



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 112014025389-7 B1



(22) Data do Depósito: 11/04/2013

(45) Data de Concessão: 01/06/2021

(54) Título: SISTEMA PARA HOMOGENEIZAÇÃO OU LISE DE UMA AMOSTRA, E, MÉTODO PARA LISE DE UMA AMOSTRA

(51) Int.Cl.: B01F 7/00; B01F 13/10; C12M 1/00; C12N 1/06; G01N 1/38.

(30) Prioridade Unionista: 11/04/2012 US 61/622858; 15/03/2013 US 13/836741.

(73) Titular(es): STAT-DIAGNOSTICA & INNOVATION, S.L..

(72) Inventor(es): JORDI CARRERA FABRA; ANNA COMENGES CASAS; RICARD MARTIN BLANCO; RAFAEL BRU GIBERT.

(86) Pedido PCT: PCT EP2013057625 de 11/04/2013

(87) Publicação PCT: WO 2013/153176 de 17/10/2013

(85) Data do Início da Fase Nacional: 10/10/2014

(57) Resumo: SISTEMAS PARA PELO MENOS UMA DE HOMOGENEIZAÇÃO E DE LISE DE UMA AMOSTRA E PARA A REALIZAÇÃO DE TESTES MOLECULARES, E, MÉTODOS PARA LISE DE UMA AMOSTRA E PARA HOMOGENEIZAR UMA AMOSTRA. Um sistema para pelo menos um de homogeneização e de lise de uma amostra inclui uma ou mais paredes que formam uma câmara encerrada que tem uma entrada e uma pluralidade de conexões fluídicas. Uma primeira rede fluídica é acoplada a pelo menos uma da pluralidade de conexões fluídicas e uma segunda rede fluídica está acoplada a pelo menos uma da pluralidade de conexões fluídicas. O sistema inclui ainda um elemento rotativo no interior da câmara, e um atuador configurado para rotar o elemento rotativo. A primeira rede fluídica está configurada para introduzir pelo menos uma amostra na câmara a partir de pelo menos um primeiro reservatório. A segunda rede fluídica está configurada para expelir pelo menos a amostra a partir da câmara para pelo menos um segundo reservatório. O elemento rotativo é rotado pelo acionador em torno de um eixo geométrico que se estende ao longo do comprimento do elemento rotativo.

SISTEMA PARA HOMOGENEIZAÇÃO OU LISE DE UMA AMOSTRA, E, MÉTODO PARA LISE DE UMA AMOSTRA

FUNDAMENTOS

Campo

[0001] As formas de realização da presente invenção referem-se a agitadores de glóbulo.

Fundamento

[0002] Dada a complexidade da automação do teste molecular e técnicas de imunoensaio, existe uma falta de produtos que forneçam desempenho adequado para serem clinicamente utilizáveis em cenários de teste próximos ao paciente. O Teste molecular típico inclui vários processos que envolvem a dosagem correta de reagentes, introdução de amostra, homogeneização de amostra, lise de células para extrair DNA e/ou RNA, etapas de purificação, e amplificação para a sua detecção subsequente. Embora existam plataformas robóticas de laboratório central que automatizam alguns destes processos, para muitos testes que requerem um tempo de ciclo curto, o laboratório central não pode fornecer os resultados nas exigências de tempo necessários.

[0003] A homogeneização e/ou lise de um espécime biológico é usualmente a etapa inicial em um processo de teste tal que um análito ou análitos adequadamente purificados podem ser obtidos para o teste molecular. Falando no geral existem três métodos principais para lisar célula: químico, enzimático e físico. Estes processos podem ser usados sozinhos ou em combinação, sequencialmente ou em uma única etapa, para se obter um processo mais ideal. O uso de processos químicos e enzimáticos pode se mostrar problemático visto que alguns produtos químicos usados para romper a parede da célula podem desnaturar qualquer uma das enzimas presentes ou gerar problemas em processos subsequentes.

[0004] Os métodos físicos para a ruptura de célula incluem

sonificação, aquecimento (usualmente entre 90°C e 100°C), congelamento-descongelamento repetidos, criação de mudanças rápidas e grandes na pressão e métodos mecânicos. Os métodos mecânicos envolvem a ruptura física da parede da célula através de forças físicas tais como forças de alto cisalhamento, moagem, e bombardeio da célula com partículas pequenas, frequentemente consistindo de glóbulos. Métodos mecânicos de rompimento têm várias vantagens. Eles frequentemente utilizam um processo de etapa única, são no geral muito rápidos, são passíveis de automação, e têm a capacidade para romper espécimes sólidos, tais como osso, onde o(s) análio(s) de interesse podem não ser tornados obtíveis sem a homogeneização mecânica.

