/o el saliente de conexión para conectar la cámara de reacción con el cartucho, comprende una abertura de fluido A respectiva. De este modo, el aire puede escapar desde la cámara de reacción cuando la muestra se introduce en el cuerpo de cartucho y entra en la cámara de reacción. El aire es básicamente se desplaza con la muestra. De acuerdo con una realización, la abertura de fluido A a través de la cual un fluido puede salir de la cámara de reacción, comprende una barrera, en donde dicha barrera impide sustancialmente el paso de líquido. La barrera permite el paso de aire al menos antes de que dicha barrera entre en contacto con un líquido. Sin embargo, evita sustancialmente el paso de un líquido. De este modo, la cantidad de muestra que puede entrar en la cámara de reacción se controla de modo que la cámara de reacción se llena con la cantidad deseada de muestra que es necesaria para una reconstitución adecuada de la composición seca que está comprendida en la cámara de reacción. Por lo tanto, dicha barrera se puede usar ventajosamente para dosificar, ya que solo la cantidad deseada de muestra puede entrar en la cámara de reacción, debido a la contrapresión que genera la membrana que impide el paso de la muestra. Además, evita que la muestra, incluyendo los reactivos comprendidos en la cámara de reacción, se expulse accidentalmente de la cámara de reacción. Dicha barrera, es preferiblemente una membrana posicionada de tal manera que solo una cantidad predeterminada de muestra puede entrar en la cámara de reacción. Al menos una porción de dicha barrera, que preferiblemente es una membrana, está en contacto con la muestra cuando la cantidad predeterminada de muestra que se requiere para la reconstitución de la composición seca ha entrado en la cámara de reacción, bloqueando preferiblemente de este modo una entrada adicional de muestra. La membrana es preferiblemente una membrana hidrófoba. Preferentemente es porosa. Preferiblemente, se usa una membrana que tiene un tamaño de poro que se encuentra en un intervalo de 0,05 μm a 0,5 μm , preferiblemente de 0,1 μm a 3 μm , más preferido de 1,5 μm a 2,5 μm , el más preferido de aprox. 2 μm . La membrana puede comprender un polímero. De acuerdo con una realización, la membrana comprende un soporte tal como un soporte de nailon no tejido. De acuerdo con una realización, la membrana es una membrana de copolímero acrílico moldeada sobre un soporte de nailon no tejido o una membrana que tiene las mismas propiedades con respecto al paso de aire y líquidos. Dicha membrana que funciona como una

barrera para la muestra hace que dispositivos más complicados como, por ejemplo, dispositivos dispensadores para introducir una cantidad predeterminada de líquido en la cámara de reacción, sean obsoletos. Se puede lograr una dosificación suficientemente exacta con dicha barrera que impide la entrada de muestra adicional una vez que la cámara de reacción se llena con muestra. Por lo tanto, por ejemplo, una bomba comprendida en el dispositivo de procesamiento puede bombear aire continuamente al recipiente de reacción, hasta que la membrana crea una contrapresión que evita que pueda entrar más muestra desde el recipiente al cartucho. De acuerdo con una realización, dicha abertura de fluido A que se puede usar para ventilar la cámara de reacción y controlar la entrada de muestra en el cartucho, está ubicada de tal manera que el aire sale directamente del cartucho. De acuerdo con una realización, puede estar comprendida en la cámara de reacción.

Sin embargo, dicha abertura de fluido A también puede estar comprendida dentro del cartucho. Por ejemplo, tal y como se muestra en los ejemplos, se puede ubicar dentro o puede estar proporcionada por los medios para conectar la cámara de reacción con el cartucho. Preferiblemente, dicha abertura de fluido A que se usa para ventilar la cámara de reacción se abre en un conducto de paso de fluido A adicional, que está conectado con una salida de fluido A adicional. Proporcionar un conducto de paso de fluido A adicional de ese tipo que recibe el aire desde una o varias cámaras de reacción tiene ventajas específicas, en particular si el método analítico implica una o varias etapas de calentamiento dentro de la cámara de reacción, como por ejemplo es el caso con muchos métodos de amplificación, ya que el conducto de paso de fluido A adicional se puede bloquear, evitando o al menos reduciendo de este modo el riesgo de que los líquidos se evaporen durante la etapa de calentamiento.

Esto puede mejorar la precisión del método analítico realizado que implica una etapa de calentamiento. De acuerdo con una realización, se proporcionan medios que permiten cerrar el conducto de paso de fluido que conecta la abertura de entrada de muestra y la salida de muestra y/o el conducto de paso de fluido A que conecta la abertura de fluido A a través del cual un fluido, en particular aire, puede salir de la cámara de reacción por la salida de fluido A. Dichos medios pueden formar una barrera dentro de dicho(s) conducto(s) de paso de fluido, que junto con una tapa que está cerrando dicho(s) conducto(s) de paso de fluido, permiten cerrar o abrir dicho(s) conducto(s) de paso de fluido, actuando por lo tanto como una simple válvula. Cuando se aplica presión a la tapa, la válvula se cierra, si se elimina la presión, la válvula se abre. Más detalles de esta realización se describirán a continuación junto con el cuerpo de cartucho.

Además, proporcionar las barreras respectivas en el conducto de paso de la muestra tiene la ventaja de que la transferencia de la muestra desde el recipiente de muestra al cartucho se puede realizar de una manera notablemente sencilla. En este caso, el recipiente de muestra comprende la muestra mezclada con la solución de lisis. Dicha mezcla se calienta para inducir la lisis de la muestra como se ha descrito anteriormente. Se aplica presión a la tapa, cerrando de este modo las válvulas. La etapa de calentamiento da como resultado que se crea una sobrepresión en el recipiente de muestra. Si las válvulas se abren al eliminar la presión de la tapa, la muestra se descarga del cartucho debido a la sobrepresión que se genera en el recipiente de muestra. De este modo, la muestra entra en la cámara de reacción a través del conducto de paso de la muestra proporcionado. Se asegura un llenado controlado de la cámara de reacción proporcionando una abertura de fluido A que comprende una barrera para la muestra como se ha descrito anteriormente. Esta realización es ventajosa, porque no se necesita una bomba aparte o algo similar para lograr la transferencia de la muestra desde el recipiente de muestra conectado hasta el cartucho. Preferiblemente, la muestra transferida es una muestra lisada, más preferiblemente una muestra lisada aclarada como se ha descrito anteriormente, o una mezcla de lisis como se ha descrito anteriormente.

El presente cartucho tiene un diseño notablemente simple ya que no necesita ningún depósito para líquidos o soluciones para el procesamiento de la muestra o la reconstitución de la composición seca comprendida en la cámara de reacción. Además, el cartucho no necesita uno o varios depósitos de residuos aparte para almacenar los materiales de la muestra y/o reactivos usados. Como todo el cartucho de procesamiento puede funcionar (solo) a través de la muestra que entra en el cartucho, que preferiblemente es una muestra lisada o una mezcla de lisis como se ha descrito anteriormente, no hay líquidos o soluciones en exceso que se deban manipular o desechar. Además, como no se proporcionan líquidos en el cartucho, por ejemplo, con el fin de procesar la muestra o reconstituir la composición seca, se reduce el riesgo de que dichos líquidos se drenen. Un drenaje de este tipo es un problema considerable, porque una reconstitución parcial de la composición seca puede comprometer irreversiblemente los reactivos comprendidos en la misma. Que no se tengan que proporcionar líquidos además de la muestra es una ventaja notable sobre los cartuchos de la técnica anterior, lo que también mejora la producción y reduce los gastos.

En una realización preferida, el cuerpo de cartucho comprende un tubo con una primera abertura terminal y una segunda abertura terminal, en donde la primera abertura terminal del tubo está alineada con la abertura de entrada de muestra. El tubo prolonga de este modo el conducto de paso de la muestra. Un fluido proveniente del recipiente de muestra entrará primero en la segunda abertura terminal del tubo y fluirá a través del tubo para salir del tubo por la primera abertura terminal y se introducirá en el conducto de paso de la muestra a través de la abertura de entrada de muestra alineada con la primera abertura terminal del tubo. Dicho tubo se puede usar, por ejemplo, para llegar al recipiente de muestra cuando se ensambla con el cuerpo de cartucho y para permitir que un fluido tal como una muestra comprendida en el recipiente, fluya hacia el conducto de paso de la muestra si se crea una sobrepresión en el recipiente de muestra, por ejemplo, por medio de un fluido que entra en el recipiente de muestra a través de la salida de fluido B o mediante la sobrepresión que se genera cuando la mezcla de lisis se calienta y la válvula comprendida en el conducto de paso de la muestra se cierra como se ha descrito anteriormente.

Preferiblemente, la salida de muestra y la abertura de fluido A están provistas por tubos que están dispuestos en la pared lateral de la cámara de reacción, en particular si la cámara de reacción se proporciona como un elemento integrado, o el saliente de conexión de la cámara de reacción. La construcción de la salida de muestra en un tubo tiene la ventaja de que la muestra entra en la cámara de reacción de manera controlada, como si se pipeteara en la pared lateral de un recipiente de reacción. Preferiblemente, el tubo está comprendido en una convexidad de la pared lateral. De este modo, se puede evitar una descarga incontrolada en la cámara de reacción. La abertura de fluido B que está en comunicación fluida con la cámara de reacción también está comprendida preferiblemente en una convexidad de una pared lateral, preferiblemente dispuesta de forma opuesta a la salida de muestra. Más detalles y ventajas de dicha disposición se describen a continuación y en las figuras.

De acuerdo con una realización, el cuerpo de cartucho se ensambla con un recipiente de muestra que comprende una abertura del recipiente de muestra que está dispuesta de tal manera que la abertura del recipiente de muestra está en conexión fluida con la abertura de entrada de muestra para que pueda entrar un fluido como la muestra desde el recipiente a la abertura de entrada de muestra. Dicho recipiente de muestra contiene una muestra que se va a analizar mezclada con una composición de lisis. La composición de lisis puede tener una o varias de las características descritas anteriormente junto con el primer aspecto. Preferiblemente, se usa una solución de lisis que comprende o consiste en los siguientes componentes

- (a) al menos un tensioactivo no iónico o una mezcla de detergentes no iónicos,
- (b) al menos un polímero que evita o reduce la inhibición del método analítico posterior, preferiblemente mediante la formación de complejos inespecíficos con inhibidores potenciales;
- (c) opcionalmente una enzima proteolítica,
- (d) opcionalmente un agente quelante para cationes divalentes y
- (e) opcionalmente una sustancia tamponadora.

Los detalles adecuados también se han descrito anteriormente, se hace referencia a la descripción respectiva. También puede comprender una barra de agitación magnética para ayudar a mezclar la muestra en la solución de lisis. Preferiblemente, comprende un soporte sólido para aclarar el lisado, más preferiblemente comprende partículas magnéticas carboxiladas. De este modo, los precipitados se pueden eliminar de manera eficaz y se proporciona un lisado aclarado que puede pasar a través de la abertura de entrada de muestra como una "muestra". Respectivamente, las muestras pretratadas que se pueden haber lisado y/o a partir de las cuales se eliminaron los contaminantes u otros componentes de la muestra, también se denominan una "muestra" junto con el cartucho para una mayor simplicidad. Los detalles adicionales de la solución de lisis y del o los soportes sólidos que se pueden usar para aclarar el lisado, se han descrito anteriormente, y se hace referencia a la descripción respectiva.

Preferiblemente, el cartucho de procesamiento tiene un cuerpo de cartucho como se describe a continuación junto con el sexto aspecto.

De acuerdo con un sexto aspecto, se proporciona un cuerpo de cartucho específico. El cuerpo de cartucho se puede usar para proporcionar una conexión fluida desde un recipiente de muestra que contiene un fluido, tal como una muestra, hasta al menos una cámara de reacción. El recipiente de muestra y una o varias de las cámaras de reacción, si se proporcionan como un elemento separado, se pueden ensamblar con el cuerpo de cartucho. Ese cuerpo de cartucho se puede usar ventajosamente para poner en práctica el método de acuerdo con el primer aspecto. Posteriormente, explicaremos el diseño de dicho cuerpo de cartucho, los elementos y su función, así como su interacción con el recipiente de muestra y la cámara de reacción que se puede ensamblar con dicho cuerpo de cartucho y/o el método analítico que se puede realizar utilizando un cuerpo de cartucho respectivo. Tal y como se ha descrito, el cuerpo de cartucho es adecuado para proporcionar una conexión fluida desde un recipiente de muestra que contiene un fluido y se puede ensamblar con el cuerpo de cartucho, hasta al menos una cámara de reacción que se puede ensamblar con el cuerpo de cartucho o que se proporciona como una parte integral del cuerpo de cartucho. Dicho cuerpo de cartucho comprende

- una abertura de entrada de muestra y una salida de muestra,
- un conducto de paso de muestra que conecta la abertura de entrada de muestra y la salida de muestra,
- un saliente de conexión de recipiente de muestra para conectar el recipiente de muestra, en donde después de ensamblar el recipiente de muestra con dicho saliente de conexión, la abertura de entrada de muestra está en comunicación fluida con el recipiente de muestra,
- al menos un saliente de conexión de la cámara de reacción para conectar una cámara de reacción en donde al ensamblar la cámara de reacción con dicho saliente de conexión, la salida de muestra está en comunicación fluida con la cámara de reacción y/o comprende al menos una cámara de reacción que se proporciona como parte integral del cuerpo de cartucho,

en donde al menos una abertura de fluido A se proporciona en el saliente de conexión de la cámara de reacción y/o en la cámara de reacción y en donde dicha abertura de fluido A comprende una barrera, en donde dicha barrera permite el paso de aire al menos antes de que dicha barrera entre en contacto con un líquido, pero en donde dicha barrera impide sustancialmente el paso de líquido.

5 Tal y como se ha descrito anteriormente y a continuación, el llenado de la al menos una cámara de reacción por la muestra que entra en el cuerpo de cartucho a través de la abertura de entrada de muestra y llega a través del conducto de paso de fluido proporcionado a la al menos una cámara de reacción, está controlado por una barrera para líquidos que está comprendida en la abertura de fluido A. Dicha barrera es preferiblemente una membrana hidrófoba porosa, que permite el paso del aire (al menos antes de que se humedezca) pero que sustancialmente no
10 permite el paso de la muestra. Tan pronto como la muestra alcanza la membrana hidrófoba, no puede pasar por dicha membrana y el llenado de la cámara de reacción se detiene automáticamente, asegurando de este modo que la composición seca se reconstituye con una cantidad adecuada predeterminada de muestra, que preferiblemente es una muestra lisada aclarada como se ha descrito anteriormente. Dicho cuerpo de cartucho se puede usar ventajosamente como cuerpo de cartucho en el cartucho de procesamiento de acuerdo con el quinto aspecto. La salida de muestra así como la abertura de fluido A están en comunicación fluida con la al menos una cámara de
15 reacción que se puede proporcionar como una parte integral del cuerpo de cartucho o, preferiblemente, proporcionar como un elemento separado.

Posteriormente, describiremos en particular los detalles de realizaciones particularmente preferidas. Detalles adicionales y otras realizaciones también se describen en las figuras, las reivindicaciones y posteriormente.

20 El cuerpo de cartucho puede tener una abertura de entrada de fluido B y una salida de fluido B, por lo que un conducto de paso de fluido B conecta la abertura de entrada de fluido B y la salida de fluido B. La abertura de entrada de fluido B se puede usar, por ejemplo, para recibir un fluido, preferiblemente aire, que fluye a través del conducto de paso de fluido B y sale del cuerpo de cartucho por la salida de fluido B, por ejemplo, para entrar en un recipiente de muestra. Por ejemplo, como se ha descrito anteriormente, la abertura de entrada de fluido B se puede
25 conectar a un aparato generador de presión, que bombea aire a través de la primera abertura de entrada. El cuerpo de cartucho comprende además una abertura de entrada de muestra y una salida de muestra, por lo que un conducto de paso de muestra conecta la abertura de entrada de muestra y la salida de muestra. La abertura de entrada de muestra se puede usar, por ejemplo, para recoger un producto licuado, tal como una muestra a partir del recipiente de muestra que fluye a través del conducto de paso de muestra y sale del mismo por la salida de muestra, por ejemplo, para entrar en una cámara de reacción.

La cámara de reacción y/o el saliente de conexión de la cámara de reacción para conectar la cámara de reacción con el cuerpo de cartucho, comprende al menos una abertura de fluido a través de la cual un fluido, concretamente aire, puede salir de la cámara de reacción. Por lo tanto, de acuerdo con una realización, la cámara de reacción y/o el saliente de conexión de la cámara de reacción comprenden una abertura de fluido A. De este modo, el aire puede
35 salir del conducto de paso de muestra y la cámara de reacción cuando la muestra se introduce en el cuerpo de cartucho y entra en la cámara de reacción. El aire es desplazado por la muestra. De acuerdo con una realización preferida, dicha abertura de fluido A está compuesta por una barrera, preferiblemente una membrana, que permite el paso del aire pero no de la muestra. Los detalles se han descrito anteriormente. De este modo, la cantidad de muestra que puede entrar en la cámara de reacción se controla de modo que la cámara de reacción se llena con la
40 cantidad deseada de muestra que es necesaria para la reconstitución de la composición seca que está comprendida en la cámara de reacción. Por lo tanto, dicha barrera se puede usar para la dosificación, ya que solo se bombea la cantidad deseada de muestra dentro de la cámara de reacción, debido a la contrapresión creada por la membrana que impide el paso de la muestra. Se puede lograr una dosificación lo suficientemente exacta con dicha barrera comprendida en la abertura de fluido A que está comprendida en la cámara de reacción y/o el segundo saliente que comprende la abertura de fluido A. Los detalles se han descrito anteriormente.

En una realización preferida, el cuerpo de cartucho comprende una abertura de fluido A, una salida de fluido A y un conducto de paso de fluido A que conecta la abertura de fluido A y la salida de fluido A. La abertura de fluido A puede recoger un fluido, es decir, un gas tal como aire, que sale de la cámara de reacción y que fluye a través del conducto de paso de fluido A para salir del cuerpo de cartucho por la salida de fluido A. Proporcionar una salida de
50 fluido A y un conducto de paso de fluido A tiene ventajas específicas si el método analítico implica una etapa de calentamiento en la cámara de reacción, como es por ejemplo el caso con muchos métodos de amplificación. El conducto de paso de fluido A se puede bloquear usando pequeñas barras que actúan junto con la tapa como una válvula como se ha descrito anteriormente y como se describirá con más detalle a continuación. El bloqueo de dicho conducto de paso de fluido A evita la evaporación de líquidos durante la etapa de calentamiento. Esto puede mejorar
55 la precisión del método analítico realizado que implica una etapa de calentamiento.

El cuerpo de cartucho tiene un saliente de conexión del recipiente de muestra para conectar el recipiente de muestra. Después de ensamblar el recipiente de muestra con el saliente de conexión del recipiente de muestra, la salida de fluido B y la abertura de entrada de muestra están en comunicación fluida con el recipiente. Por lo tanto, un fluido tal como el aire puede entrar en el recipiente de muestra a través de la salida de fluido B y un fluido tal como la muestra puede entrar en el conducto de paso de la muestra a través de la abertura de entrada de muestra. Preferiblemente, se introduce una sobrepresión a través de la salida de fluido B en el recipiente con el fin de inducir

el movimiento de la muestra como se ha descrito anteriormente y se describirá con más detalle a continuación. Sin embargo, como se ha descrito anteriormente, también son factibles otros métodos para transferir la muestra desde el recipiente al cartucho.

Dicho primer saliente puede estar formado por una o varias paredes laterales. Una cámara puede estar formada por dichas una o varias paredes laterales y una pared de base. Dicha cámara puede tener una abertura opuesta a la pared de base. Tras la conexión del recipiente de muestra con dicho saliente de conexión, la salida de fluido B y la abertura de entrada de muestra se disponen en la pared de base o en una de las paredes laterales de dicho primer saliente. Esta disposición de la salida de fluido B y la abertura de entrada de muestra permite que un primer fluido, preferiblemente aire, sea soplado dentro de la cámara y un recipiente de muestra que está conectado al saliente de conexión del recipiente de muestra. Este aire soplado en la primera cámara se puede usar para forzar un líquido adicional, como la muestra comprendida en el recipiente de muestra, para que salga del recipiente de muestra conectado al saliente de conexión del recipiente de muestra, debido a la sobrepresión creada por el fluido que sale por la salida de fluido B y entra en la cámara y el recipiente de muestra. La disposición de la abertura de entrada de muestra permite que una muestra salga del recipiente de muestra y fluya a lo largo del conducto de paso de muestra hacia la salida de muestra.

La conexión del recipiente de muestra con el cuerpo de cartucho se puede lograr por cualquier medio adecuado que permita una conexión estrecha entre el recipiente de muestra y el cuerpo de cartucho. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, una conexión de hilo, un mecanismo de recorte o un recorte de bayoneta. De acuerdo con una realización, una o varias de las paredes laterales del saliente de conexión del recipiente de muestra están adaptadas para que se ajusten en una abertura del recipiente de muestra para lograr una conexión. Alternativamente, una o varias de las paredes laterales se pueden adaptar para que un saliente de conexión se ajuste en la primera cámara que puede estar formada por las paredes laterales y la pared de base.