BREVE SUMÁRIO

[0005] Os sistemas de agitador de glóbulo mecânicos e os métodos que podem ser integrados com um sistema de teste próximo ao paciente são fornecidos.

[0006] Em uma forma de realização, um sistema para pelo menos um de homogeneização e lise de uma amostra inclui uma ou mais paredes que formam uma câmara encerrada tendo uma entrada e uma pluralidade de conexões fluídicas. Uma primeira rede fluídica é ligada a pelo menos uma da pluralidade de conexões fluídicas e uma segunda rede fluídica é ligada a pelo menos uma da pluralidade de conexões fluídicas. O sistema inclui ainda um elemento rotativo dentro da câmara, e um atuador configurado para rodar o elemento rotativo. A primeira rede fluídica é configurada para introduzir pelo menos uma amostra dentro da câmara a partir de pelo menos um primeiro reservatório. A segunda rede fluídica é configurada para expelir pelo menos a amostra da câmara para pelo menos um segundo reservatório. O elemento rotativo é rotacionado pelo atuador em torno de um eixo que se estende ao longo de um comprimento do elemento rotativo.

[0007] Em um forma de realização, um sistema para realizar o teste

molecular inclui um alojamento com uma ou mais câmaras fluídicas e uma rede fluídica, um agitador de glóbulo disposto dentro do alojamento, e um atuador. A rede fluídica conecta pelo menos a uma ou mais câmaras fluídicas a uma câmara central móvel. O agitador de glóbulo inclui ainda uma ou mais paredes que formam uma câmara encerrada com uma entrada e uma pluralidade de conexões fluídicas, e um elemento rotativo dentro da câmara encerrada. Pelo menos uma porção da pluralidade de conexões fluídicas é ligada à rede fluídica do alojamento. O elemento rotativo é rotacionado pelo atuador em torno de um eixo que se estende ao longo de um comprimento do elemento rotativo.

[0008] Um método de exemplo de lisar uma amostra é descrito. O método inclui introduzir uma amostra dentro de uma câmara encerrada por intermédio de uma conexão fluídica ligada a uma rede fluídica que é ligada ainda a uma ou mais outras câmaras. O método inclui ainda rotacionar um elemento rotativo dentro da câmara encerrada ao longo de um eixo que se estende ao longo de um comprimento do elemento rotativo. O método inclui ainda lisar a amostra dentro da câmara encerrada por intermédio do movimento do elemento rotativo.

[0009] Um outro método de exemplo de lisar uma amostra é descrito. O método inclui introduzir uma amostra dentro de uma câmara encerrada por intermédio de uma conexão fluídica ligada a uma rede fluídica que é ligada ainda a uma ou mais outras câmaras. O método inclui ainda rotacionar um elemento rotativo dentro da câmara encerrada ao longo de um eixo que se estende ao longo de um comprimento do elemento rotativo. O método inclui ainda excitar uma pluralidade de glóbulos dentro da câmara encerrada pelo movimento do elemento rotativo. O método inclui ainda lisar a amostra dentro da câmara encerrada por intermédio do movimento do elemento rotativo e da pluralidade de glóbulos.

[00010] Um método de exemplo de homogeneizar uma amostra é

descrito. O método inclui introduzir uma amostra dentro de uma câmara encerrada por intermédio de uma conexão fluídica ligada a uma rede fluídica que é ligada ainda a uma ou mais outras câmaras. O método inclui ainda rotacionar um elemento rotativo dentro da câmara encerrada ao longo de um eixo que se estende ao longo de um comprimento do elemento rotativo. O método inclui ainda homogeneizar a amostra dentro da câmara encerrada por intermédio do movimento do elemento rotativo.