El presente cuerpo de cartucho tiene además, de acuerdo con una realización preferida, al menos un saliente de conexión de cámara de reacción para conectar una cámara de reacción. Después de ensamblar la cámara de reacción con el saliente de conexión de la cámara de reacción, la salida de muestra está en comunicación fluida con la cámara de reacción. De ese modo, una muestra puede entrar a través de la salida de muestra en la cámara de reacción. El saliente de conexión de la cámara de reacción puede estar compuesto por una o varias paredes laterales y una pared de base. La conexión entre la cámara de reacción y el saliente de conexión de la cámara de reacción se puede lograr nuevamente por cualquier medio adecuado que asegure una conexión estrecha entre el cuerpo de cartucho y la cámara de reacción. Por ejemplo, una o varias de las paredes laterales de la segunda conexión del saliente se pueden adaptar para ajustarse en una abertura de la cámara de reacción o las paredes laterales se pueden adaptar para que se ajuste un saliente de conexión de la cámara de reacción en una primera cámara de la segunda conexión de saliente, eso se puede formar, por ejemplo, mediante una o varias paredes laterales y una pared de base y tiene una abertura opuesta a la pared de base. La cámara de reacción se puede conectar con las paredes laterales o a la pared de base del saliente de conexión de la cámara de reacción.

La salida de muestra y opcionalmente la abertura de fluido A puede estar dispuesta en la pared de base o al menos en una de las paredes laterales del saliente de conexión de la cámara de reacción. Como se ha descrito anteriormente, también es concebible proporcionar la abertura de fluido A en la cámara de reacción. Sin embargo, se prefiere proporcionarla en el cuerpo de cartucho, en particular en el saliente de conexión de la cámara de reacción como se describe en esta memoria. Esta disposición de la salida de muestra y la abertura de fluido A permite que la muestra entre en la cámara de reacción a través de la salida de muestra. Preferiblemente, la salida de muestra y la abertura de fluido A tienen tubos que están dispuestos en la pared lateral del saliente de conexión de la cámara de reacción. El tubo puede tener cualquier forma y también puede comprender, por ejemplo, roscas. La construcción de la salida de muestra en un tubo tiene la ventaja de que la muestra entra en la cámara de reacción de manera controlada, de forma similar a como si se pipeteara en la pared lateral de un recipiente de reacción. De este modo, se puede evitar una descarga de flujo incontrolado de la cámara de reacción. La abertura de fluido A que está en comunicación fluida con la cámara de reacción permite que el aire en la cámara de reacción salga de la cámara de reacción forzado por la presión creada dentro de la cámara de reacción por la muestra proveniente del recipiente de muestra, que pase a través del conducto de paso de muestra y entre en la cámara de reacción a través de la salida de muestra. Preferiblemente, la abertura de fluido A tiene un tubo que está dispuesto en la pared de base del saliente de conexión de la cámara de reacción. Como se ha descrito anteriormente y a continuación, dicha abertura de fluido A está preferiblemente cerrada por una membrana, preferiblemente una membrana hidrófoba para controlar la entrada de muestras adicionales en el cartucho, respectivamente la cámara de reacción, si la cámara de reacción se llena con la cantidad predeterminada y por lo tanto deseada de muestra que es necesaria para la reconstitución. La membrana que sella la abertura de fluido A permite que el aire escape al menos hasta que la muestra humedezca la membrana. Por lo general, el paso del aire también se ve obstaculizado o incluso impedido una vez que la membrana se humedece o el aire solo puede pasar si se genera una alta presión, lo que podría ocurrir al realizar una reacción de calentamiento dentro de la cámara de reacción. Preferiblemente, dicha membrana está ubicada en el extremo superior de un tubo que está comprendido en la pared lateral de la segunda conexión de saliente. Proporcionar la abertura de fluido A en forma de un tubo y colocar la membrana dentro o preferiblemente dentro del extremo superior de dicho tubo, tiene la ventaja de que se puede evitar un cierre prematuro de la cámara de reacción. Incluso si la muestra se descarga rápidamente en la cámara de reacción debido a la presión aplicada, la cámara de reacción debe llenarse primero antes de que la muestra suba por el tubo. De este modo, se asegura

que la cámara de reacción se llena con la cantidad deseada de muestra antes de que la muestra entre en contacto y, por lo tanto, humedezca la membrana, bloqueando de este modo la cámara de reacción. De este modo, se evita una derivación no deseada de la salida de muestra y la abertura de fluido A que podría dar como resultado que la cámara de reacción no se llene con la cantidad predeterminada de líquido que es necesaria para la correcta reconstitución de la composición seca.

Se describe que el presente cuerpo de cartucho tiene aberturas de entrada de fluido y salidas de fluido. Preferiblemente, se entiende que una abertura de entrada de fluido (o una abertura en general) y una salida de fluido son o comprenden un orificio en un cuerpo. Una abertura de entrada de fluido puede formar un orificio a través del cual un fluido fluye hacia un conducto de paso de fluido y una salida de fluido puede formar un orificio a través del cual el fluido fluye desde el conducto de paso de fluido. Se puede proporcionar en forma de tubo. En la unión entre dos pasos de fluido, el mismo orificio puede proporcionar ambas funciones. Ni la abertura de entrada de fluido, las aberturas en general, ni las salidas de fluido tienen una forma limitada. Preferiblemente, los orificios son circulares o elípticos. Sin embargo, los orificios también pueden ser cuadrados, triangulares o de cualquier otra forma geométrica. Los orificios pueden ser orificios abiertos. Los orificios también pueden comprender o pueden estar cubiertos por una membrana o filtro. También en ese caso todavía se entienden como orificio y, por lo tanto, como una abertura o una salida, siempre que el fluido de interés pueda fluir a través de la membrana o el filtro, incluso si un fluido de otro tipo no puede pasar a través de dicha membrana o filtro.

Se reivindica que el cuerpo de cartucho tiene conductos de paso de fluido. Como conductos de paso de fluido, permiten el flujo de un fluido tal como un líquido (en particular la muestra) o un gas, en particular aire. Pueden tener cualquier forma o tamaño. Los conductos de paso pueden comprender uno o varios canales y/o cavidades. Pueden estar abiertos en su parte superior y, por ejemplo, se pueden cerrar con una tapa como por ejemplo, una película de plástico. Pueden comprender barras para proporcionar junto con la tapa una válvula simple como se ha descrito anteriormente. Los conductos de paso también incluyen conductos para fluidos que atraviesan un cuerpo. Los conductos de paso no tienen que tener una forma simétrica en sección transversal. Los conductos de paso de acuerdo con la presente invención pueden conducir el flujo de un fluido en una dirección predefinida. Por ejemplo, el conducto de paso de muestra conduce el flujo de la muestra hacia una o varias de las cámaras de reacción, si la muestra se introduce en el conducto de paso de muestra aplicando una presión. El conducto de paso de fluido A conduce el aire a la salida de fluido A, permitiendo de este modo que el aire salga del sistema del conducto de paso y de la cámara de reacción cuando se introduce la muestra.

El saliente de conexión del recipiente de muestra del cuerpo de cartucho puede estar compuesto por una o varias paredes laterales que, en una realización preferida, pueden incluir una primera cámara que está formada además por una pared de base y que tiene una abertura opuesta a la pared de base. En una realización preferida, las paredes laterales del saliente de conexión del recipiente de muestra forman un cuerpo tubular, lo que únicamente significa que las paredes laterales pueden estar formadas por una pared lateral que está cerrada en sus extremos enfrentados. Por lo tanto, la expresión "paredes laterales" tal y como se usa en el presente documento, también se refiere e incluye realizaciones, en donde solo se usa una pared lateral respectiva. Sin embargo, el saliente de conexión del recipiente de muestra no necesita tener una forma tubular. El saliente de conexión del recipiente de muestra puede tener, por ejemplo, secciones transversales rectangulares o cuadradas, constituidas por dos o más, por ejemplo cuatro, paredes laterales que están conectadas entre sí en sus extremos respectivos. El saliente de conexión del recipiente de muestra también puede tener una sección transversal triangular o cualquier otra sección transversal adecuada. La primera cámara formada por una o varias de las paredes laterales está formada además por una pared de base. Preferiblemente, el saliente de conexión del recipiente de muestra tiene forma de copa. La pared de base del saliente de conexión del recipiente de muestra puede ser una superficie plana. Sin embargo, como en una copa, la pared de base también puede tener una forma redondeada. De acuerdo con una realización, la cámara tiene una abertura opuesta a la pared de base. Esa abertura puede ser tan grande como el área que queda libre por las paredes laterales. Sin embargo, la abertura también se puede formar en una pared superior que bordea adicionalmente la primera cámara y está dispuesta frente a la pared de base.

De acuerdo con una realización, el saliente de conexión del recipiente de muestra está adaptado para encajar en una abertura del recipiente de muestra o para que un saliente de conexión de un recipiente de muestra se ajuste en la primera cámara del saliente de conexión del recipiente de muestra. El saliente de conexión está adaptado preferiblemente para que el recipiente de muestra se conecte con las paredes laterales del saliente de conexión y, por lo tanto, para permitir que el recipiente de muestra se conecte estrechamente con el cuerpo de cartucho.

Preferiblemente, la salida de fluido B y la abertura de entrada de muestra están dispuestas en la pared de base o en una de las paredes laterales del saliente de conexión del recipiente de muestra. La salida de fluido B y la abertura de entrada de muestra no necesitan estar dispuestas en el mismo elemento. Por ejemplo, la salida de fluido B puede estar dispuesta en la pared de base y la abertura de entrada de muestra puede estar dispuesta en una de las paredes laterales del primer saliente. La salida de fluido B y la abertura de entrada de muestra están preferiblemente dispuestas para abrirse dentro de la primera cámara. Sin embargo, también es factible que la salida de fluido B y la abertura de entrada de muestra estén dispuestas en las paredes laterales y se abran en la superficie superior de las paredes laterales.

El saliente de conexión de la cámara de reacción del cuerpo de cartucho también puede estar compuesto por una o

varias paredes laterales que pueden incluir en una realización preferida una segunda cámara que está formada además por una pared de base. Puede comprender una abertura opuesta a la pared de base. En una realización preferida, las paredes laterales del saliente de conexión de la cámara de reacción forman un cuerpo tubular, lo que significa que las paredes laterales pueden estar formadas por una pared lateral que está cerrada en sus extremos enfrentados. Sin embargo, el saliente de conexión de la cámara de reacción no necesita tener una forma tubular. El saliente de conexión de la cámara de reacción puede tener, por ejemplo, secciones transversales rectangulares o cuadradas, constituidas por cuatro paredes laterales que están conectadas entre sí en los extremos respectivos. El saliente de conexión de la cámara de reacción también puede tener una sección transversal triangular o cualquier otra sección transversal adecuada. La segunda cámara formada por las paredes laterales está formada además por una pared de base. Preferiblemente, el saliente de conexión de la cámara de reacción tiene forma de copa. La pared de base del saliente de conexión de la cámara de reacción puede ser una superficie plana. Sin embargo, como en una copa, la pared de base también puede tener una forma redondeada. La cámara tiene una abertura opuesta a la pared de base. Esa abertura puede ser tan grande como el área dejada libre por las paredes laterales. Sin embargo, la abertura también se puede formar en una pared superior que bordea adicionalmente la primera cámara y está dispuesta frente a la pared de base.

El saliente de conexión de la cámara de reacción, de acuerdo con una realización, está adaptado para encajar en una abertura de la cámara de reacción o para encajar un saliente de conexión de una cámara de reacción en la cámara del saliente de conexión de la cámara de reacción. El saliente de conexión está adaptado para que la cámara de reacción se conecte a las paredes laterales del saliente de conexión y, por lo tanto, para permitir que el recipiente de muestra se conecte con el cuerpo de cartucho.

De acuerdo con una realización, la salida de muestra y la abertura de fluido A están dispuestas en la pared de base o en una de las paredes laterales del saliente de conexión de la cámara de reacción. La salida de muestra y la abertura de fluido A no tienen que estar dispuestas en el mismo elemento. Por ejemplo, la salida de muestra puede estar dispuesta en la pared de base y la abertura de fluido A puede estar dispuesta en una de las paredes laterales. La salida de muestra y la abertura de fluido A están preferiblemente dispuestas para abrirse en la cámara del saliente de conexión de la cámara de reacción. Sin embargo, también es factible que la salida de muestra y la abertura de fluido A estén dispuestas en las paredes laterales y se abran en la superficie superior de las paredes laterales. Además, como se ha descrito anteriormente, la abertura de fluido A también puede estar comprendida en la cámara de reacción, preferiblemente en la parte superior, incluso se prefiere proporcionarla en el cuerpo de cartucho. Preferiblemente, también en este documento, la salida de muestra y la abertura de fluido A se proporcionan como tubos en la convexidad de una pared lateral por las razones descritas anteriormente.

En una realización preferida, el cuerpo de cartucho comprende un tubo con una primera abertura terminal y una segunda abertura terminal, en donde la primera abertura terminal del tubo está alineada con la abertura de entrada de muestra. El tubo prolonga de este modo el conducto de paso de la muestra. Un fluido proveniente del recipiente de muestra entrará primero en la segunda abertura terminal del tubo y fluirá a través del tubo para salir del tubo por la primera abertura terminal y se introducirá en el conducto de paso de la muestra a través de la abertura de entrada de muestra alineada con la primera abertura terminal del tubo. Dicho tubo se puede usar, por ejemplo, para llegar al recipiente de muestra cuando se ensambla con el cuerpo de cartucho y para permitir que un fluido tal como una muestra comprendida en el recipiente, fluya hacia el conducto de paso de la muestra si se crea una sobrepresión en el recipiente de muestra, por ejemplo, por medio de un fluido que entra en el recipiente de muestra a través de la salida de fluido B. Se puede generar una sobrepresión mediante un dispositivo generador de presión, tal como una bomba, que se puede conectar con la abertura de entrada de fluido B.

El tubo puede tener cualquier forma y ser de cualquier material y, por ejemplo, puede ser flexible. Sin embargo, de acuerdo con una realización preferida, el tubo es un tubo longitudinal rígido. Esto permite que el recipiente de muestra se fije más fácilmente al cuerpo de cartucho y que el tubo entre en una abertura del recipiente de muestra más fácilmente, si el recipiente de muestra está fijado al cuerpo de cartucho. Preferiblemente, el tubo está compuesto por el mismo material que el cuerpo de cartucho. Preferiblemente, forma una parte integral de dicho cuerpo de cartucho.

En una realización preferida, una o varias de las paredes laterales del saliente de conexión del recipiente de muestra y/o una o varias de las paredes laterales del saliente de conexión de la cámara de reacción forman un cuerpo tubular. La formación del saliente de conexión del recipiente de muestra y/o el saliente de conexión de la cámara de reacción en forma de un cuerpo tubular facilita la conexión estrecha del recipiente de muestra con el saliente de conexión del recipiente de muestra y facilita la conexión estrecha de la cámara de reacción con el saliente de conexión de la cámara de reacción.

El ensamblaje entre el recipiente de muestra y la cámara de reacción con los salientes de conexión se puede lograr por cualquier medio adecuado. La conexión se puede basar en los principios de cierre de forma, cierre forzado y/o bloqueo por fricción. Dependiendo de los medios de conexión elegidos, el primer saliente y los salientes de conexión de la cámara de reacción comprenden elementos adecuados para lograr una conexión de ese tipo. En una realización preferida, una o varias de las paredes laterales del saliente de conexión del recipiente de muestra forman un cuerpo tubular y el cuerpo tubular tiene una rosca externa, lo que permite lograr la conexión entre un recipiente de muestra coincidente y el cuerpo de cartucho mediante enroscado. Preferiblemente, una o varias de las paredes

laterales del saliente de conexión de la cámara de reacción también forman un cuerpo tubular que comprende medios para ensamblar la cámara de reacción. Como se prefiere ensamblar más de una cámara de reacción con un cuerpo de cartucho, se prefiere usar un mecanismo que permita ensamblar un conjunto que comprende múltiples cámaras de reacción a la vez.

- 5 Los conductos de paso de fluido pueden estar formados al menos parcialmente por al menos un canal y/o cavidad formada en la superficie de la placa de base del cuerpo de cartucho. Proporcionar una placa de base al cuerpo de cartucho permite manejar el cuerpo de cartucho con mayor facilidad. Proporcionar los conductos de paso de fluido al menos parcialmente en forma de al menos un canal y/o cavidad formados en la superficie de la placa de base, permite un método de fabricación fácil para crear los conductos de paso de fluido, ya que los canales y/o cavidades se pueden formar fácilmente en la superficie de la placa de base, por ejemplo, moldeando por inyección la placa de base o cortando los canales o cavidades en una placa de base ya proporcionada.

- 10 Un conducto de paso en particular se refiere a un espacio a través del cual puede fluir el fluido respectivo y que guía el flujo del fluido. Por lo tanto, el conducto de paso respectivo generalmente comienza en la abertura de entrada respectiva y termina en la salida de fluido respectiva. Preferiblemente, se proporciona un conducto de paso con al menos un canal y/o cavidad. Esto también incluye conductos de paso, en los que la comunicación fluida se logra mediante un sistema y, por lo tanto, una pluralidad de canales y/o cavidades. Para llegar a la abertura de entrada de fluido respectiva o a la salida de fluido respectiva, que puede estar dispuesta en diferentes lados de un cuerpo de cartucho, también son factibles diseños en donde el conducto de paso respectivo no se puede formar completamente por un canal en la superficie del cuerpo de base. Por ejemplo, los diseños son factibles, cuando el conducto de paso se tiene que guiar al menos parcialmente en forma de un conducto a través de un cuerpo, para alcanzar la abertura de entrada de fluido respectiva o la salida de fluido respectiva.

- 15 En una realización preferida, el cuerpo de cartucho está provisto de una tapa fijada a la placa de base, por lo que la tapa cierra al menos parcialmente los conductos de paso comprendidos en el cuerpo de cartucho. Esto permite que el cuerpo de cartucho se produzca de una manera simple. Como se ha descrito anteriormente, un conducto de paso de fluido se puede diseñar como un conducto que, por ejemplo, se puede perforar en un cuerpo. En comparación con un conducto perforado en un cuerpo, un canal o cavidad comprendido en la superficie del cuerpo de cartucho se puede producir más fácilmente. Para hacer que el (los) conducto(s) de paso de fluido que está formado por uno o varios canales o cavidades, sea estanco para el fluido, está cerrado por al menos una tapa como se describe en esta realización particular. La tapa está provista preferiblemente de una película o lámina de plástico que se puede adherir o fusionar con el cuerpo de cartucho. La tapa puede tener un espesor de 20 μm a 500 μm y preferiblemente se encuentra en un intervalo de 50 μm a 300 μm , más preferiblemente de 75 μm a 250 μm y lo más preferido de 100 μm a 150 μm . En una realización, el cuerpo de cartucho comprende una tapa con partes múltiples, por ejemplo, se pueden usar diferentes segmentos de tapa para cerrar uno o varios canales y/o cavidades de los diferentes conductos de paso de fluido. En una realización preferida, el cuerpo de cartucho comprende una tapa que cierra los canales y/o cavidades de al menos dos, preferiblemente de todos los conductos de paso de fluido. Este diseño simplifica aún más el procedimiento de producción del cuerpo de cartucho.

- 20 En una realización preferida, el cuerpo de cartucho está provisto de una placa de base, en donde la abertura de entrada de fluido B, la salida de fluido B, la abertura de entrada de muestra, la salida de muestra, la abertura de fluido A y la salida de fluido A están dispuestas en la misma superficie de la placa de base. La disposición de las aberturas de entrada de fluido y las salidas de fluido en la misma superficie de la placa de base, permite que el cartucho se inserte en el dispositivo de procesamiento de una manera simple.

- 25 En una realización preferida, la abertura de entrada de fluido B, la abertura de fluido A y/o la salida de fluido A están cerradas por una membrana y un filtro. Además, también uno o varios de los conductos de paso de fluido pueden estar cubiertos, sellados respectivamente, al menos parcialmente a lo largo de su longitud con una membrana como se muestra en las Figuras. Esta medida asegura además de la tapa que ningún líquido, en particular una muestra, pueda salir del cuerpo de cartucho. La membrana o el filtro proporcionado puede tener la función básica de limpiar el fluido que fluye que entra o sale, por ejemplo, al dejar fuera las partículas transportadas por el fluido. Además, con respecto a la membrana o el filtro comprendido en la abertura de fluido A que está en comunicación fluida con la cámara de reacción, el filtro o la membrana se pueden usar como un tipo de válvula, que controla el flujo de fluido, en este caso la muestra. En una realización preferida, la abertura de fluido A está provista de una membrana que solo permite que el aire o fluidos similares pasen a través de ella, pero evita el paso de fluidos de otro tipo, especialmente fluidos de mayor densidad y/o especialmente agua o fluidos a base de agua, como la muestra. En una realización preferida, la membrana es hidrófoba. El uso de una membrana de ese tipo permite controlar el tipo de fluido que puede fluir fuera de la cámara de reacción. La muestra puede entrar en la cámara de reacción a través de la salida de muestra. El fluido que entra en la cámara de reacción será conducido con sobrepresión a la cámara de reacción. Sin embargo, el aire puede escapar a través de la membrana comprendida en la abertura de fluido A, permitiendo de este modo que entre una muestra adicional en la cámara de reacción. Sin embargo, la muestra líquida no puede atravesar dicha membrana. De este modo, se controla la cantidad de muestra comprendida en la cámara de reacción. La cámara de reacción se bloquea básicamente tan pronto como la membrana entra en contacto con la muestra. Por lo tanto, proporcionar una abertura de fluido A, que comprende una membrana o filtro hidrófobo respectivo, proporciona la posibilidad de controlar la presión en la cámara de reacción y controlar la cantidad de muestra que entra en la cámara de reacción a través de la salida de muestra. El tamaño de la cámara

de reacción puede ser tal, que una vez que prácticamente todo el aire ha salido de la cámara de reacción a través de la membrana comprendida en la abertura de fluido A y, por lo tanto, la cámara de reacción se ha llenado completa o casi completamente con la muestra, una cantidad predeterminada de muestra se proporciona en la cámara de reacción para reconstituir la composición seca que es necesaria para proporcionar una composición reconstituida que comprende los reactivos en la concentración necesaria.

En una realización preferida, el cuerpo de cartucho es un elemento de una pieza. En una realización especialmente preferida, el elemento de una pieza se produce mediante un moldeo doble o moldeado por inyección. En una realización alternativa, el cuerpo de cartucho tiene un cuerpo de cartucho de una pieza y una tapa fijada al cuerpo de base de una pieza. Esto permite una producción más simple del cuerpo de cartucho. La tapa se puede preparar preferiblemente como una lámina que tiene ciertas áreas de la lámina provistas de un adhesivo y, por lo tanto, permite que la tapa se fije permanentemente al cuerpo de base.

De acuerdo con una realización, el conducto de paso de la muestra y/o el conducto de paso de fluido A pueden estar dispuestos con una válvula. La válvula está diseñada preferiblemente para evitar el flujo de fluido a través del conducto de paso de fluido respectivo. Las ventajas se han descrito anteriormente y en particular se aplican si se realiza una reacción de calentamiento en el recipiente de muestra y/o la cámara de reacción. Como se ha descrito anteriormente, se puede realizar una realización fácil de una válvula, si el conducto de paso de fluido respectivo está diseñado para tener una barra, tal como una pared que bloquea el canal, interrumpiendo de este modo el canal. Para formar la válvula, un canal de ese tipo se puede cerrar con una tapa que comprende un elemento móvil, por ejemplo, una placa flexible en la zona de la pared. El área móvil se puede mantener presionada por medios mecánicos, por ejemplo, un pasador o fuerza comprendida en el dispositivo de procesamiento. Si el pasador se retrae, la presión del fluido en el conducto de paso empujará hacia atrás la parte móvil de la tapa y se permitirá que el fluido fluya sobre la pared provista en el canal. De acuerdo con una realización, la parte móvil de la tapa se conectará con la parte restante de la tapa por medios flexibles que, por un lado, permiten que la parte móvil se mueva, por otro lado proporcionarán la estanqueidad necesaria al fluido que impide que el fluido en el conducto de paso fluya a ningún otro lugar que no sea la parte adicional del conducto de paso de fluido que sigue después de la pared. En una realización alternativa, la tapa misma puede comprender una barra, tal como una pared que se puede mover dentro del conducto de paso de fluido para bloquearla. Por ejemplo, la parte móvil descrita anteriormente puede comprender la pared. Si la parte móvil se mueve hacia abajo, la pared se mueve hacia abajo y bloquea el conducto de paso del fluido, cerrando de este modo la válvula diseñada de esa manera.

El cuerpo de cartucho puede comprender al menos un saliente de conexión adicional para conectar una cámara de reacción adicional, en donde dicho saliente de conexión adicional puede comprender los mismos elementos que el saliente de conexión de la cámara de reacción descrito anteriormente. Usar más de una cámara de reacción tiene la ventaja de que se puede realizar más de una reacción de análisis usando el mismo cartucho. Esto permite analizar la misma muestra, por ejemplo, buscando la presencia de diferentes agentes patógenos o enfermedades.

De acuerdo con un octavo aspecto, se proporciona un método para la producción de un cartucho de procesamiento según el quinto aspecto, en donde dicho cartucho de procesamiento debe comprender al menos una cámara de reacción que comprende una composición seca que comprende reactivos para llevar a cabo un método analítico. Dicho método comprende las siguientes etapas:

(a) preparar a partir de un polímero, un cuerpo de cartucho con al menos un canal y/o una cavidad para proporcionar un conducto de paso de fluido entre la abertura de entrada de muestra del cuerpo de cartucho y la al menos una salida de muestra del cuerpo de cartucho;

(b) depositar reactivos en al menos una cámara de reacción y secar los reactivos en la misma, proporcionando de este modo una cámara de reacción que comprende una composición seca que comprende reactivos para llevar a cabo un método analítico;

(c) cerrar el al menos un canal y/o cavidad del cuerpo de cartucho con una tapa.

Una o varias de las cámaras de reacción se proporcionan preferiblemente como dispositivo(s) separado(s). Esto simplifica el depósito de los reactivos y el proceso de secado, que es preferiblemente un proceso de liofilización. Los detalles con respecto a la composición seca y los componentes comprendidos en la misma se describieron anteriormente junto con el primer aspecto. Se hace referencia a la descripción respectiva. Después de obtener la composición seca en una o varias de las cámaras de reacción, dicho método comprende una etapa de ensamblar al menos una cámara de reacción con el cuerpo de cartucho. Preferiblemente, dicho ensamblaje se realiza después de la etapa c).

El cuerpo de cartucho se produce preferiblemente mediante tecnología de moldeo por inyección. Como se ha descrito anteriormente, el cuerpo de cartucho comprende preferiblemente al menos una membrana. Se produce en un procedimiento de múltiples etapas, en donde la al menos una membrana se ensambla en el molde de inyección y en donde en una primera etapa, se inyecta el lado superior o inferior del cartucho y en una segunda etapa, el otro lado es inyectado, proporcionando de este modo el cuerpo de cartucho que comprende la membrana.

De acuerdo con un noveno aspecto, se proporciona un sistema para llevar a cabo un método analítico de una

muestra que comprende biomoléculas, que comprende

a) un cartucho de procesamiento de acuerdo con el quinto aspecto; en donde el cartucho de procesamiento comprende al menos una cámara de reacción que comprende una composición seca que comprende reactivos para el método analítico;

5 b) un recipiente para recibir una muestra que comprende biomoléculas, en donde el recipiente se puede ensamblar con el cartucho de procesamiento;

c) un dispositivo de procesamiento para recibir el cartucho de procesamiento que comprende el recipiente ensamblado con el mismo y para realizar el método de análisis junto con el cartucho de procesamiento.

10 Dicho sistema comprende un cartucho de procesamiento como se ha descrito anteriormente. Además, el sistema comprende un recipiente para recoger una muestra que comprende biomoléculas, en donde el recipiente se puede conectar con el cartucho de procesamiento. Como tercer elemento, el sistema comprende un dispositivo de procesamiento para recibir el cartucho y realizar el método analítico dentro del cartucho de procesamiento. El diseño del dispositivo de procesamiento depende del método analítico que se va a realizar. Algunos detalles se describirán posteriormente junto con el método operativo para llevar a cabo un método analítico utilizando el sistema respectivo.

15 De acuerdo con un décimo aspecto, se proporciona un método operativo para llevar a cabo un método de análisis utilizando el sistema según el noveno aspecto, en donde el método comprende:

a) conectar un recipiente que comprende una muestra al cartucho de procesamiento de acuerdo con el quinto aspecto;

b) insertar el cartucho de procesamiento en un dispositivo de procesamiento; y

20 c) comenzar un ensayo completamente automatizado.

Posteriormente, explicaremos las etapas individuales del método operativo respectivo. En una primera etapa, se obtiene una muestra y se inserta en el recipiente. El recipiente comprende preferiblemente una composición de lisis adecuada para lisar la muestra recogida y que es adecuada para la reconstitución de la composición seca comprendida en la cámara de reacción del cartucho de procesamiento. La composición de lisis es preferiblemente una solución de lisis como se ha descrito anteriormente. El recipiente que comprende la muestra se puede cerrar, por ejemplo, para poder manejar el recipiente sin riesgo de derramar la muestra comprendida. Para iniciar el método operativo, el recipiente que comprende la muestra y la composición de lisis se conecta con el cartucho de procesamiento. Para este fin, el cartucho de procesamiento comprende medios adecuados que permiten una conexión estrecha entre el recipiente y el cartucho. Los detalles se han descrito anteriormente. Tan pronto como el
25 recipiente se ha conectado con el cartucho, el cartucho que comprende el recipiente ensamblado con el mismo se puede insertar en el dispositivo de procesamiento. Por lo tanto, todo lo que necesita hacer el usuario es conectar el recipiente que comprende la muestra recogida con el cartucho de procesamiento y la inserción en el dispositivo de procesamiento. Todas las etapas posteriores se realizan automáticamente.

De acuerdo con una realización preferida, la muestra se lisa dentro del recipiente. Preferiblemente, la composición de lisis comprendida en el recipiente comprende un soporte sólido como se ha descrito anteriormente para aclarar la muestra lisada. Preferiblemente, la lisis se facilita mediante calentamiento. Para este fin, el dispositivo de procesamiento puede comprender una unidad de calentamiento. Además, si se usa un soporte sólido magnético para aclarar el lisado, el dispositivo de procesamiento comprende preferiblemente un imán con el fin de permitir recoger en el soporte sólido magnético los precipitados/contaminantes unidos en el fondo o la pared lateral del
40 recipiente. De este modo, la muestra lisada se puede aclarar de manera muy eficaz. La muestra lisada, que preferiblemente es una muestra lisada aclarada, entra al cartucho de procesamiento a través de la abertura de entrada de muestra. Preferiblemente, el cartucho de procesamiento tiene un diseño de cuerpo de cartucho como se ha descrito anteriormente junto con el quinto y/o sexto aspecto, con una abertura de entrada de fluido B, un primer conducto de paso de fluido y una salida de fluido B, así como una abertura de entrada de muestra. Como se ha descrito anteriormente, el sistema fluido respectivo proporciona un diseño muy simple para lograr transportar la muestra, preferiblemente el lisado aclarado, al cartucho de procesamiento. El dispositivo de procesamiento puede comprender un aparato generador de presión que permite bombear aire a través de la abertura de entrada de fluido B. El aire entra en el recipiente de reacción a través del primer conducto de paso de fluido y la salida de fluido B. La presión resultante tiene el efecto de que la muestra comprendida en el recipiente, que preferiblemente es un lisado aclarado, se empuja hacia arriba y, por lo tanto, entra en el cartucho de procesamiento a través de la abertura de
50 entrada de muestra, que preferiblemente está diseñada como una abertura de entrada de muestra como se ha descrito anteriormente. Otras formas de lograr la entrada de la muestra se han descrito anteriormente.

Con el fin de facilitar la entrada de la muestra, el cartucho de procesamiento comprende preferiblemente un tubo que se extiende dentro del recipiente y que preferiblemente se extiende dentro de la muestra, que preferiblemente es una muestra lisada aclarada. Al entrar en el cartucho de procesamiento a través de la abertura de entrada de muestra, la muestra pasa a través del conducto de paso de muestra hasta llegar a la salida de muestra. Desde la salida de muestra, la muestra, que preferiblemente es un lisado aclarado obtenido como se ha descrito

- anteriormente, entra en la cámara de reacción que comprende una composición seca. De este modo, la muestra, que preferiblemente es una muestra lisada, entra en contacto con la composición seca y, por consiguiente, la reconstituye. El procedimiento de reconstitución se puede facilitar, por ejemplo, mediante una mezcla, agitando vorticialmente o direccionamiento magnético como se ha descrito anteriormente. En caso de que la composición
- 5 seca comprenda un material magnético para permitir un direccionamiento magnético, como por ejemplo una lámina magnética, el dispositivo de procesamiento comprende un imán que permite el movimiento del material magnético comprendido en la composición seca dentro de la cámara de reacción. De acuerdo con una realización, el dispositivo de procesamiento comprende un electroimán con voltaje de corriente alterna. De acuerdo con otra realización, se proporciona un imán permanente giratorio.
- 10 El llenado de la cámara de reacción se controla para garantizar que solo se use una cantidad predeterminada de líquido para reconstituir la composición seca. De acuerdo con una realización preferida, el llenado de la cámara de reacción con la muestra se detiene tan pronto como la muestra alcanza la membrana hidrófoba que forma una barrera para la muestra líquida. Como se muestra en las figuras, dicha membrana hidrófoba se ubica preferiblemente en el extremo de la tercera abertura de entrada de fluido.
- 15 Después de la reconstitución de la composición seca, se puede realizar el método analítico. El dispositivo de procesamiento comprende la maquinaria necesaria para realizar el método analítico. Por ejemplo, si se realiza una amplificación de ácido nucleico, el dispositivo de procesamiento comprende en el área en donde están ubicadas las cámaras de reacción, todos los elementos que son necesarios para realizar una reacción de PCR, como en particular elementos de calentamiento y enfriamiento. Además, el dispositivo de procesamiento comprende
- 20 preferiblemente un detector de fluorescencia para poder realizar una PCR en tiempo real y/o para poder detectar señales fluorescentes. Sin embargo, el dispositivo de procesamiento también puede comprender otros medios para realizar una detección, como por ejemplo una medición espectrofotométrica, una medición de la turbidez, la determinación de una agregación de nanopartículas y similares. El resultado del ensayo se presenta preferiblemente también mediante el dispositivo de procesamiento, por ejemplo, en una unidad de lectura.
- 25 Todo el sistema de acuerdo con la presente invención es único debido a su diseño muy simple y a la fluidez muy simple. El cartucho de procesamiento utiliza una membrana hidrófoba para detener la muestra y estructura(s) de dosificación y no comprende válvulas complicadas, sino que puede cerrar temporalmente los conductos de paso de fluido mediante barreras tales como barras/paredes. Además, es capaz de mover la muestra dentro del sistema simplemente bombeando aire en el recipiente o haciendo uso de la sobrepresión que se genera cuando la muestra
- 30 se calienta en el recipiente que está conectado al cartucho de procesamiento. Por lo tanto, en contraste con otros cartuchos y sistemas de procesamiento, todo el diseño se reduce a un mínimo, lo que permite una producción rentable de todos los elementos. Después de completar el ensayo, se puede desechar todo el cartucho de procesamiento junto con el recipiente que está conectado al mismo. Después de ensamblar el recipiente con el cartucho de procesamiento, todo el sistema se cierra, evitando de este modo que la muestra comprendida en el
- 35 cartucho o, por ejemplo, los productos de una amplificación puedan salir del cartucho. Para este fin, se usan membranas adecuadas. El único líquido que se tiene que usar para realizar el método analítico proviene del recipiente que comprende la muestra. El recipiente es un recipiente de recogida que al mismo tiempo funciona como un recipiente de procesamiento de muestras debido a la preparación de la muestra para el análisis dentro del cartucho de procesamiento, por ejemplo, la lisis de la muestra, se realiza en el mismo. Además, el recipiente también funciona como un depósito de líquido que comprende el único líquido, a saber, la muestra, que, si es necesario, se trata previamente para que sea adecuada para una reconstitución de la composición seca que está comprendida en la cámara de reacción. Si los ácidos nucleicos son las biomoléculas de interés, la muestra se lisará y se eliminará preferiblemente dentro del recipiente como se ha descrito anteriormente junto con el primer aspecto.
- 40 La muestra que entra en el cuerpo de cartucho a través de la abertura de entrada de muestra, es adecuada para reconstituir la composición seca que está comprendida en la cámara de reacción, de modo que la composición reconstituida es adecuada para realizar el método analítico pretendido que comprende, por ejemplo, una reacción de amplificación y detección, con la sensibilidad y/o especificidad requeridas. De acuerdo con una realización, la muestra se prepara para este fin en el recipiente, por ejemplo, lisada y aclarada como se ha descrito anteriormente. El recipiente comprende preferiblemente de 500 µl a 3 ml de una solución de lisis y/o estabilización. Una solución de
- 45 lisis preferida para preparar la muestra para un análisis de ácido nucleico se ha descrito anteriormente. Dicha solución de lisis comprende preferiblemente un soporte sólido para aclarar el lisado como se ha descrito anteriormente. La unidad para la prueba funcional se obtiene conectando el recipiente con el cartucho de procesamiento.
- 50 El dispositivo de procesamiento para llevar a cabo los protocolos de un ensayo usando el presente cartucho de procesamiento comprende un sistema mecánico elaborado. El diseño depende del método analítico que se va a realizar. Las principales características mecánico-electrónicas dentro del dispositivo de procesamiento son elementos de calentamiento para favorecer la lisis de la muestra, una bomba adecuada para bombear aire al recipiente cuando el recipiente se ensambla con el cartucho de procesamiento, al menos un imán para el direccionamiento magnético. Además, se proporciona una unidad de PCR en caso de que se realice una reacción de
- 55 PCR. Los ciclos térmicos de una reacción de PCR que se realiza dentro del dispositivo de procesamiento son facilitados comúnmente por elementos Pelletier. Todas las conexiones entre el cartucho de procesamiento y el dispositivo de procesamiento preferiblemente están selladas con una membrana. Todo el sistema comprende una baja complejidad.
- 60

Los intervalos numéricos a los que se hace referencia en este documento incluyen los números que definen el intervalo. Los títulos proporcionados en el presente documento no son limitaciones de los diversos aspectos o realizaciones de esta descripción que se pueden leer haciendo referencia a la memoria descriptiva en su conjunto. De acuerdo con una realización, el objeto descrito en el presente documento que comprende ciertas etapas en el caso de métodos o que comprende ciertos ingredientes en el caso de composiciones, soluciones y/o tampones, se refiere al objeto que consiste en las etapas o ingredientes respectivos. Se prefiere seleccionar y combinar realizaciones preferidas descritas en el presente documento y el contenido específico que surge de una combinación respectiva de realizaciones preferidas también pertenece a la presente descripción.

Descripción de las Figuras

10 La Fig. 1 muestra los resultados de una PCR cuantitativa usando lisados aclarados que se obtuvieron de acuerdo con el ejemplo 1 y lisado no aclarado (referencia). MasG: Suspensión G MagAttract (QIAGEN); MasB: Suspensión B MagAttract (QIAGEN), Seradyn (partículas magnéticas carboxiladas); ref: lisado sin tratamiento con partículas magnéticas (aclaramiento).

15 La Fig. 2 muestra los resultados del ejemplo 2, en donde se analizaron diferentes perlas para el aclaramiento del lisado. Una referencia se procesó sin perlas pero con sangre (sin aclaramiento del lisado) y la segunda referencia se sometió a ensayo sin perlas y sin sangre pero con bacterias añadidas. Por lo tanto, la segunda referencia muestra los resultados de una PCR en donde básicamente no están presentes compuestos inhibidores de la PCR/contaminantes.

20 La Fig. 3 demuestra la eficacia del procedimiento de aclaramiento del lisado de acuerdo con la presente invención. En el lado izquierdo, se muestra un lisado de sangre no aclarado, en el lado derecho, la misma muestra en donde, sin embargo, se ha realizado el aclarado del lisado de acuerdo con la presente invención.

La Fig. 4 muestra los resultados del ejemplo 3, en donde se usaron siete muestras diferentes de torundas vaginales para producir un lisado aclarado; se usaron 10 µl de lisado aclarado o crudo (sin aclarar) directamente en una PCR cuantitativa.

25 La Fig. 5 muestra los resultados de cuatro muestras diferentes de torundas vaginales que se lisaron y en las que el lisado se aclaró usando diferentes tipos de partículas magnéticas. Se usaron 10 µl de lisado en una PCR cuantitativa. Seradyn (perlas carboxiladas); MasG (suspensión G MagAttract (QIAGEN)); MasB (suspensión B MagAttract (QIAGEN)).

30 La Fig. 6 muestra muestras de torundas vaginales agrupadas que se procesaron usando diferentes partículas magnéticas y en las que se usaron diferentes volúmenes del lisado aclarado directamente en una PCR cuantitativa, en donde se detectó ADN genómico humano. Las composiciones secas de la PCR se reconstituyeron añadiendo 25 µl del lisado o lisado aclarado.

35 La Fig. 7 muestra el efecto beneficioso de la incorporación de zeolitas durante la lisis cuando se procesan muestras ácidas tales como muestras de torundas vaginales. Las muestras se procesaron con y sin zeolitas de acuerdo con el ejemplo 6.

La Fig. 8 muestra los resultados del ejemplo 7, en donde las muestras de sangre se procesaron con y sin zeolitas y se usaron directamente diferentes volúmenes de lisado directamente en una PCR cuantitativa para detectar ADN genómico de *E. coli*. Se usaron 25 µl de lisado aclarado para reconstituir una mezcla seca de PCR que comprendía los cebadores y las sondas.

40 La Fig. 9 muestra los resultados del ejemplo 8. Se procesaron muestras de torundas bucales procedentes de ocho donantes diferentes con y sin zeolitas, y con diferentes volúmenes de lisado que se usaron directamente en una PCR cuantitativa.

45 La Fig. 10 muestra los resultados del ejemplo 9, en donde se procesaron muestras de torundas de heces procedentes de 16 preparaciones independientes con perlas Seradyn; y diferentes volúmenes de los lisados aclarados obtenidos se usaron directamente en una PCR cuantitativa, en donde se detectó ADN genómico de *E. coli* y un gen humano.

50 La Fig. 11 muestra el efecto sobre la PCR cuando se eliminan los precipitados usando perlas magnéticas carboxiladas (véase el ejemplo 11). Las muestras 1, 2, 5 y 7 son muestras de torundas vaginales a las que no se añadieron perlas magnéticas para aclarar el lisado. Las muestras 3, 4, 6 y 8 son lisados aclarados que se obtuvieron añadiendo partículas magnéticas carboxiladas al lisado de las muestras de torundas vaginales.

La Fig. 12 a) muestra el cuerpo de cartucho de acuerdo con la invención en una vista superior, y la Fig. 12 b) muestra el cuerpo de cartucho de acuerdo con la figura 12 a) en una vista lateral cortada a lo largo de la línea A-A en la figura 12 a).