[00011] Um outro método de exemplo de homogeneizar uma amostra é descrito. O método inclui introduzir uma amostra dentro de uma câmara encerrada por intermédio de uma conexão fluídica ligada a uma rede fluídica que é ligada ainda a uma ou mais outras câmaras. O método inclui ainda rotacionar um elemento rotativo dentro da câmara encerrada ao longo de um eixo que se estende ao longo de um comprimento do elemento rotativo. O método inclui ainda excitar uma pluralidade de glóbulos dentro da câmara encerrada pelo movimento do elemento rotativo. O método inclui ainda homogeneizar a amostra dentro da câmara encerrada por intermédio do movimento do elemento rotativo e da pluralidade de glóbulos.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS/FIGURAS

[00012] Os desenhos anexos, que são aqui incorporados e formam uma parte do relatório descritivo, ilustram as formas de realização da presente invenção e, juntos com a descrição, servem ainda para explicar os princípios da invenção e para permitir que uma pessoa habilitada na técnica pertinente execute e use a invenção.

[00013] A FIG. 1 é uma representação gráfica de uma plataforma de cartucho de teste, de acordo com uma forma de realização.

[00014] As FIGs. 2A-2B demonstram um sistema de agitador de glóbulo, de acordo com as formas de realização.

[00015] As FIGs. 3A – 3B demonstram mais vistas de um sistema de agitador de glóbulo, de acordo com as formas de realização.

[00016] A FIG. 4 demonstra uma vista explodida de um sistema de agitador de glóbulo, de acordo com uma forma de realização.

[00017] A FIG. 5 demonstra uma vista mostrando o lado de dentro de um sistema de agitador de glóbulo, de acordo com uma forma de realização.

[00018] As FIGs. 6A – 6B demonstram vistas de seção transversal de um sistema de agitador de glóbulo, de acordo com as formas de realização.

[00019] As FIGs. 7A – 7E demonstram vistas de um elemento rotativo, de acordo com as formas de realização.

[00020] As FIGs. 8-11 são diagramas ilustrando métodos realizados pelo sistema de agitador de glóbulo, de acordo com as formas de realização.

[00021] A FIG. 12 é um gráfico de concentração de DNA medida de esporos de *Bacillus subtilis*.

[00022] A FIG. 13 é um gráfico da concentração de DNA medida de células vegetativas de *Bacillus subtilis*.

[00023] A FIG. 14 é um gráfico de DNA recuperado de células vegetativas de *Bacillus subtilis*.

[00024] A FIG. 15 é um gráfico da concentração de DNA e RNA medida de células vegetativas de *Bacillus subtilis*.

[00025] A FIG. 16 é um gráfico de recuperação de RNA a partir de células vegetativas de *Bacillus subtilis*.

[00026] As FIGs. 17A – 17C são perfis de rRNA de Bioanalisador a partir de *Bacillus subtilis*.

[00027] As formas de realização da presente invenção serão descritas com referência aos desenhos anexos.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[00028] Embora configurações e arranjos específicos sejam debatidos, deve ser entendido que isto é feito apenas para propósitos ilustrativos. Uma pessoa habilitada na técnica pertinente reconhecerá que outras configurações e arranjos podem ser usados sem divergir do espírito e escopo da presente

invenção. Estará evidente a uma pessoa habilitada na técnica pertinente que esta invenção também pode ser utilizada em uma variedade de outras aplicações.

[00029] É mencionado que referências no relatório descritivo a “uma forma de realização”, “uma forma de realização”, “uma forma de realização de exemplo”, etc., indicam que a forma de realização descrita pode incluir um traço, estrutura, ou característica particulares, mas cada forma de realização pode não necessariamente incluir o traço, estrutura, ou característica particulares. Além disso, tais frases não necessariamente se referem à mesma forma de realização. Além disso, quando um traço, estrutura ou característica particulares são descritos em conexão com uma forma de realização, os mesmos estariam dentro do conhecimento de uma pessoa habilitada na técnica para efetuar tal traço, estrutura ou característica em conexão com outras formas de realização estejam explicitamente descritos ou não.

[00030] As formas de realização aqui descritas referem-se a um sistema de agitador de glóbulo para homogeneização e/ou lise de uma amostra. A amostra pode ser um líquido, sólido, semissólido, ou uma combinação dos mesmos. Em uma forma de realização, o sistema de agitador de glóbulo é integrado com uma plataforma de cartucho de teste. A plataforma de cartucho de teste inclui uma rede de canais fluídicos, uma porção dos quais pode acoplar ao agitador de glóbulo integrado. Os canais fluídicos podem fornecer a amostra a uma câmara de agitador de glóbulo, extrair a amostra da câmara de agitador de glóbulo, e/ou serem usados para pressurizar a câmara do agitador de glóbulo.