La Fig. 13 muestra una vista lateral del cuerpo de cartucho de acuerdo con la Fig. 12 con un recipiente de muestra

ensamblado y cámaras de reacción.

La Fig. 14 muestra el cartucho de acuerdo con la invención en una vista en perspectiva desde abajo.

La Fig. 15 muestra una vista en perspectiva despiezada de una realización adicional del cartucho de acuerdo con la invención.

5 La Fig. 16 es una vista superior del cartucho de la muestra como se muestra en la Fig. 15.

La Fig. 17 muestra un dispositivo que comprende múltiples cámaras de reacción que se pueden ensamblar con el cartucho para proporcionar el cartucho de procesamiento que comprende las cámaras de reacción.

La Fig. 18 ilustra la función de las paredes dentro de los conductos de paso de fluido 6 y 9 que funcionan como una válvula.

10 La Fig. 19 ilustra el sistema de acuerdo con la presente invención.

La Fig. 20 ilustra esa recogida de la muestra.

La Fig. 21 ilustra la realización de diferentes realizaciones de la presente invención para llevar a cabo la lisis de la muestra y la reconstitución de la mezcla de PCR liofilizada como se describe en el ejemplo 12.

15 El cuerpo de cartucho 33 que se muestra en la figura 12 a) tiene una abertura de entrada de fluido B (1) y una salida de fluido B (2). Se proporciona un conducto de paso de fluido B (3) que bordea paredes dispuestas en la superficie superior del cuerpo de cartucho. De este modo, se forma una cavidad que permite el paso de un fluido. Por lo tanto, en la realización mostrada en la figura 12 a) se proporciona un conducto de paso de fluido B (3) que tiene una sección transversal aproximadamente cuadrada, por lo que la abertura de entrada de fluido B (1) está dispuesta en una esquina del conducto de paso de fluido cuadrado B (3) y la salida de fluido B (2) está dispuesta en una segunda esquina del conducto de paso de fluido B (3). El fluido, preferiblemente aire, que puede entrar en el conducto de paso de fluido B (3) a través de la abertura de entrada de fluido B (1), fluye desde la abertura de entrada de fluido B (1) a través del conducto de paso de fluido de forma cuadrada B (3) hacia el salida de fluido B (2) y entra en el recipiente de muestra, si un recipiente de muestra está conectado con el cuerpo de cartucho. Como se ha descrito en el presente documento, se puede conectar una bomba con la abertura de entrada de fluido B (1) para introducir 20 aire con presión en el cartucho y, por lo tanto, en el recipiente de muestra, facilitando de este modo la entrada de la muestra en el cartucho. El cuerpo de cartucho 33 que se muestra en la Fig. 12 a) está provisto además de una abertura de entrada de muestra 4 y una salida de muestra 5. La abertura de entrada de muestra 4 y la salida de muestra 5 están conectadas por un conducto de paso de muestra 6. Se crea el conducto de paso de muestra 6 mediante un canal en la superficie superior del cuerpo de cartucho. Una muestra que entra en el cuerpo de cartucho desde el recipiente a través de la abertura de entrada de muestra 4, fluye a lo largo del conducto de paso de muestra 6 hasta que llega a la salida de muestra 5 a través de la cual entra en la cámara de reacción, si la cámara de reacción se ensambla con el cuerpo de cartucho 33. La realización mostrada en la Fig. 12 está configurada para recibir cuatro cámaras de reacción que están conectadas con el cuerpo de cartucho a través de los cuatro salientes de conexión de la cámara de reacción del cuerpo de cartucho 33. El o los salientes de conexión de la cámara de reacción se pueden ver en la Fig. 12b). Después de ensamblar las cámaras de reacción, están en comunicación fluida con el conducto de paso de muestra 6 que se ramifica y en donde cada ramificación termina en una salida de muestra diferente que se abre en una cámara de reacción diferente. Sin embargo, como se describe en este documento, también está dentro del alcance proporcionar la cámara de reacción como parte integral del cuerpo de cartucho.

40 Además, el cuerpo de cartucho está provisto de una abertura de fluido A (7) y una salida de fluido A (8). Un conducto de paso de fluido A (9) que está diseñado de manera similar al conducto de paso de muestra 6, es un canal en la superficie superior del cuerpo de cartucho que conecta la abertura de fluido A (7) y la salida de fluido A (8). La abertura de fluido A (7) y la salida de muestra 5 están diseñadas cada una como un tubo que está comprendido parcialmente en una convexidad de una pared lateral del saliente de conexión de la cámara de reacción. Dichos 45 tubos están en comunicación fluida con la cámara de reacción. La abertura de fluido A (7) y la salida de muestra 5 están dispuestas de forma opuesta entre sí. Diseñar la abertura de fluido A (7) y la salida de muestra 5 como tubos al menos parcialmente en la pared lateral de la cámara de reacción, tiene la ventaja de que el flujo del fluido hacia la cámara de reacción está bien regulado. La entrada de la muestra en la cámara de reacción a través de la salida de muestra tubular 5 es similar a si la muestra se pipeteara manualmente en la pared lateral de la cámara de reacción. De este modo, se puede evitar una descarga incontrolada en la cámara de reacción de la muestra que podría dar como resultado un llenado irregular de la cámara de reacción. La abertura de fluido A (7) comprende una membrana hidrófoba como barrera para líquidos. La membrana evita que un líquido, tal como en particular la muestra que entra en la cámara de reacción, pase por dicha barrera. Por lo tanto, gracias a la membrana en la abertura de fluido A, no puede entrar líquido en el conducto de paso de fluido A (9). Sin embargo, la membrana hidrófoba permite que pase el aire, al menos antes de que se humedezca con un líquido. De este modo, el aire que es desplazado por la muestra puede salir del conducto de paso de muestra 6 y la cámara de reacción a través de la abertura de fluido A (7). Por lo tanto, con respecto al aire, la abertura de fluido A (7) se puede considerar como una abertura de entrada de fluido, que guía el aire hacia el conducto de paso de fluido 9 desde el cual sale del cartucho a través de la salida

de fluido A (8). La salida de fluido A (8) y la entrada de fluido B (1) comprenden ambas una membrana hidrófoba para sellar el cartucho frente a una fuga involuntaria de líquido, en particular de la muestra y/o los productos de reacción (por ejemplo, amplicones) comprendidos en la cámara de reacción. Este sellado hermético del fluido del cartucho de procesamiento una vez que se ensambla el recipiente de muestra, tiene la ventaja de que todo el cartucho de procesamiento, incluyendo el recipiente de muestra conectado, se puede desechar fácilmente después del uso.

El conducto de paso de muestra 6 y el conducto de paso de fluido 9 comprenden pequeñas barras 54 que bloquean los conductos de paso de fluido 6 y 7 al interrumpir el canal que proporciona el conducto de paso de fluido. Junto con la tapa (no mostrada) del cartucho de procesamiento que preferiblemente es una lámina que cierra el cuerpo de cartucho, las barras funcionan como una válvula que permite cerrar de manera reversible y, por lo tanto, sellar el conducto de paso de muestra 6 y el conducto de paso de fluido A. Esto es ventajoso porque se evita que un líquido, como por ejemplo, agua evaporada que se origina a partir de una reacción de calentamiento que se realiza en el recipiente de muestra conectado o en la cámara de reacción ensamblada, atraviese el conducto de paso de muestra 6 y el conducto de paso de fluido A. Con respecto al conducto de paso de muestra 6, se evita ventajosamente que un líquido tal como agua que se evapora del recipiente de muestra durante una etapa de calentamiento que se realiza para lisar la muestra, atraviese accidentalmente el conducto de paso de muestra 6 y llegue a la cámara de reacción que comprende la composición seca. Ese escape de líquido evaporado puede dar como resultado una rehidratación parcial de la composición seca comprendida en la cámara de reacción, lo que puede comprometer dicha composición seca, comprometiendo de este modo el rendimiento del método analítico posterior. Al aplicar una presión sobre la tapa durante el tratamiento térmico que se realiza para la lisis de la muestra, las válvulas se cierran, evitando de este modo que el líquido evaporado llegue a la cámara de reacción. Después de la lisis, la presión se retira de la tapa, abriendo de este modo la válvula y permitiendo que la muestra fluya sobre las pequeñas barras 54, que en consecuencia puede entrar en la cámara de reacción a través de la salida de muestra 5. Con respecto al bloqueo del conducto de paso de fluido A (9), se puede evitar una evaporación del líquido comprendido en la cámara de reacción. Aunque la abertura de fluido A (7) comprende una membrana hidrófoba, la membrana a veces no puede evitar completamente una evaporación si se lleva a cabo una etapa de calentamiento en la cámara de reacción, debido a la presión generada. Por lo tanto, proporcionar una barra 54 en el conducto de paso de fluido A (9) es particularmente ventajoso si se lleva a cabo una etapa de calentamiento en la cámara de reacción.

Como se puede observar en la Fig. 12 b), el cuerpo de cartucho está provisto de un saliente de conexión de recipiente de muestra 10. El saliente de conexión de recipiente de muestra 10 está formado por paredes laterales 11 que incluyen una primera cámara 12 que está formada además por una pared de base 13 y que tiene una abertura 14 opuesta a la pared de base 13. Las paredes laterales del saliente de conexión están adaptadas para encajarse en una abertura de un recipiente de muestra y para que el recipiente de muestra se conecte a las paredes laterales 11 del saliente de conexión 10. Como se puede observar en la figura 12 b), la abertura de entrada de muestra 4 está dispuesta en la pared de base 13. Como se puede observar en la figura 12 a), la salida de fluido B (2) también está dispuesta en la pared de base 13. El recipiente de muestra se puede conectar con las paredes laterales 11 del saliente de conexión de recipiente de muestra 10 por medio de una rosca externa 15 provista en el exterior de las paredes laterales 11.

El cuerpo de cartucho está provisto además de un saliente de conexión de cámara de reacción 20 que está formado por las paredes laterales 21 que incluyen una segunda cámara 22 que está formada además por una pared de base 23 y que tiene una abertura 24 opuesta a la pared de base 23. Las paredes laterales 21 del saliente de conexión están adaptadas para encajar en una abertura de un receptáculo que forma la cámara de reacción. Dicho receptáculo que forma la cámara de reacción se puede conectar con las paredes laterales del saliente de conexión de la cámara de reacción 20. Como se puede observar en la Fig. 12 b) la salida de muestra 5 está dispuesta como un tubo o canal en una de las paredes laterales 21 y se abre en el extremo inferior de la pared lateral 21. Del mismo modo, la tercera abertura de fluido A (7) está dispuesta en una de las paredes laterales 21 y se abre en el extremo inferior de esa pared lateral 21. La membrana hidrófoba se proporciona en el extremo superior.

Como se puede ver en la Fig. 12 b) se proporciona un tubo 30. El tubo 30 tiene una primera abertura terminal 31 y una segunda abertura terminal 32. La primera abertura terminal 31 está alineada con la abertura de entrada de muestra 4. Como se puede observar en la Fig. 12 b) el tubo 30 está dispuesto en una pieza con el cuerpo de cartucho 33.

La Fig. 13 a) muestra una vista lateral del mismo cuerpo de cartucho 33 mostrado en la Fig. 12, en donde se ha ensamblado un recipiente de muestra 39 con el cuerpo de cartucho. Después de ensamblar, el tubo 30 sobresale en el recipiente de muestra 39 y, por lo tanto, se ubica dentro de la solución de lisis cuando el tubo de muestra 39 se llena con la solución de lisis y la muestra que se va a analizar, facilitando de este modo la entrada de la muestra. Además, el cartucho de procesamiento de muestra comprende una cámara de reacción 38 que comprende la composición seca que comprende reactivos para realizar el método analítico de interés. Como se puede observar en la Fig. 13 b), se proporcionan cuatro cámaras de reacción 38 (a) a 38 (d). Las cámaras de reacción 38 se proporcionan como un dispositivo separado que se monta sobre los salientes de conexión de la cámara de reacción 20 para ensamblar con el cartucho.

La Fig. 13 b) muestra el dispositivo que comprende las cámaras de reacción 38 (a) a 38 (d) según la Fig. 13 a) en

una vista lateral cortada, a lo largo de la línea A - A en la Fig. 13 a). Las cámaras de reacción 38 (a) a 38 (d) que comprenden los reactivos secos para realizar el método analítico, se ensamblan a través de los salientes de conexión de la cámara de reacción 20 con el cuerpo de cartucho 33. La abertura de fluido A (7) está sellada por una membrana 40 que es hidrófoba y porosa y permite el paso de aire pero no de líquido. El paso de aire se impide una vez que la membrana hidrófoba 40 se ha humedecido con un líquido. Por lo tanto, la cámara de reacción 38 se sella tan pronto como la muestra humedece la membrana hidrófoba 40.

El cuerpo de cartucho 33 mostrado en las Figs. 12 y 13 puede formar parte de un cartucho de procesamiento que se ensambla con un recipiente de muestra 39 como se muestra en la Fig. 14. En la realización mostrada en las Figs. 12, 13 y 14, el cartucho está diseñado para tener cuatro cámaras de reacción 38. Por esta razón, el conducto de paso de muestra 6 del cuerpo de cartucho que se muestra en la Fig. 12 se ramifica, en donde cada ramificación termina en una salida de muestra para cada cámara de reacción. Además, cada cámara de reacción comprende, respectivamente está conectada, a una abertura de fluido A (7), permitiendo de este modo que la muestra fluya a las cámaras de reacción correspondientes y permitiendo que se escape el aire. Las cámaras de reacción 38 están conectadas con el conducto de paso de fluido A (9) para guiar el aire que se escapa de las cámaras de reacción a través de las correspondientes aberturas de fluido A, hacia la salida de fluido A desde la cual sale del cartucho. Como se muestra en la Fig. 13 b), la abertura de fluido A (7) de todas las cámaras de reacción comprende una membrana 40 para permitir que el aire salga de la cámara de reacción y controlar el llenado de la cámara de reacción. En este caso, se usa una membrana 40 que atraviesa todas las aberturas de fluido A (7). La cámara de reacción 38 contiene la composición seca que comprende reactivos para realizar una reacción de amplificación, tales como cebadores, sondas, enzimas, dNTPs y un tampón.

Como se muestra en la Fig. 14, un recipiente de muestra 39 se puede ensamblar con el cuerpo de cartucho 33. El recipiente de muestra 39 tiene una abertura de recipiente de muestra que está dispuesta de tal manera que la abertura del recipiente de muestra está en conexión fluida con la abertura de entrada de muestra 4 que comprende en este caso un tubo 30. El recipiente de muestra 39 tiene una rosca interna y se enrosca en la rosca externa 15 del saliente de conexión del recipiente de muestra 10. El recipiente de muestra 39 contiene la muestra que se va a analizar. Como se ha descrito anteriormente, en una realización preferida, la muestra se mezcla con una solución de lisis como se ha descrito anteriormente. La solución de lisis comprende preferiblemente un soporte sólido para aclarar el lisado. Preferiblemente, se usan perlas carboxiladas. De este modo, la muestra se trata previamente y se prepara para el análisis. La muestra aclarada puede entrar entonces en el conducto de paso de muestra 6 a través de la abertura de entrada de muestra 4. Sin embargo, también está dentro del alcance de la presente invención que la muestra mezclada con la solución de lisis entre en el conducto de paso de muestra 6 a través de la abertura de entrada de muestra 4 y en donde la lisis tiene lugar, respectivamente se completa, en el cartucho, por ejemplo, dentro de la cámara de reacción 38 después de la reconstitución de los reactivos secos, por ejemplo, durante una etapa de calentamiento realizada en una reacción de PCR.

La Fig. 15 muestra una realización adicional del cartucho. A los elementos similares se les han asignado los mismos números de referencia pero incrementados por un valor de 100, en comparación con los elementos comparables en las realizaciones mostradas en las Fig. 12 a 14. La realización mostrada en la Fig. 15 muestra que al conducto de paso de fluido B (103) se le puede proporcionar en toda su longitud una membrana 150. La Fig. 15 también muestra que al conducto de fluido A (109) se le puede proporcionar en toda su longitud una membrana 151. La Fig. 15 también muestra que una tapa 152 se puede fijar al cuerpo de cartucho 133 para sellar herméticamente todos los conductos de paso de fluido. La tapa 152 está fijada al cuerpo de cartucho 133 de tal manera que la tapa 152 cierra el primer canal que forma al menos parcialmente el conducto de paso de fluido B (103), el segundo canal que forma al menos parcialmente el conducto de paso de muestra 106 y la cavidad que forma al menos parcialmente el conducto de paso de fluido A (109). La tapa es preferiblemente una lámina de plástico. En esta realización, solo se proporcionan dos cámaras de reacción.

La Fig. 16 es una vista superior del cartucho como se muestra en la Fig. 15. Los mismos elementos se indican con la misma numeración. Además, debajo del cartucho, la conexión entre el cartucho de procesamiento y el dispositivo de procesamiento en el área de detección, se muestra en una vista lateral cortada a lo largo de la línea indicada en la vista del cartucho. El detector está ubicado debajo de la cámara de reacción y, por lo tanto, es capaz de capturar, por ejemplo, una señal fluorescente.

La Fig. 17 a) muestra las cámaras de reacción 38 (a) a 38 (d) que se proporcionan como elementos separados y que se pueden sobre los salientes de conexión correspondientes del cuerpo de cartucho, proporcionando de este modo el cartucho de procesamiento. Como se puede observar, las cuatro cámaras de reacción 38 (a) a 38 (d) se proporcionan como un dispositivo que simplifica el manejo, en particular el ensamblaje con el cartucho. Para este fin, las cámaras de reacción 38 (a) a 38 (d) están conectadas a través de puentes de enlace 153. La vista lateral a lo largo de la línea A-A se muestra en la Fig. 17 b). También está dentro del alcance de la presente invención proporcionar cámaras de reacción adicionales.

La Fig. 18 es una vista detallada de las barreras de fluido 154 que se incorporan en el conducto de paso de muestra 6 y el conducto de paso de fluido A (9). Las barreras están diseñadas como pequeñas paredes que funcionan como una válvula en conexión con la tapa 152, que es una lámina de plástico en la realización mostrada. La tapa 152 cubre el canal y se adhiere a las paredes respectivas. Si se aplica una presión sobre la tapa 152, los canales se

cierran y los líquidos, como el agua o la muestra, no pueden pasar a través de dicha barrera 154. Tan pronto como se elimina la presión de la tapa, los canales de los conductos de paso 6 y 9 se abren y el líquido, en este caso la muestra, por ejemplo la muestra lisada o una mezcla de lisis que comprende una muestra mezclada con un tampón de lisis, puede fluir sobre dichas barreras 154. En un diseño alternativo, las respectivas barreras 154 se fijan a la

La Fig. 19 ilustra el sistema de acuerdo con la presente invención. La muestra se recoge usando una torunda 41 y la muestra se inserta en el recipiente de muestra 39 que comprende la solución de lisis. La recogida de la muestra también se ilustra en la Fig. 20 usando un tubo de muestra de diseño diferente, que tiene una rosca y que comprende una barra de agitación magnética 155. El recipiente de muestra 39 se ensambla con el cuerpo de cartucho 33 que comprende las cámaras de reacción ensambladas que comprenden reactivos secos para realizar el método analítico. El cartucho ensamblado respectivamente se introduce después en el dispositivo de procesamiento 160.

Ejemplos

Los ejemplos y realizaciones de los ejemplos que no pertenecen a la invención reivindicada son para fines ilustrativos.

Ejemplo 1: Lisis de *E. coli* en plasma sanguíneo

Materiales

- plasma sanguíneo (estabilizado con EDTA)
- Reserva en glicerol de *E. coli* (título: $3,04 \times 10^8$ células/ml; $10 \mu\text{l} = 3 \times 10^6$ células)
- Tampón de lisis: 0,1% de PVP PM 10.000; 0,45% de Tween-20; 0,45% de Nonidet P40; Tris HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM
- Suspensiones de partículas magnéticas:
 - a) MasG (Suspensión G MagAttract (QIAGEN - perlas de sílice)
 - b) MasB (Suspensión B MagAttract (QIAGEN - perlas de sílice)
 - c) Partículas magnéticas carboxiladas (Seradyn)

Protocolo

Se proporcionan 920 μl de tampón de lisis en un microtubo de 1,5 ml. Se añaden 50 μl de plasma sanguíneo y 20 μl de suspensión de perlas. Se añadieron 20 μl de agua en el método de referencia. Se añaden 10 μl de células (sin diluir) y la mezcla se incuba 5 minutos a 95°C a 1400 rpm en un termomezclador Eppendorf. De este modo, las células se lisan. La mezcla se enfría hasta temperatura ambiente y se realiza una separación magnética (sedimentación con referencia). Debido a las partículas magnéticas añadidas, los precipitados se adsorben a las partículas y se recogen en el fondo del tubo utilizando un imán. De este modo, el lisado se aclara. El material sobrenadante obtenido (lisado aclarado) se usa en una PCR cuantitativa con *E. coli* (1 μl y 10 μl).

Protocolo de qPCR

Las condiciones utilizadas se resumen en la siguiente tabla:

Volumen de entrada de lisado	1 μl	10 μl	
Mezcla maestra de PCR Quantifast	12,50	12,50	
FWD	0,10	0,10	Secuencia: CGATGATGCTACCCCTGAAAACT
Rev	0,10	0,10	Secuencia: TATTGTCGCTTGAAGTGAATTCCTC
Pro	0,05	0,05	Secuencia: CGTTGTTAAGTCAATGGAAAACCTG
BiDest	11,25	2,25	

Volumen	24 µl	15 µl	
Volumen total de lisado + mezcla de PCR	25 µl	25 µl	
Parámetro de la ciclación: 5 min 95°C; (10 s 95°C) 40x			

Resultados

Los resultados de este ejemplo se muestran en la Fig. 1. Se muestra el valor de Ct del método de PCR realizado. Cuanto mayor sea el valor de Ct, más ciclos de PCR son necesarios para alcanzar un cierto umbral. Por lo tanto, un valor de Ct alto indica una cantidad baja de ácidos nucleicos en la muestra y/o la presencia de inhibidores de la PCR. Para diferenciar estos efectos, se sometieron a ensayo en paralelo 1 µl y 10 µl del lisado aclarado. Como la reacción de PCR que empleaba 10 µl del lisado aclarado comprende más ácidos nucleicos, los valores de Ct deberían disminuir en comparación con la reacción de PCR, en donde se usa 1 µl de material de muestra. Si no se observa una disminución considerable a pesar del hecho de que se sometieron más ácidos nucleicos a la reacción de PCR, esto indica que la reacción de PCR está inhibida. La Fig. 1 demuestra que la adición de partículas magnéticas para aclarar el lisado da como resultado una disminución considerable de los valores de Ct con todas las partículas sometidas a ensayo. Esto demuestra que el método de acuerdo con la presente invención para aclarar el lisado es muy eficaz para eliminar inhibidores de la reacción de amplificación, en particular los precipitados que se forman durante el procedimiento de lisis. Los mejores resultados se lograron con las partículas magnéticas carboxiladas, aunque también las partículas magnéticas basadas en sílice mostraron una mejora considerable. Con las perlas carboxiladas, se logra una disminución casi ideal del valor de Ct. En las muestras que se procesaron de acuerdo con el método de referencia (en donde no se añadieron partículas magnéticas para aclarar el lisado), a pesar de que se añadieron casi 10 veces más ácidos nucleicos, el valor de Ct solo disminuyó en aprox. 0,5 unidades de Ct. Esto muestra que la PCR se inhibía considerablemente debido a la presencia de contaminantes en el material sobrenadante. Por lo tanto, los resultados del ejemplo 1 demuestran que todas las partículas magnéticas sometidas a ensayo eran adecuadas para eliminar los precipitados inhibidores de la PCR de los lisados. Esto es particularmente importante cuando se intenta utilizar una mayor cantidad de lisado en una PCR cuantitativa, porque más cantidad de lisado introduce más inhibidores en la reacción de amplificación. Eliminar eficazmente los contaminantes inhibidores, tales como los precipitados, mediante el aclaramiento del lisado, es particularmente importante cuando se pretende utilizar el lisado para reconstituir reactivos de PCR secos en los experimentos posteriores. Sin embargo, para los tipos de muestra menos complejos y/u otros métodos analíticos, una etapa de aclaramiento de lisado respectivo no es obligatoria, aunque sea ventajosa.

Ejemplo 2: Lisis de *Corynebacterium* en sangre

Materiales

- Sangre (estabilizada)
- Reserva en glicerol de *Corynebacteria glutamicum* (título: $1,3 \times 10^8$ células/ml; $23 \mu\text{l} = 3 \times 10^6$ células)
- Tampón de lisis (véase el ejemplo 1)
- Suspensiones de partículas magnéticas:
 - a) Perlas de carboxi Ademtech (Ademtech)
 - b) Magnosphere MK230/carboxilo (JSR Corp)
 - c) Partículas magnéticas carboxiladas (Seradyn)

Protocolo

Se proporcionan 952 µl de tampón de lisis en un microtubo de 1,5 µl. Se añaden 50 µl de sangre y 20 µl de suspensión de perlas. Se añaden 20 µl de agua en su lugar en el método de referencia, en donde no se realiza un aclaramiento del lisado según las enseñanzas de la presente invención. Después, se añaden 23 µl de células (sin diluir) y la mezcla se incuba durante 5 minutos a 95°C a 1400 rpm en un termomezclador Eppendorf. La mezcla se enfría a temperatura ambiente. Posteriormente, el lisado se aclara mediante separación magnética en el método para aclarar un lisado de acuerdo con la presente invención y mediante una sedimentación con el método de referencia. El material sobrenadante (lisado aclarado en caso de una separación magnética) se utiliza en una PCR cuantitativa de *Corynebacterium glutamicum* (1 µl y 10 µl).

Protocolo de qPCR

Las condiciones de la PCR utilizadas se resumen en la siguiente tabla:

Volumen de entrada de lisado	1 µl	10 µl	
Mezcla maestra de PCR Quantifast	12,50	12,50	
FWD	0,10	0,10	Secuencia: AAGCTCCAGCCACCCAAAACACTAC
Rev	0,10	0,10	Secuencia: CTACCAACCACTAATGCGTCGTC
Pro	0,05	0,05	Secuencia: ATCGCCTTCCAGACGCTCAACG
BiDest	11,25	2,25	
Volumen	24 µl	15 µl	
Volumen total de lisado + mezcla de PCR	25 µl	25 µl	
Parámetro de la ciclación: 5 min 95°C; (10 s 95°C) 40x			

Resultados

- Los resultados se muestran en la Fig. 2. Como se puede observar, los valores de Ct mejoraban considerablemente cuando se añadían perlas magnéticas, como se puede concluir por la disminución observada de los valores de Ct cuando se usan 10 µl de lisado aclarado como material de entrada. Esto muestra que las perlas sometidas a ensayo eran capaces de eliminar con éxito contaminantes tales como, en particular, precipitados procedentes del lisado, logrando de este modo un considerable efecto de aclaramiento del lisado. Por lo tanto, se puede usar más lisado en la reacción de amplificación.
- La Fig. 3 muestra que el precipitado de sangre se puede eliminar de manera eficaz con las perlas magnéticas, independientemente de qué tipos de partículas magnéticas se analizaran. En el lado izquierdo se muestra una muestra lisada a la que no se añadieron partículas magnéticas para aclarar el lisado. Como se puede observar, se forma un precipitado rojo en el fondo del microtubo. En el lado derecho se muestra el material sobrenadante de un lisado sanguíneo aclarado, que se había aclarado utilizando partículas magnéticas como se describe en el tercer aspecto. Como se puede observar, la simple adición de partículas magnéticas permite una eliminación eficaz del precipitado de sangre, aclarando de este modo el lisado.

Ejemplo 3: Lisis y amplificación directa de torundas vaginales

Materiales

- Torunda vaginal
- Tampón de lisis (véase el ejemplo 1)
- Suspensión de partículas magnéticas: partículas magnéticas carboxiladas (Seradyn)

Protocolo

- Los torundas vaginales (torundas endocervicales, Copan) se transfirieron a 1 ml de tampón de lisis. Se proporcionaron 200 µl de muestra de torunda vaginal en un microtubo de 1,5 ml. Se añadieron 200 µl de tampón de lisis con y sin sedimento de perlas Seradyn sobre 50 µl de suspensión de perlas Seradyn. La mezcla se agitó vorticialmente durante 20 segundos y se incubó durante 5 minutos a 95°C a 1400 rpm en un termomezclador Eppendorf. La mezcla se enfrió hasta temperatura ambiente. La separación magnética se realizó durante 2 minutos y la referencia (sin perlas) se centrifugó durante 1 minuto a la velocidad máxima. Se usaron 10 µl de material sobrenadante en una PCR cuantitativa de H18S humano.

Protocolo de qPCR

Las condiciones de la PCR eran las siguientes:

Volumen de entrada de lisado	10 µl	
Mezcla maestra de PCR Quantifast	12,50	
FWD	0,10	Secuencia: GCCGCTAGAGGTGAAATTCTTG
Rev	0,10	Secuencia: CATTCTTGGCAAATGCTTTTCG
Pro	0,05	Secuencia: ACCGGCGCAAGACGGACCAGA HEX-BHQ
BiDest	2,25	
Volumen	15 µl	
Volumen total de lisado + mezcla de PCR	25 µl	25 µl
Parámetro de la ciclación: 5 min 95°C; (10 s 95°C) 40x		

Resultados

5 Los resultados se muestran en la Fig. 4. Se lisaron siete muestras diferentes de torundas vaginales con y sin partículas magnéticas añadidas y se usaron 10 µl de los respectivos lisados aclarados y sin aclarar directamente en una PCR cuantitativa. Como se puede observar, todos los lisados aclarados permitían el desarrollo de la reacción de PCR. En todos los casos, el rendimiento de los lisados que se habían aclarado de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención, era considerablemente mejor que en comparación con el método de referencia, en donde los precipitados solo se sedimentaban mediante centrifugación.

10 Ejemplo 4: Lisis y amplificación directa con torundas vaginales

Materiales, protocolo y protocolo de PCR cuantitativa

Las muestras se prepararon como se ha descrito en el ejemplo 3. Sin embargo, además de las perlas Seradyn, también se usaron perlas de sílice (suspensión G MagAttract y suspensión B MagAttract (QIAGEN) para aclarar el lisado.

15 Resultados

La Fig. 5 muestra el resultado. Como se puede observar, los precipitados se pueden eliminar eficazmente del lisado utilizando diferentes partículas magnéticas que tienen una superficie carboxilada o de sílice.

Ejemplo 5: Lisis y amplificación directa con torundas vaginales

Materiales

- 20
- Partículas de intercambio iónico (Duolite ES468 y Amberlite XAD-7) y perlas de vidrio de 0,1 mm
 - Tampón de lisis (véase el ejemplo 1)

25 Los torundas vaginales (torundas endocervicales, Copan) se transfirieron a 1 ml de tampón de lisis. Se pesaron partículas de 15 mg en un microtubo de 1,5 ml; la referencia se preparó sin la adición de partículas para el aclaramiento del lisado. Se añadieron 200 µl de tampón de lisis y 200 µl de muestra de torunda vaginal y la mezcla se agitó vorticialmente durante 20 segundos. La mezcla agitada en vórtex se incubó durante 5 minutos a 95°C a 1400 rpm en un termomezclador Eppendorf. La mezcla se enfrió hasta temperatura ambiente y se centrifugó durante 1 minuto a la velocidad máxima. El material sobrenadante, es decir, el lisado aclarado, se usó en un qPCR de H18S humano.

Protocolo de qPCR

30 La PCR cuantitativa se realizó como se ha descrito en el ejemplo 3. Sin embargo, todos los lisados también se sometieron a ensayo junto con una mezcla maestra de PCR que incluía los cebadores y sondas usados que se habían secado en una liofilizadora. Dicha mezcla maestra de PCR liofilizada que incluía los cebadores y las sondas

usados, se reconstituyó añadiendo 25 µl del lisado no aclarado (referencia) o 25 µl del lisado aclarado. Por lo tanto, la reconstitución de la mezcla maestra de PCR se realizó añadiendo el lisado aclarado.

Resultados

Los resultados se muestran en la Fig. 6 y demuestran que el aclaramiento del lisado utilizando partículas de intercambio iónico permite un rendimiento exitoso de la amplificación cuando se añaden 1 µl o 10 µl del lisado aclarado a la PCR. Además, los resultados también demuestran que los lisados aclarados se pueden usar para reconstituir una mezcla de PCR seca. Esta es una simplificación considerable en comparación con los métodos de la técnica anterior, ya que el lisado aclarado se puede usar directamente para una reconstitución, por lo que se vuelve obsoleta una etapa de reconstitución por separado usando, por ejemplo, agua o un tampón de reconstitución. Por lo tanto, el método respectivo es particularmente adecuado en un laboratorio para sistemas de chips como también se describe en este documento. Como se muestra en los resultados, el método de referencia permitía realizar una reacción de PCR al añadir 1 µl o 10 µl a una mezcla maestra de PCR líquida, pero fallaba en la reconstitución de la mezcla de PCR seca. En este caso, una PCR exitosa solo era posible cuando se añadían las partículas magnéticas para eliminar los precipitados del lisado. Posteriormente, el método era aprox. igualmente efectivo. Esto demuestra las ventajas del método de aclaramiento de lisado de acuerdo con la presente invención, ya que prepara el lisado eficazmente y hace que sea adecuado para reconstituir una mezcla de PCR seca.

Ejemplo 6: Lisis y amplificación directa con torundas vaginales

Materiales

- Zeolita CAS:1318-02-1 Fluka, 96096
- Tampón de lisis (véase el ejemplo 1)
- Suspensión de partículas magnéticas carboxiladas (Seradyn)

Protocolo

Los torundas vaginales (torundas endocervicales, Copan) se proporcionan en 1 ml de tampón de lisis. Se pesan 30 mg de zeolitas en un microtubo de 1,5 ml. En la referencia, no se añadieron zeolitas. Se añadieron 250 µl de tampón de lisis y 40 µl de la suspensión de perlas Seradyn. Después de la adición de 250 µl de muestra de torunda vaginal, la mezcla se sometió a agitación vorticial durante 20 segundos y se incubó durante 5 minutos a 95°C a 1400 rpm en un mezclador térmico Eppendorf. La mezcla se enfrió hasta temperatura ambiente. La separación magnética se realizó durante 2 minutos y el lisado aclarado, es decir, el material sobrenadante, se usó en una qPCR de H18S humano. Se usaron 1 µl, 10 µl de lisado en las reacciones de PCR normales con líquidos y se usaron 25 µl del lisado aclarado para realizar la reacción de PCR con los reactivos de PCR secos. En este caso, el lisado aclarado se usa al mismo tiempo para reconstituir los reactivos de PCR secos.

Protocolo de qPCR

La PCR se realizó como se ha descrito en el ejemplo 3, en donde, sin embargo, en un ejemplo, se secó una mezcla de PCR que incluía cebadores y sondas y luego se reconstituyó con 25 µl de lisado aclarado.

Resultados

El tratamiento de los lisados de torundas vaginales con zeolitas como partículas sólidas dio como resultado una elevación del valor del pH. Este efecto dio como resultado una mejora notable del rendimiento de la PCR en más de 10 valores de Ct. Por lo tanto, la detección se mejoró multiplicando por un factor de más de 1000.

La Fig. 7 muestra muestras de torundas vaginales que se procesaron con y sin zeolitas según el ejemplo 6 y en donde se usaron diferentes volúmenes de lisado directamente en una reacción de PCR cuantitativa. Los reactivos de PCR secos se reconstituyeron usando 25 µl del lisado aclarado. En el lado derecho, se indica el valor del pH de las muestras. Como se puede observar, la adición de las zeolitas durante la lisis daba como resultado una elevación del valor del pH de la muestra lisada y, por lo tanto, tenía el efecto de que la reacción de PCR podía realizarse en condiciones óptimas. Por lo tanto, las zeolitas no solo tienen un efecto beneficioso sobre la reacción de amplificación porque eliminan los contaminantes comprendidos en la muestra lisada, tales como por ejemplo, los precipitados, sino que además las zeolitas también tienen un efecto beneficioso sobre el valor del pH a medida que aumenta el valor del pH.

Ejemplo 7: Lisis y amplificación directa de *E. coli* en sangre

Materiales

- Sangre humana
- Reserva en glicerol de *E. coli* (título: $9,2 \times 10^9$ células/ml; 10 µl (diluidos 1:30 con PBS) = 3×10^6 células)

- Zeolita CAS:1318-02-1 Fluka, 96096
- Tampón de lisis: (véase el ejemplo 1)

Protocolo

- 5 Se pesaron 30 mg de zeolitas en un microtubo de 1,5 ml. La referencia se realizó sin zeolitas. Se añadieron 985 µl de tampón de lisis a los microtubos, así como 5 µl de sangre y 10 µl de células. La mezcla se incubó durante 5 minutos a 95°C a 1400 rpm en un termomezclador Eppendorf. La mezcla se enfrió hasta temperatura ambiente. Después de una breve centrifugación, el material sobrenadante se usó en una qPCR con *E. coli*. En este caso se emplearon 1 µl, 10 µl y 25 µl (para la reconstitución de la mezcla de PCR seca) en la PCR posterior.

Protocolo de qPCR

- 10 La PCR se realizó como se ha descrito en el ejemplo 3. Para una reacción, la mezcla maestra completa de la PCR que incluía cebadores y sondas, se secó en una liofilizadora.

Resultados

- 15 Los resultados demuestran que las zeolitas se pueden usar con eficacia como partículas sólidas con el fin de aclarar el lisado de contaminantes, tales como precipitados, y, por lo tanto, hacen que el lisado sea adecuado directamente para realizar una reacción de PCR. Los lisados que se aclararon de acuerdo con las enseñanzas de la presente descripción, se emplearon en la PCR y también eran adecuados para reconstituir la mezcla de PCR seca.

Ejemplo 8: Lisis y amplificación directa de *E. coli* en torundas bucales

Materiales

- Sangre humana
- 20 - Reserva en glicerol de *E. coli* (título: $9,2 \times 10^9$ células/ml; 10 µl (diluidos 1:30 con PBS) = 3×10^6 células)
- Zeolita CAS:1318-02-1 Fluka, 96096
- Los torundas bucales (1 torunda por mejilla) se transfirieron a 1,1 ml de tampón de lisis
- Tampón de lisis: (véase el ejemplo 1)

Protocolo

- 25 Se pesaron 30 mg de zeolita en un microtubo de 1,5 ml. La referencia se preparó sin zeolita. Se añadieron 490 µl de muestra de torunda bucal, así como 5 µl de sangre y 10 µl de células. La mezcla se incubó durante 5 minutos a 95°C a 1400 rpm en un termomezclador Eppendorf. La mezcla se enfrió hasta temperatura ambiente y después de la centrifugación, el material sobrenadante (el lisado aclarado) se usó en una qPCR con *E. coli*. En este caso, se añadieron 1 µl, 10 µl en una reacción de 25 µl.

30 Protocolo de qPCR

El protocolo se realizó como se ha descrito en el ejemplo 3.

Resultados

- 35 Los resultados se muestran en la Fig. 9. Como se puede observar, el tratamiento de los lisados de la torunda bucal con zeolitas para aclarar los lisados, da como resultado un rendimiento de la PCR considerablemente mejorado. Como promedio, los valores de Ct se obtienen aprox. 2,6 ciclos antes. Esto corresponde a una mejora multiplicada por un factor 6.

Ejemplo 9: Lisis y amplificación directa de *E. coli* enriquecida en torundas de heces

Materiales

- Muestras de heces humanas
- 40 - Las torundas de las muestras de heces se obtuvieron de la siguiente manera: se humedeció una torunda (poliéster puritano) con agua y se retiró el exceso de agua. La torunda se introdujo en una muestra de heces y un exceso de muestra se retiró girando la torunda alrededor de su propio eje. Después, la torunda se añadió a un microtubo de 1,5 ml que se llenó con 500 µl de tampón de lisis. Al girar nuevamente la torunda alrededor de su propio eje en el borde del tubo y en el líquido, el material de las heces se transfirió al tampón de lisis.
- 45 - Reserva en glicerol de *E. coli* (título: $9,2 \times 10^9$ células/ml; 10 µl (diluidos 1:30 con PBS) = 3×10^6 células)

- Zeolita CAS:1318-02-1 Fluka, 96096
- Tampón de lisis: (véase el ejemplo 1)
- Suspensión de partículas magnéticas carboxiladas (Seradyn)

Protocolo

- 5 Se pesaron 30 mg de zeolita en un microtubo de 1,5 ml. La referencia se realizó sin zeolita añadida. Se añadieron 250 µl de la muestra de heces y 50 µl de perlas Seradyn, así como 10 µl de células *E. coli*. La mezcla se incubó durante 5 minutos a 95°C a 1400 rpm en un termomezclador Eppendorf y se enfrió hasta temperatura ambiente. La separación magnética se realizó durante 2 minutos y el material sobrenadante (lisado aclarado) se transfirió a un nuevo tubo. El material sobrenadante se usó en una qPCR de H18S humano y de *E. coli* (1 µl y 10 µl).

10 Protocolo de qPCR

La PCR cuantitativa se realizó como se ha descrito en el ejemplo 3.

Resultados

- 15 Los resultados se muestran en la Fig. 10. Como se puede observar, el aclarado del lisado como se describe en la presente invención, permite incluso aclarar eficazmente el lisado de un material muy complicado como las heces, haciendo de este modo que el lisado aclarado sea adecuado directamente para una reacción de amplificación sin tener la necesidad de purificar primero el ácido nucleico de la muestra.

Ejemplo 10: Elevación del valor del pH de muestras de torundas vaginales mediante la adición de zeolitas

- 20 Cuando se realiza un procedimiento enzimático tal como una PCR, es obligatorio mantener el valor del pH dado para la enzima utilizada, por ejemplo, una ADN polimerasa taq, en caso de una PCR. Debido a que las torundas vaginales son muy ácidas, el efecto activo sobre el pH de las zeolitas se puede demostrar particularmente bien con dichas muestras. Las muestras de torundas vaginales tienen un valor del pH de aprox. 4, cuando un valor del pH de aprox. 8 - 9 es necesario para una reacción de PCR estándar. En el ejemplo 10 se analizó cómo los parámetros posteriores influyen en el valor del pH de una muestra de torunda vaginal: A) adición de tamices moleculares a base de zeolita (tamaño de poro 3 angstrom) y B) adición de un tampón de lisis con una mayor fuerza iónica. Para realzar el efecto, se utilizaron muestras vaginales particularmente ácidas.

En la variante A), se añadieron 60 µl de tampón de lisis (véase el ejemplo 9, en donde se añadió adicionalmente Tris/HCl 100 mM pH 8,5) a 60 µl de muestra de torunda vaginal en tampón de lisis (véase el ejemplo 9). Se añadieron 15 µl de la mezcla resultante a una tira de pH, para determinar el valor del pH del lisado.

- 30 En la variante B), se añadieron 60 µl de tampón de lisis (véase el ejemplo 9, en donde se añadió adicionalmente Tris/HCl 33 mM pH 8,5 y un tamiz molecular de tamaño mediano en forma de partículas (tamaño de poro de 3 angstrom)) a 60 µl de torundas vaginales en tampón de lisis (véase el ejemplo 9). Se añadieron 15 µl de la mezcla resultante a una tira de pH para determinar el valor del pH. Los resultados se muestran en la tabla siguiente:

Valor del pH de la torunda	Valor del pH después de la variante A	Valor del pH después de la variante B
3,8	6,0	8 - 8,5
3,9	6,0	8,0
4,0	7,5	8 - 8,5
4,0	7 - 7,5	8,0
4,1	8,0	8 - 8,5
4,1	7,5 - 8	8 - 8,5
4,1	7,5	8 - 8,5

- 35 Como se puede observar, la adición de una combinación de una menor concentración de tampón y zeolita (tamiz molecular) eleva el valor del pH de forma considerablemente mejor, al valor de pH necesario de 8 - 8,5, que la

adición de un tampón más fuerte. Los resultados son mucho más uniformes y, por lo tanto, más fiables. Por lo tanto, las zeolitas se pueden usar para elevar de manera fiable el valor del pH de una muestra ácida que tiene un valor de pH inferior a 4,5, hasta un valor de pH en un intervalo de 8 a 8,5 que es adecuado para realizar una reacción de amplificación.

5 Ejemplo 11: Aclaramiento de lisados mediante la adición de partículas magnéticas carboxiladas

Las torundas vaginales comprenden una gran cantidad de partículas macroscópicas, como capas de células sueltas y restos de mucosidad que contiene glicoproteína. Como se muestra en el siguiente experimento, dichos contaminantes en partículas se pueden separar muy bien cuando se usan partículas magnéticas carboxiladas. Se diluyeron 50 µl de muestras de torunda vaginal en tampón de lisis (véase el ejemplo 1) con 50 µl de tampón de lisis, que contenía 2,5 mg de partículas magnéticas carboxiladas (Seradyn). Las muestras se mezclaron y se incubaron durante 5 minutos a 95°C. Posteriormente, las muestras se enfriaron 2 minutos a temperatura ambiente y se separaron magnéticamente durante 1 minuto para eliminar los precipitados. Los materiales sobrenadantes resultantes (lisados aclarados) se transfirieron a un nuevo recipiente de reacción usando una pipeta. Como se muestra en la Fig. 11, la adición de las partículas magnéticas carboxiladas a la muestra lisada daba como resultado una excelente eliminación de los precipitados macroscópicos.

Ejemplo 12: Reconstitución de reactivos secos de PCR utilizando diferentes métodos y procedimientos de lisis de acuerdo con la presente invención.

Materiales

- Torundas nasofaríngeas
- 20 - Suspensión de células de *C. glutamicum*
- Tampón de lisis (véase el ejemplo 1)
- Suspensión de partículas magnéticas: partículas magnéticas carboxiladas (Seradyn)

Protocolo

Cada muestra de torunda se transfirió a 500 µl de tampón de lisis. Se agruparon tres muestras de torundas obtenidas a partir de tres donantes. Se mezclaron 1000 µl del conjunto respectivo que comprendía la muestra con el tampón de lisis, 66 µl de perlas SeraMag separadas previamente y 10 µl de suspensión de *C. glutamicum*. Para el procesamiento, se utilizaron tres métodos diferentes:

Método 1: La mezcla maestra de PCR quantifast liofilizada que comprendía cebadores y sondas, se reconstituyó con 25 µl de mezcla de lisis, en donde la mezcla de lisis comprendía la muestra, el tampón de lisis y las perlas magnéticas. Sin embargo, no se aplicaron medidas especiales para favorecer la lisis de la muestra. De este modo, la reconstitución de la mezcla maestra liofilizada se produjo usando la muestra comprendida en el tampón de lisis. Por lo tanto, la reconstitución se produjo con una mezcla de lisis que comprendía la muestra, la cual, sin embargo, no se lisó (completamente). La composición de PCR reconstituida comprendía el tampón de lisis, así como la muestra. Se prepararon y agruparon respectivamente 10 composiciones reconstituidas. Se transfirieron partes alícuotas de 25 µl a una tira de PCR estándar, en total 10 muestras. Se añadieron 1,25 µl de la suspensión de *C. glutamicum* a cada reacción. Como la lisis de la muestra no se había completado en las condiciones utilizadas, la mezcla respectiva, que ya comprendía la mezcla de PCR reconstituida, se incubó durante 5 minutos a 95°C para favorecer la lisis y, además, se enfrió hasta temperatura ambiente durante 1 minuto con el fin de aumentar la formación de precipitados que constituían una contaminación que podía inhibir la reacción de PCR. Las perlas magnéticas se recogieron/separaron durante 1 minuto. De ese modo, los precipitados se unieron a las perlas y el lisado se aclaró. Se transfirieron 20 µl de la reacción aclarada a un nuevo tubo de PCR. Después, la reacción de PCR se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: 95°C 10 segundos, 60°C 30 segundos, 40 ciclos. Se procesaron 10 muestras en paralelo. Por lo tanto, la etapa de calentamiento para favorecer la desnaturalización y, por lo tanto, la lisis de la muestra se realizó después de la reconstitución de la mezcla maestra de PCR. Esto permite ahorrar etapas del procedimiento, porque ya no se requiere una etapa de calentamiento inicial durante la PCR.

Método 2: Se reconstituyeron 10 porciones de la mezcla maestra de PCR quantifast liofilizada que comprendía cebadores y sondas, usando 25 µl de la mezcla de lisis, que comprendía la muestra, el tampón de lisis y las perlas magnéticas. Por lo tanto, nuevamente, la reconstitución se produjo con la mezcla de lisis, en donde la muestra solo se había puesto en contacto con el tampón de lisis, en donde, sin embargo, la lisis todavía no se había favorecido mediante calentamiento. Las mezclas de PCR reconstituidas respectivamente se agruparon y se transfirieron 20 µl a tubos de reacción de PCR (se procesaron 10 muestras en paralelo). Se añadió 1 µl de suspensión de *C. glutamicum*. Posteriormente, la reacción de PCR se realizó directamente usando las siguientes condiciones: 95°C 5 minutos, 95°C 10 segundos, 60°C 30 segundos, las dos últimas etapas se repitieron 40 ciclos. Este protocolo es muy rápido, porque en este caso, se favorece la lisis y se consigue durante la PCR real.

Método 3: Se transfirieron 25 ml a diez tubos de reacción de una tira de PCR. Se añadieron 1,25 ml de suspensión

de *C. glutamicum* y la mezcla se incubó a 95°C para favorecer la lisis de la muestra. La reacción se enfrió durante 1 minuto hasta temperatura ambiente y las perlas se separaron durante 1 minuto. Se transfirieron 25 ml del material sobrenadante (lisado aclarado) a una tira de PCR que comprendía la mezcla maestra de PCR liofilizada para la reconstitución (10 muestras). Se transfirieron 25 ml de la composición reconstituida respectiva a los tubos y se procesaron en una PCR como se ha descrito en el método 2 de este ejemplo.

La Figura 21 muestra los resultados. Como se puede observar, los tres métodos proporcionan unos resultados comparables y demuestran que también es posible usar una forma abreviada del método de acuerdo con la presente invención, realizando la etapa de lisis junto con la etapa de análisis, por ejemplo, durante la reacción de PCR. De este modo, se puede ahorrar un tiempo considerable.

Por lo tanto, se pueden usar todas las alternativas del método de acuerdo con la presente invención.

Listado de secuencias

<110> Qiagen GmbH

<120> Método de procesamiento de muestra y cartucho de procesamiento de muestra

<130> 53 880 K

<150> EP 11 008 214.6

<151> 11-10-2011

<150> US 61/545,983

<151> 11-10-2011

<160> 9

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 24

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador FWD

<400> 1

cgatgatgct acccctgaaa aact 24

<210> 2

<211> 25

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador Rev

<400> 2

tattgtcgct tgaactgatt tcctc 25

<210> 3

<211> 25

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Sonda Pro

<400> 3

cgttgtaag tcaatgaaa acctg 25

<210> 4

<211> 23

<212> ADN

<213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador FWD
 5 <400> 4
 aagctccagc cacccaaaac tac 23
 <210> 5
 10 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 15 <223> Cebador Rev
 <400> 5
 ctaccaacca ctaatgcgctc gtc 23
 <210> 6
 20 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 25 <223> Sonda Pro
 <400> 6
 atcgcttcc agacgtcaa cg 22
 30 <210> 7
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> Cebador FWD
 <400> 7
 40 gccgctagag gtgaaattct tg 22
 <210> 8
 <211> 21
 <212> ADN
 45 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador Rev
 50 <400> 8
 cattcttggc aaatgcttc g 21
 <210> 9
 <211> 21
 55 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda Pro
 60 <400> 9
 accggcgcaa gacggaccag a 21

REIVINDICACIONES

1. Un método para analizar una muestra que comprende ácidos nucleicos, que comprende las siguientes etapas:

A

- 5 a) lisar la muestra para liberar ácidos nucleicos a partir de células para proporcionar una muestra lisada y aclarar la muestra lisada, en donde el aclaramiento de la muestra lisada implica poner en contacto la muestra antes, durante o después de la lisis con al menos un soporte sólido que se une a contaminantes procedentes de la muestra lisada, en donde el soporte sólido son partículas magnéticas y comprende grupos carboxilo en su superficie;
- 10 b) poner en contacto al menos una porción de la muestra lisada aclarada con una composición seca, que es una composición liofilizada, que comprende reactivos para realizar el método analítico, proporcionando de este modo una composición reconstituida, en donde la reconstitución se logra exclusivamente mediante la adición de la muestra lisada aclarada;
- c) llevar a cabo un método analítico utilizando la composición reconstituida;
- 15 en donde la lisis de la muestra comprende la adición de una solución de lisis que comprende (i) al menos un tensioactivo no iónico o una mezcla de detergentes no iónicos y (ii) al menos un polímero seleccionado a partir de polivinilpirrolidona, polioxazolina, polietilenglicol y poli(alcohol vinílico);

o

B

- 20 a) poner en contacto la muestra con una solución de lisis para liberar ácidos nucleicos a partir de células, proporcionando de este modo una mezcla de lisis, en donde la solución de lisis comprende (i) al menos un tensioactivo no iónico o una mezcla de detergentes no iónicos y (ii) al menos un polímero seleccionado a partir de polivinilpirrolidona, polioxazolina, polietilenglicol y poli(alcohol vinílico);
- 25 b) usar la mezcla de lisis para reconstituir una composición seca, que es una composición liofilizada, que comprende reactivos para realizar el método analítico, proporcionando de este modo una composición reconstituida, en donde la reconstitución se logra exclusivamente mediante la adición de la mezcla de lisis;
- c) llevar a cabo un método analítico utilizando la composición reconstituida,
- en donde la composición reconstituida se aclara y en donde después de la etapa b) se realiza al menos una etapa que favorece la lisis de la muestra,
- 30 en donde el aclaramiento de la composición reconstituida implica poner en contacto la muestra antes, durante o después de la lisis con al menos un soporte sólido que se une a los contaminantes que se originan a partir de la muestra lisada, en donde el soporte sólido son partículas magnéticas y comprende grupos carboxilo en su superficie.

2. El método según la reivindicación 1, en donde el aclaramiento de la muestra lisada y/o la composición reconstituida implica uno o varios de los siguientes apartados:

- 35 a) hacer pasar al menos una porción de la muestra lisada o la composición reconstituida a través de un filtro o una membrana;
- b) en donde los contaminantes son precipitados que se originan a partir de la muestra lisada;
- c) la unión de los contaminantes se produce en condiciones en las que los contaminantes que se originan a partir de la muestra lisada, en particular precipitados, se unen al menos a un soporte sólido pero en donde no se produce una unión sustancial de las biomoléculas de interés que se analizan en el método de análisis;
- 40 d) en donde la muestra se pone en contacto antes, durante o después de la lisis con al menos un soporte sólido que se une a contaminantes procedentes de la muestra lisada, en particular precipitados, formando de este modo un complejo con los precipitados, y en donde dicho complejo se separa;
- 45 e) en donde la muestra se pone en contacto antes, durante o después de la lisis con al menos un soporte sólido para la unión de los contaminantes, en particular precipitados, en donde la reconstitución de la composición seca tiene lugar usando la mezcla de lisis y en donde la lisis de la muestra se favorece calentando la composición reconstituida, por lo que los contaminantes, en particular los precipitados, que se originan a partir de la muestra lisada y que están comprendidos en la composición reconstituida, se unen proporcionando de este modo una composición reconstituida aclarada; y/o
- 50 f) en donde el aclaramiento de la muestra lisada y/o el aclaramiento de la composición reconstituida implica la

adición de al menos un compuesto o una composición que se une y/o neutraliza uno o varios inhibidores del método de análisis.

3. El método según la reivindicación 1, en donde el soporte sólido tiene una o varias de las siguientes características:

- 5 a) el soporte sólido comprende óxidos metálicos;
- b) el soporte sólido comprende una superficie de sílice;
- c) el soporte sólido comprende grupos carboxilo en su superficie y comprende uno o varios ligandos en su superficie para facilitar la unión de contaminantes al soporte sólido, en donde los ligandos se seleccionan a partir del grupo que consiste en grupos sulfonato y ligandos de silano;
- 10 d) el soporte sólido comprende o es un tamiz molecular, preferiblemente una zeolita;
- e) la incorporación del soporte sólido en la muestra lisada y/o la composición reconstituida da como resultado una elevación del valor del pH de la muestra lisada y/o de la composición reconstituida; y/o
- f) el soporte sólido está comprendido en la solución de lisis.

4. El método según una o varias de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el procedimiento de reconstitución tiene una o varias de las siguientes características:

- 15 a) al menos una alícuota de la muestra lisada aclarada se pone en contacto con la composición seca para reconstituir la composición seca;
- b) al menos una alícuota de la mezcla de lisis se pone en contacto con la composición seca para reconstituir la composición seca;
- 20 c) se añade una cantidad determinada de la muestra lisada aclarada o la mezcla de lisis a la composición seca para una reconstitución;
- d) la mezcla que comprende la composición seca y la muestra lisada aclarada o la mezcla de lisis se agita para facilitar el procedimiento de reconstitución; y/o
- 25 e) la mezcla que comprende la composición seca y la muestra lisada aclarada o la mezcla de lisis se agita con la ayuda de un imán y un material magnético está comprendido en la composición seca para facilitar el procedimiento de reconstitución.

5. El método según una o varias de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la lisis de la muestra tiene una o varias de las siguientes características:

- 30 a) la lisis se logra o se facilita con uno o varios entre un calentamiento, un tratamiento con una o varias enzimas, la adición de uno o varios productos químicos y/o un tratamiento mecánico de la muestra;
- b) la lisis se facilita mediante calentamiento;
- c) la solución de lisis comprende una barra de agitación magnética;
- d) la solución de lisis comprende el soporte sólido para aclarar el lisado;
- 35 e) la lisis se logra y/o se facilita mediante una etapa de calentamiento que se realiza después de la reconstitución de la composición seca; y/o
- f) en donde la lisis de la muestra comprende la adición de una solución de lisis que comprende
 - (a) al menos un tensioactivo no iónico o una mezcla de detergentes no iónicos,
 - (b) al menos un polímero que evita o reduce la inhibición del método analítico posterior, preferiblemente mediante la formación de un complejo inespecífico con inhibidores potenciales;
 - 40 (c) opcionalmente una enzima proteolítica,
 - (d) opcionalmente un agente quelante para cationes divalentes y
 - (e) una sustancia tamponadora.

6. El método según una o varias de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la lisis y la reconstitución de la muestra comprende:

a)

(i) poner en contacto la muestra con la solución de lisis y el soporte sólido para eliminar contaminantes, preferiblemente precipitados, formando de este modo una mezcla de lisis;

(ii) calentar la mezcla a una temperatura de al menos 90°C, preferiblemente al menos 95°C;

5 (iii) opcionalmente enfriar la muestra lisada a una temperatura inferior a 50°C;

(iv) aclarar la muestra lisada separando el complejo formado que comprende el soporte sólido y los precipitados proporcionando de este modo un lisado aclarado; y

(v) usar el lisado aclarado para reconstituir la composición seca;

o

10 b)

(i) poner en contacto la muestra con la solución de lisis y el soporte sólido para eliminar contaminantes, preferiblemente precipitados, formando de este modo una mezcla de lisis;

(ii) usar la mezcla de lisis para reconstituir la composición seca;

(iii) calentar la composición reconstituida a una temperatura de al menos 90°C, preferiblemente al menos 95°C;

15 (iv) opcionalmente enfriar la composición reconstituida a una temperatura inferior a 50°C; y

(v) aclarar la composición reconstituida separando el complejo formado que comprende el soporte sólido y los precipitados proporcionando de este modo una composición reconstituida aclarada;

o

c)

20 (i) poner en contacto la muestra con la solución de lisis y el soporte sólido para eliminar contaminantes, preferiblemente precipitados, formando de este modo una mezcla de lisis;

(ii) usar la mezcla de lisis para reconstituir la composición seca;

(iii) someter la composición reconstituida a una reacción de amplificación que comprende al menos una etapa de calentamiento que implica una temperatura de al menos 90°C, preferiblemente al menos 95°C.

25 7. El método según una o varias de las reivindicaciones 1 a 6, en donde

- el método analítico tiene una o varias de las siguientes características:

a) el método analítico comprende una reacción de detección;

b) el método analítico comprende al menos una etapa de calentamiento que implica una temperatura de al menos 85°C, al menos 90°C o al menos 95°C;

30 c) el método analítico comprende una reacción de amplificación;

d) el método analítico comprende una PCR o una reacción de amplificación isotérmica;

e) el método analítico implica al menos una etapa de calentamiento y la lisis de la muestra comprendida en la composición reconstituida se facilita mediante dicha etapa de calentamiento; y/o

f) el método analítico se realiza en presencia del soporte sólido que se añade para el aclaramiento;

35 y/o

- la composición liofilizada tiene una o varias de las siguientes características:

a) comprende al menos algunos, preferiblemente todos, los reactivos necesarios para llevar a cabo el método de análisis previsto;

40 b) comprende al menos algunos, preferiblemente todos, los reactivos necesarios para llevar a cabo una reacción de amplificación;

c) comprende uno o varios, preferiblemente todos, de los siguientes reactivos seleccionados a partir del grupo

que consiste en una polimerasa, un tampón de reacción adecuado para realizar una reacción de amplificación, dNTPs, cebadores y/o sondas; y/o

d) comprende un material magnético que permite facilitar el procedimiento de reconstitución al permitir la mezcla de la composición durante la reconstitución con la ayuda de un imán.

- 5 8. El método según una o varias de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el polímero es polivinilpirrolidona.
9. Un cartucho de procesamiento adecuado para uso en un método para analizar una muestra que comprende biomoléculas, en donde dicho método comprende la reconstitución de una composición seca que comprende reactivos para realizar el método analítico,
- 10 en donde el cartucho de procesamiento comprende un cuerpo de cartucho (33) y al menos una cámara de reacción (38) que comprende una composición seca que comprende reactivos para llevar a cabo un método analítico,
- 15 en donde el cuerpo de cartucho (33) comprende una abertura de entrada de muestra (4), al menos una salida de muestra (5) y un conducto de paso de fluido (6) que conecta la abertura de entrada de muestra (4) y la salida de muestra (5), en donde la salida de muestra (5) se abre en la cámara de reacción (38), y en donde opcionalmente el cuerpo de cartucho (33) comprende unos medios (20) para conectar al menos una cámara de reacción (38) con el cuerpo de cartucho (33);
- en donde el cartucho está diseñado de tal manera que se logra una reconstitución de la composición seca comprendida en la cámara de reacción (38) mediante una muestra que entra en el cartucho a través de la abertura de entrada de muestra (4),
- 20 y en donde la cámara de reacción (38) y/o los medios (20) para conectar la cámara de reacción con el cuerpo de cartucho comprenden al menos una abertura de fluido A (7) a través de la cual un fluido tal como el aire puede salir de la cámara de reacción (38), en donde la abertura de fluido A (7) comprende una barrera (40) que permite el paso de aire al menos antes de que dicha barrera entre en contacto con un líquido pero en donde dicha barrera impide sustancialmente el paso de líquido.
10. El cartucho de procesamiento según la reivindicación 9, que tiene una o varias de las siguientes características:
- 25 a) el conducto de paso de fluido (6) comprende al menos uno de los canales y/o cavidades y está formado al menos parcialmente en la superficie del cuerpo de cartucho (33);
- b) el cuerpo de cartucho (33) comprende un sistema de canales y/o cavidades para un conducto de paso de muestra predefinido después de que la muestra ha entrado a través de la abertura de entrada de muestra (4);
- 30 c) el cartucho comprende al menos dos cámaras de reacción (38), y en donde el conducto de paso de fluido para la muestra (6) se ramifica y termina en al menos dos salidas de muestra (5), en donde cada salida de muestra (5) se abre en una cámara de reacción (38) diferente;
- d) una o varias de las cámaras de reacción (38) están comprendidas de forma integral en el cuerpo de cartucho (33);
- 35 e) una o varias de las cámaras de reacción (38) se proporcionan como dispositivo(s) separado(s) que se ensambla(n) con el cuerpo de cartucho (33);
- f) los medios (20) para conectar al menos una cámara de reacción (38) con el cuerpo de cartucho (33) son un saliente de conexión (20);
- g) el cuerpo de cartucho (33) comprende una pluralidad de cámaras de reacción (38) y/o una pluralidad de medios, preferiblemente salientes de conexión (20), para conectar las cámaras de reacción;
- 40 h) el cuerpo de cartucho (33) comprende medios, preferiblemente un saliente de conexión (10), para conectar un recipiente de muestra (39) con el cuerpo de cartucho (33);
- i) el cuerpo de cartucho (33) comprende una abertura de entrada de fluido B (1) que está en comunicación fluida a través de un conducto de paso de fluido B (3) con el recipiente de muestra (39) si dicho recipiente (39) está ensamblado con el cuerpo de cartucho (33) y en donde se introduce aire en el recipiente de muestra (39) a través de la salida de fluido B (2);
- 45 j) el cuerpo de cartucho (33) comprende un tubo (30) que se encuentra dentro del recipiente de muestra (39) si dicho recipiente (39) se ensambla con el cuerpo de cartucho (33) y en donde la muestra llega a la abertura de entrada de muestra (4) a través de dicho tubo (30);
- k) el cartucho de procesamiento se caracteriza por un cuerpo de cartucho (33) que tiene las características tal y como se han definido en una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 18.
- 50

11. El cartucho de procesamiento según la reivindicación 9 o 10, en donde la barrera (40) tiene una o varias de las siguientes características:

a) dicha barrera es una membrana o un filtro;

b) dicha barrera es hidrófoba; y/o

5 c) dicha barrera es porosa.

12. El cartucho de procesamiento según una o varias de las reivindicaciones 9 a 11, en donde

- la salida de muestra (5) y/o la abertura de fluido A (7) están diseñadas como un tubo que está comprendido al menos parcialmente en una pared lateral de una cámara de reacción (38) y/o en una pared lateral de los medios para conectar la cámara de reacción con el cartucho (20)

10 y/o

- el cuerpo de cartucho (33) comprende una salida de fluido A (8) que está conectada con la abertura de fluido A (7) a través de un conducto de paso de fluido A (9).

13. El cartucho de procesamiento según una o varias de las reivindicaciones 9 a 12, caracterizado por medios que permiten cerrar el conducto de paso de muestra (6) y/o el conducto de paso de fluido A (9), en donde opcionalmente, se proporciona al menos una barrera (54, 154) dentro del conducto de paso de muestra (6) y/o del conducto de paso de fluido A (9), que junto con una tapa (152) que cubre dicho(s) conducto(s) de paso de fluido (6, 9) permite cerrar el conducto de paso de muestra (6) y/o el conducto de paso de fluido A (9) si se aplica presión a la tapa (152).

15

14. Cuerpo de cartucho adecuado para proporcionar una conexión de fluido desde un recipiente de muestra (39) que contiene un fluido y se puede ensamblar con el cuerpo de cartucho (33), hasta al menos una cámara de reacción (38) que se puede ensamblar con el cuerpo de cartucho (33) o que se proporciona como una parte integral del cuerpo de cartucho (33), que comprende

20

- una abertura de entrada de muestra (4) y una salida de muestra (5),

- un conducto de paso de muestra (6) que conecta la abertura de entrada de muestra (4) y la salida de muestra (5),

25

- un saliente de conexión de recipiente de muestra (10) para conectar el recipiente de muestra (39), en donde después de ensamblar el recipiente de muestra (39) con dicho saliente de conexión (10), la abertura de entrada de muestra (4) está en comunicación fluida con el recipiente de muestra (39),

30

- al menos un saliente de conexión de cámara de reacción (20) para conectar una cámara de reacción (38) en donde después de ensamblar la cámara de reacción (38) con dicho saliente de conexión (20), la salida de muestra (5) está en comunicación fluida con la cámara de reacción (38) y/o que comprende al menos una cámara de reacción (38) que se proporciona como una parte integral del cuerpo de cartucho (33),

en donde se proporciona al menos una abertura de fluido A (7) en el saliente de conexión de cámara de reacción (20) y/o en la cámara de reacción (38) y en donde dicha abertura de fluido (7) comprende una barrera (40), en donde dicha barrera permite el paso de aire al menos antes de que dicha barrera entre en contacto con un líquido, pero en donde dicha barrera impide sustancialmente el paso de líquido.

35 15. El cuerpo de cartucho según la reivindicación 14, en donde dicha barrera (40) tiene una o varias de las siguientes características:

a) dicha barrera es una membrana o un filtro;

b) dicha barrera es hidrófoba; y/o

c) dicha barrera es porosa.

40 16. El cartucho según la reivindicación 14 o 15, que comprende

- una abertura de entrada de fluido B (1, 101) y una salida de fluido B (2, 102),

- un conducto de paso de fluido B (3, 103) que conecta la abertura de entrada de fluido B (1, 101) y la salida de fluido B (2, 102),

45

en donde después de ensamblar el recipiente de muestra (39) con el saliente de conexión de recipiente de muestra (10), la salida de fluido B (2) y la abertura de entrada de muestra (4) están en comunicación fluida con el recipiente de muestra (39).

17. Cuerpo de cartucho según una o varias de las reivindicaciones 14 a 16, que tiene una o varias de las siguientes

características:

- 5 a) se proporciona al menos una barrera (54, 154) dentro del conducto de paso de muestra (6) y/o el conducto de paso de fluido A (9), que junto con una tapa (152) que recubre dicho(s) conducto(s) de paso de fluido permite cerrar el conducto de paso de muestra (6) y/o el conducto de paso de fluido A (9) si se aplica una presión a la tapa (152);
- b) la salida de muestra (4) y/o la abertura de fluido A (7), preferiblemente ambas, están diseñadas como un tubo en donde dicho tubo está comprendido al menos parcialmente en una convexidad de una pared lateral de una cámara de reacción (38) y/o en una convexidad de una pared lateral del saliente de conexión de cámara de reacción (20);
- 10 c) el saliente de conexión de recipiente de muestra (10) que comprende paredes laterales (11) y una pared de base (13) y que comprende opcionalmente una abertura (14) opuesta a la pared de base (13), en donde la salida de fluido B (2) y la abertura de entrada de muestra (4) están dispuestas en la pared de base (13) o al menos una de las paredes laterales (11);
- 15 d) el saliente de conexión de cámara de reacción (20) que comprende las paredes laterales (21) y una pared de base (23), en donde la salida de muestra (5) y opcionalmente la abertura de fluido A (7) están dispuestas en la pared de base (23) o al menos en una de las paredes laterales (21);
- e) el cuerpo de cartucho (33) comprende un tubo (30) con una primera abertura terminal (31) y una segunda abertura terminal (32), en donde la primera abertura terminal (31) está alineada con la abertura de entrada de muestra (4), en donde preferiblemente el tubo (30) es un tubo longitudinal rígido;
- 20 f) las paredes laterales (11) del saliente de conexión de recipiente de muestra (10) y/o las paredes laterales (21) del saliente de conexión de cámara de reacción (20) forman un cuerpo tubular;
- 25 g) las paredes laterales (11) del saliente de conexión de recipiente de muestra (10) están adaptadas para encajar en una abertura del recipiente de muestra, en donde, preferiblemente, las paredes laterales (11) del saliente de conexión de recipiente de muestra (10) forman un cuerpo tubular y que el cuerpo tubular tiene una rosca externa (15) y/o las paredes laterales (21) del saliente de conexión de cámara de reacción (20) están adaptadas para encajar en una abertura de una cámara de reacción (38) que se puede ensamblar con dicho saliente (20), en donde, preferiblemente, las paredes laterales del saliente de conexión de cámara de reacción forman un cuerpo tubular y que el cuerpo tubular tiene una rosca externa;
- 30 h) el conducto de paso de muestra (6, 106) está provisto al menos parcialmente de un canal o una cavidad formados en la superficie del cuerpo de cartucho (33, 133) y/o el conducto de paso de fluido A (9, 109) está formado al menos parcialmente por un canal o una cavidad formados en la superficie del cuerpo de cartucho (33, 133) y/o el conducto de paso de fluido B (3, 103) está provisto al menos parcialmente de un canal o una cavidad formados en la superficie del cuerpo de cartucho (33, 133);
- 35 i) una tapa (152) está fijada al cuerpo de cartucho (33, 133), en donde la tapa cierra el canal o la cavidad que forma al menos parte del conducto de paso de muestra (6, 106), el conducto de paso de fluido A (9, 109) y/o el conducto de paso de fluido B (3, 103), en donde dicha tapa es preferiblemente una lámina;
- 40 j) el conducto de paso de muestra (6, 106) está formado al menos parcialmente por un canal o una cavidad formados en la superficie del cuerpo de cartucho (33, 133) y el conducto de paso de fluido A (9) está formado al menos parcialmente por un canal o una cavidad formados en la superficie del cuerpo de cartucho (33, 133) y en donde el conducto de paso de fluido B (3, 103) está formado al menos parcialmente por un canal o una cavidad formados en la superficie del cuerpo de cartucho, en donde una tapa (152) se fija al cuerpo de cartucho (33, 133) que cierra dichos canales o cavidades;
- k) la abertura de entrada de fluido B (1, 101), la salida de fluido B (2, 102), la abertura de entrada de muestra (4, 104), la salida de muestra (5, 105), la abertura de fluido A (7, 107) y la salida de fluido A (8, 108) opcional están dispuestas en la misma superficie del cuerpo de cartucho (33, 133);
- 45 l) la abertura de fluido A (7), la abertura de entrada de fluido B (1) y/o la salida de fluido A (8) opcional están cerradas por una membrana o un filtro (40);
- 50 m) el cuerpo de cartucho (33) comprende al menos un saliente de conexión de cámara de reacción (20) adicional para conectar una cámara de reacción (38) adicional con el cuerpo de cartucho (33), en donde dicho saliente de conexión de cámara de reacción (20) adicional comprende los mismos elementos que el saliente de conexión de cámara de reacción (20) descrito en las reivindicaciones precedentes, y en donde la salida de muestra (5) de dicho saliente de conexión de cámara de reacción (20) adicional está en comunicación fluida con el conducto de paso de muestra (6, 106);
- n) el cuerpo de cartucho comprende al menos una cámara de reacción adicional que está en comunicación fluida con el conducto de paso de muestra (6, 106);

o) la salida de muestra (5) y/o la abertura de fluido A (7) están diseñadas como un tubo en donde dicho tubo está comprendido al menos parcialmente en una pared lateral de una cámara de reacción (38) y/o en una pared lateral del saliente de conexión de cámara de reacción (20);

5 p) el cuerpo de cartucho (33) comprende una salida de fluido A (8) y un conducto de paso de fluido A (9) que conecta la abertura de fluido A (7) y la salida de fluido A (8); y/o

q) el cuerpo de cartucho se caracteriza por medios que permiten cerrar el conducto de paso de muestra (6) y/o el conducto de paso de fluido A (9).

18. Un método operativo para llevar a cabo un método de análisis usando un sistema para realizar un método analítico de una muestra que comprende biomoléculas, en donde dicho sistema comprende

10 a) un cartucho de procesamiento según una o varias de las reivindicaciones 9 a 13; en donde el cartucho de procesamiento comprende al menos una cámara de reacción (38) que comprende una composición seca que comprende reactivos para el método analítico;

b) un recipiente de muestra (39) para recibir una muestra que comprende biomoléculas, en donde el recipiente (39) se puede ensamblar con el cartucho de procesamiento;

15 c) un dispositivo de procesamiento para recibir el cartucho de procesamiento que comprende el recipiente ensamblado con el mismo y para realizar el método de análisis junto con el cartucho de procesamiento;

y en donde el método comprende

a) conectar un recipiente de muestra que comprende una muestra con el cartucho de procesamiento según una o varias de las reivindicaciones 9 a 13;

20 b) insertar el cartucho de procesamiento en un dispositivo de procesamiento; y

c) comenzar un ensayo completamente automático.

Fig. 1

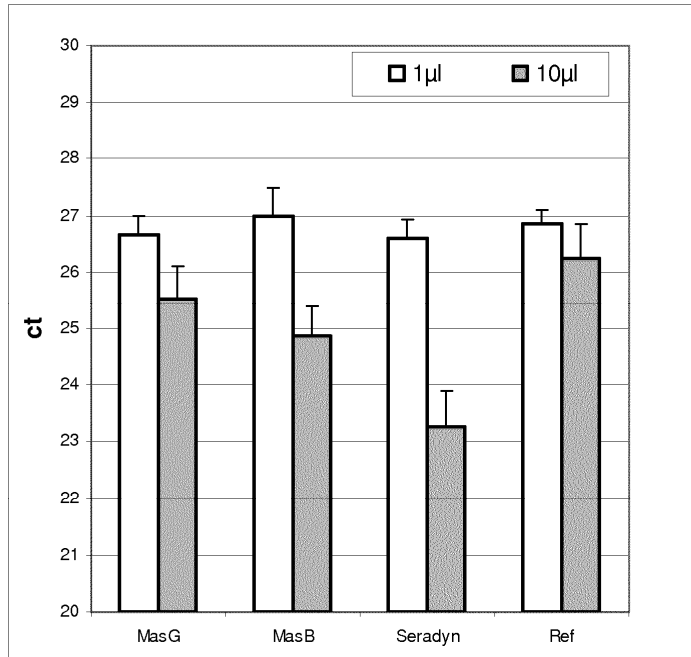


Fig. 2

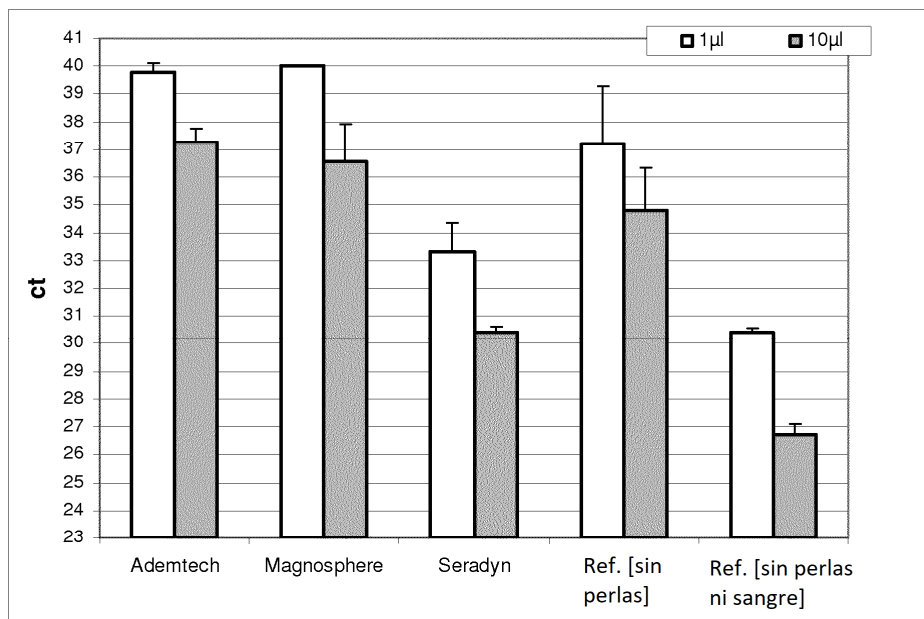


Fig. 3

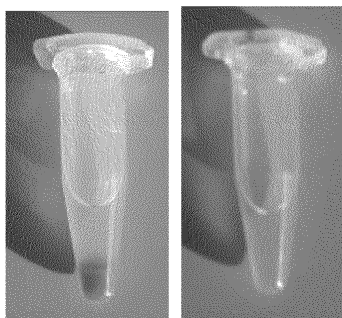


Fig. 4

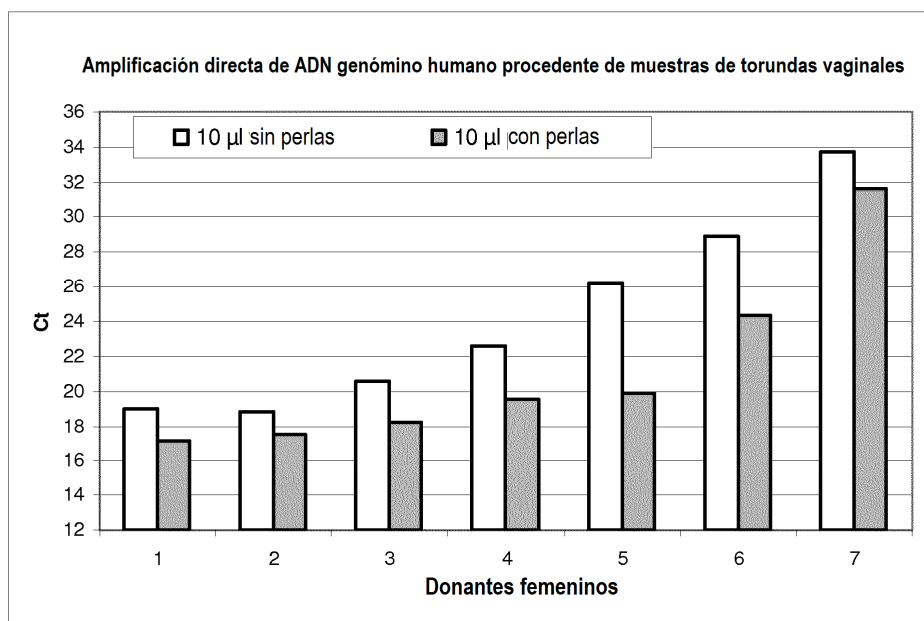


Fig. 5

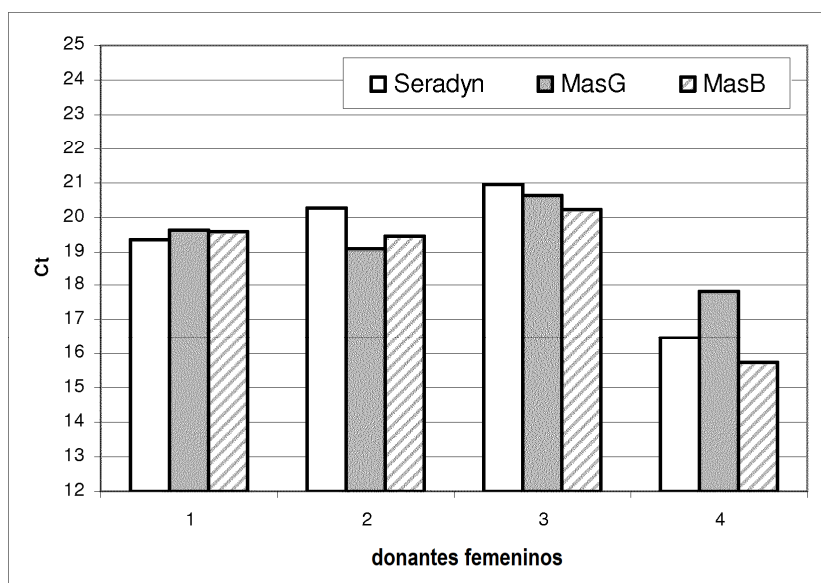


Fig. 6

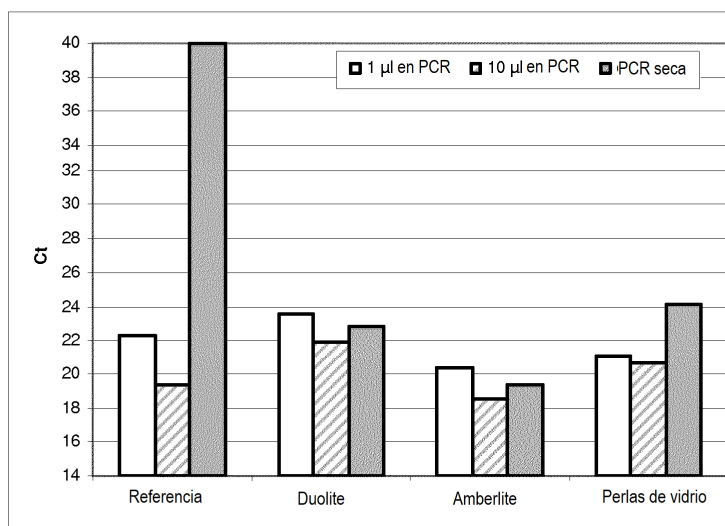


Fig. 7

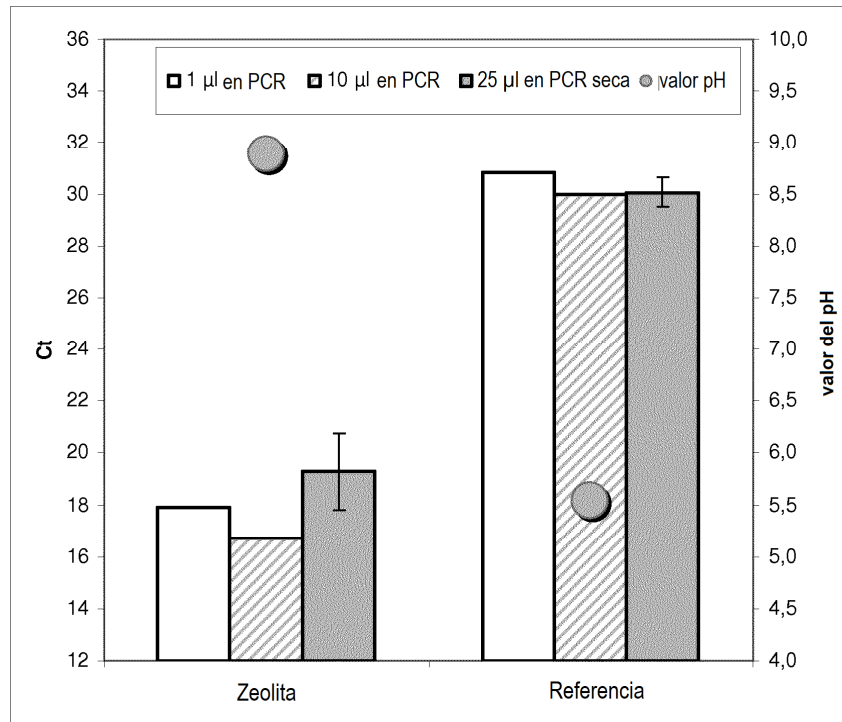


Fig. 8

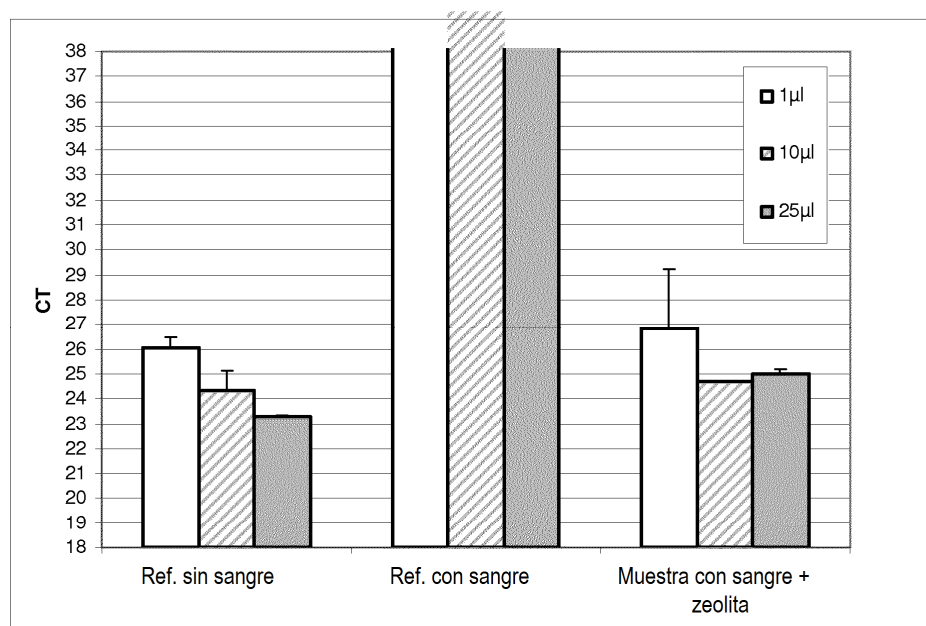


Fig. 9

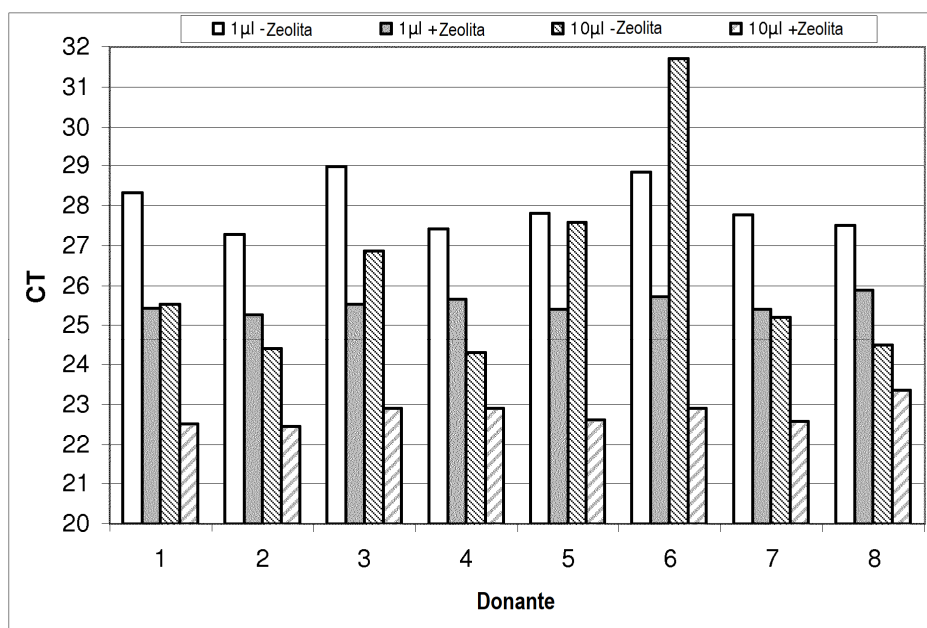


Fig. 10

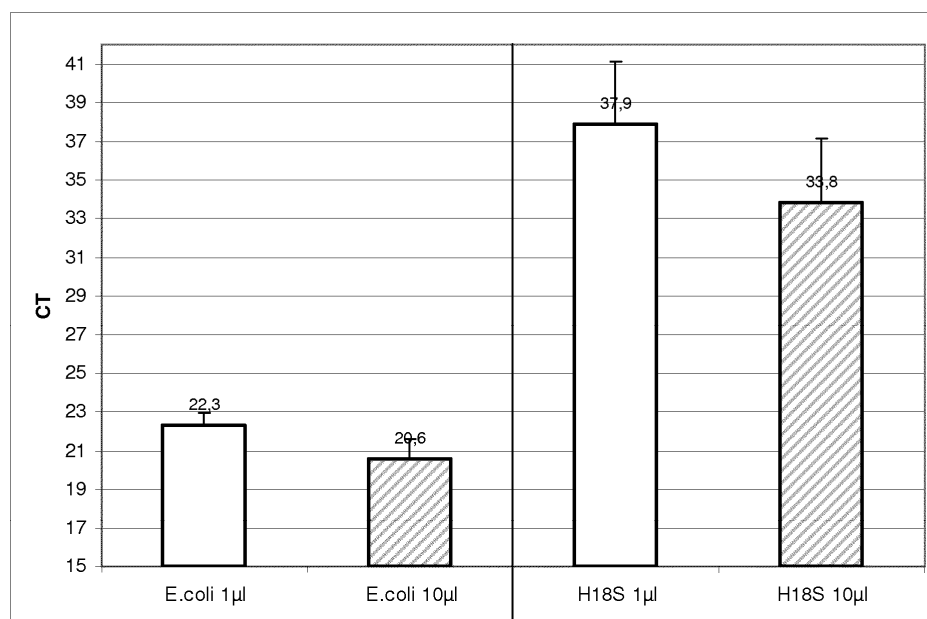


Fig. 11

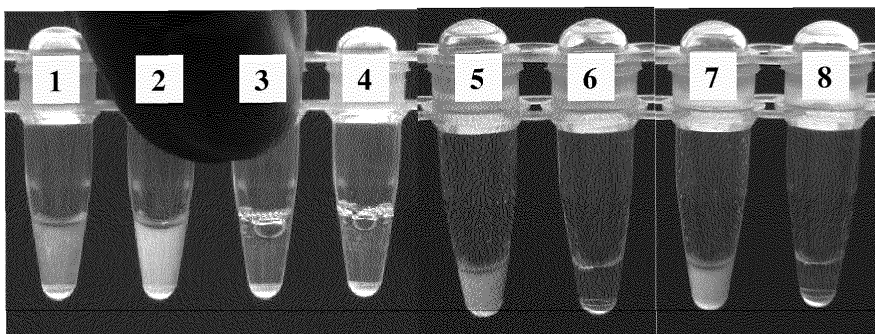
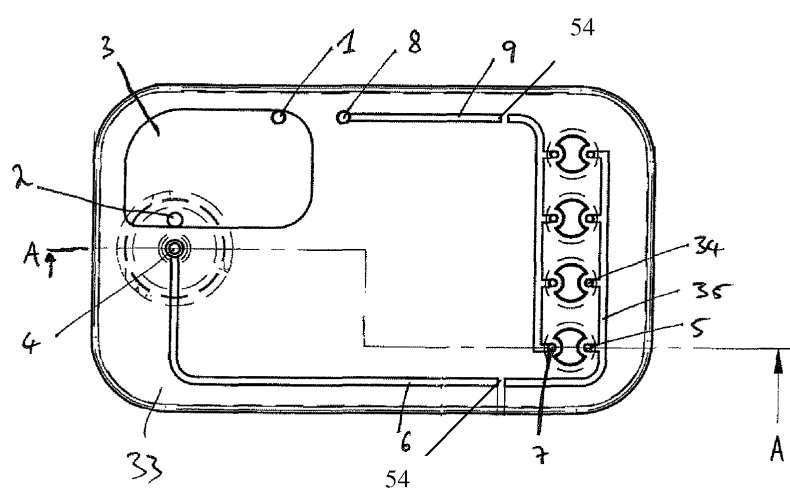


Fig. 12

a)



b)

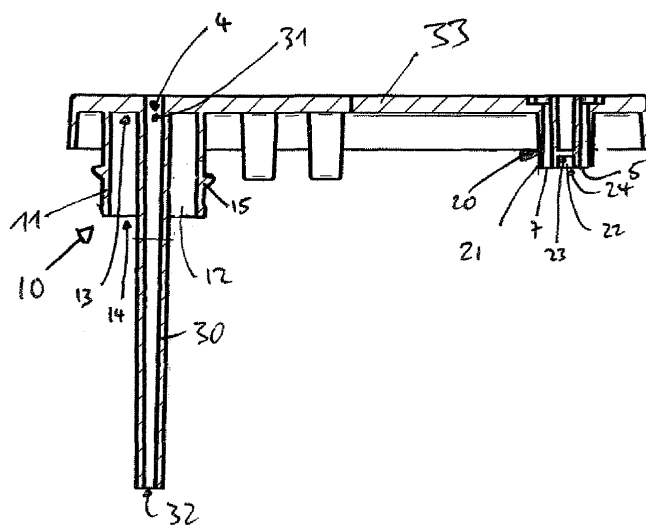
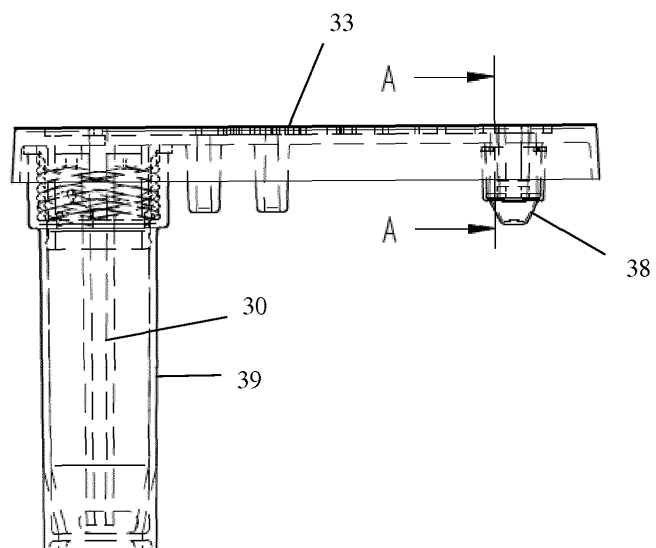


Fig. 13

a)



b)

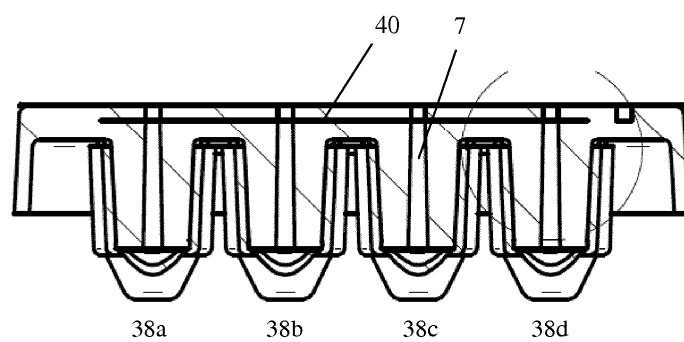


Fig. 14

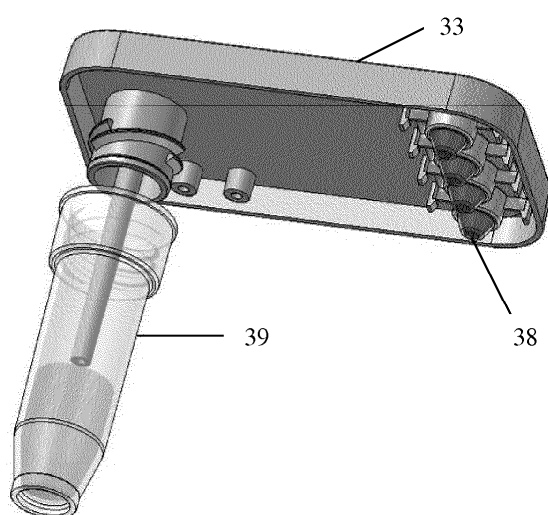


Fig. 15

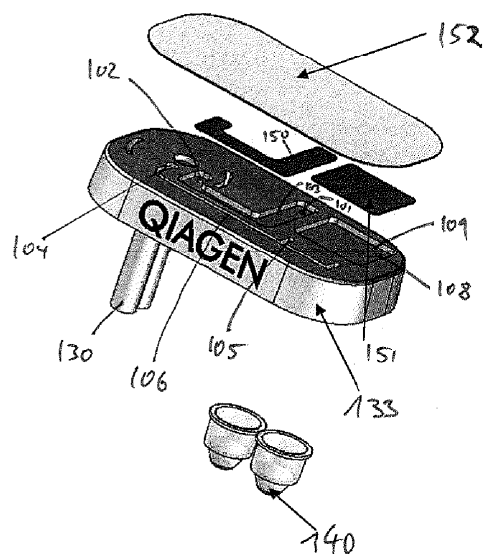


Fig. 16

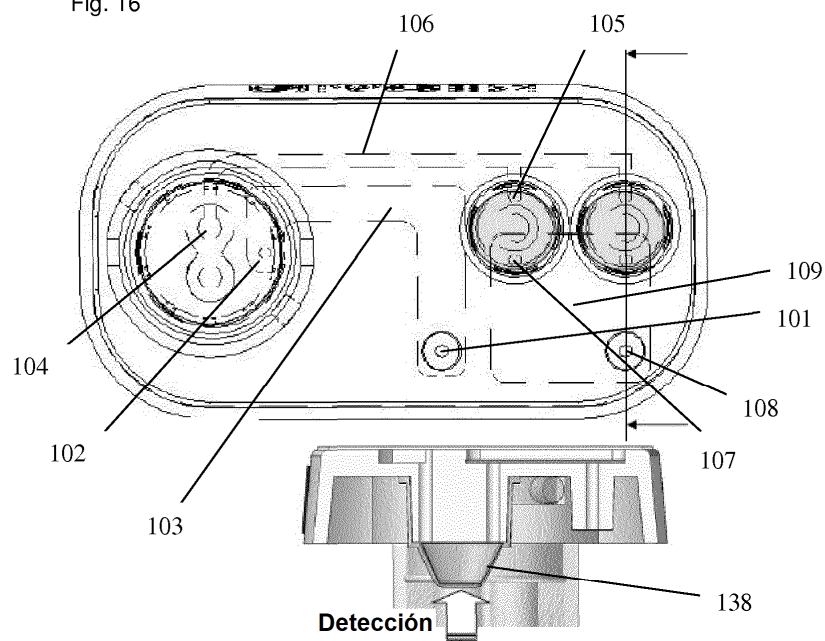


Fig. 17

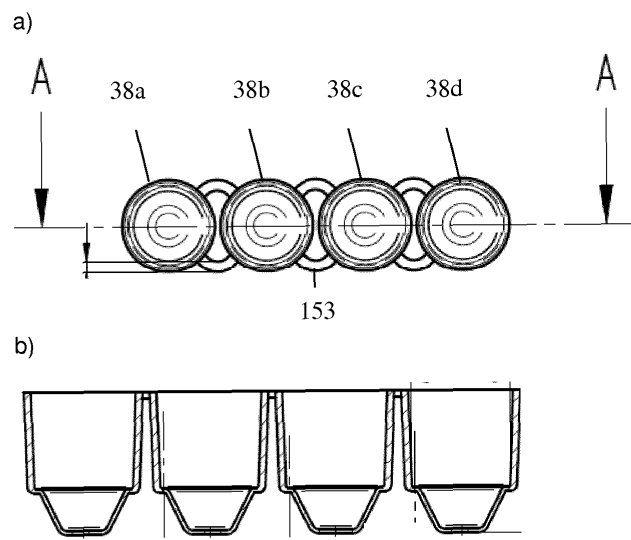


Fig. 18

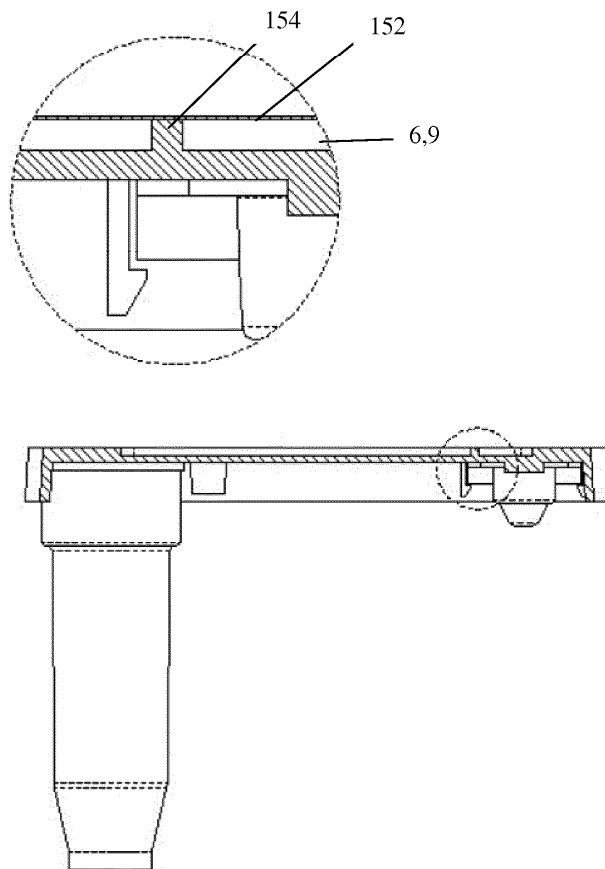


Fig. 19

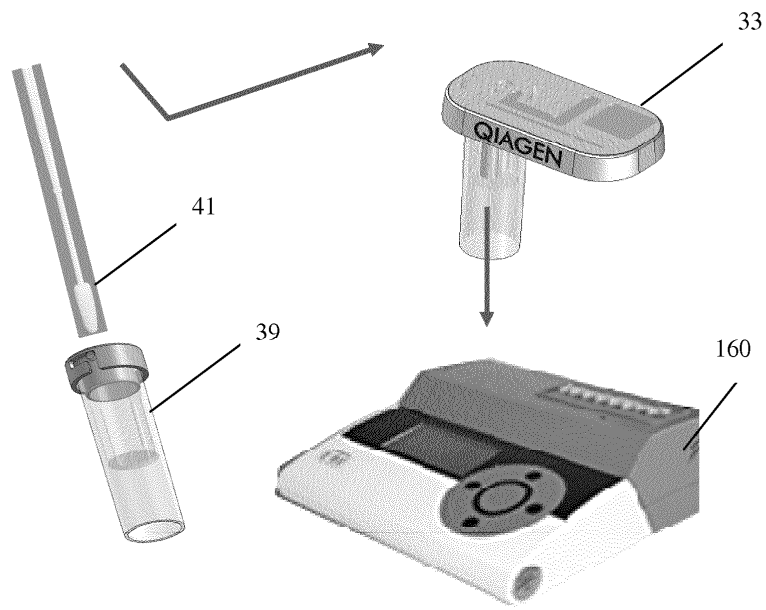


Fig. 20

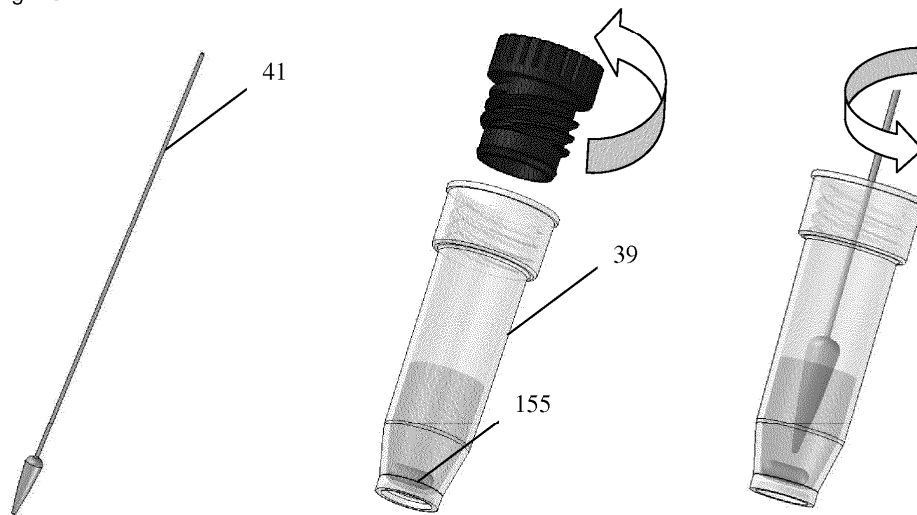


Fig. 21