[00031] O sistema de agitador de glóbulo é designado para o uso no rompimento físico de amostras pela rotação, por exemplo, de um elemento rotativo dentro da câmara do agitador de glóbulo. Este rompimento físico pode por sua vez ser auxiliado pela presença de glóbulos (por exemplo, glóbulos inertes feitas de vidro e/ou outros materiais). Em um exemplo, o

processo de lise e/ou homogeneização é otimizado ainda através do uso de um tampão de lise dentro da câmara do agitador de glóbulo. Em um outro exemplo, a lise enzimática é realizada pela aplicação de calor à amostra. O aquecimento da amostra pode ser realizado antes da batida com glóbulo real da amostra em alguns exemplos. Em uma forma de realização, todos os reagentes e componentes necessários do agitador de glóbulo estão contidos dentro da plataforma de cartucho de teste.

[00032] Em algumas formas de realização, tanto a plataforma de cartucho de teste quanto o agitador de glóbulo integrado são projetados para serem descartados depois do uso. Uma vez que os reagentes ou a amostra são colocados dentro do cartucho de teste, eles não entram novamente em contato com o ambiente externo ou com qualquer parte de um instrumento de medição externa. Este traço é importante para muitos laboratórios e hospitais para o descarte com segurança dos produtos depois do seu uso.

[00033] A câmara do agitador de glóbulo por si só é projetada para ser capaz de processar uma ampla variedade de espécimes e para romper uma ampla variedade de tipos de célula. Isto é, em parte, obtido pela disponibilidade de plataformas de cartucho de teste diferentes que são específicas para cada combinação particular de tipo de espécime/célula. Em um outro exemplo, condições variáveis que são controladas pelo analisador, tais como a velocidade e duração da rotação do elemento rotativo, permite processar uma ampla variedade de tipos de amostra.

[00034] Outros detalhes que referem-se aos componentes do sistema de agitador de glóbulo são aqui descritos com referências feitas às figuras. Deve ser entendido que as ilustrações de cada componente físico não são intencionados a ser limitante e que uma pessoa tendo habilitada na(s) técnica(s) relevante(s) dada a descrição aqui reconheceria modos para rearranjar ou de outro modo alterar qualquer um dos componentes sem desviar do escopo ou espírito da invenção.

[00035] A FIG. 1 ilustra um sistema de cartucho de teste de exemplo no qual um agitador de glóbulo pode ser integrado, de acordo com uma forma de realização. Embora referência será feita aqui à estrutura do sistema de cartucho de teste de exemplo, uma pessoa de habilidade na técnica reconhecerá que as formas de realização de agitador de glóbulo aqui descritas podem ser usadas com qualquer número de tipos e configurações de sistema de teste.

[00036] O sistema de cartucho de teste inclui um alojamento de cartucho 102 e um módulo de transferência 104. Outros componentes também podem ser considerados para a inclusão no sistema de cartucho de teste, tal como um módulo analisador ou vários componentes ativos tais como bombas ou aquecedores. O módulo de transferência 104 inclui um alojamento interno 110, uma camisa 108, e uma tampa 106. A camisa 108 é projetada para adaptar em torno do alojamento interno 110, de acordo com uma forma de realização. A tampa 106 é projetada para selar a extremidade do módulo de transferência 104 para prevenir o vazamento. O módulo de transferência 104 é projetado para ser inserido dentro do alojamento de cartucho 102 por intermédio do gabinete da câmara 120.

[00037] O alojamento de cartucho 102 inclui uma variedade de canais fluídicos, câmaras, e reservatórios. Por exemplo, o alojamento de cartucho 102 pode incluir uma pluralidade de câmaras de armazenagem 116 que podem conter vários tampões ou outros reagentes a serem usados durante um ensaio ou protocolo de PCR. As câmaras de armazenagem 116 podem ser pré enchidas com vários líquidos de modo que o usuário final não necessitará encher as câmaras de armazenagem 116 antes de colocar o sistema de cartucho de teste dentro de um analisador. O alojamento de cartucho 102 pode incluir ainda uma ou mais câmaras de processamento 124a-b conectadas aos canais fluídicos ao longo de um lado do alojamento de cartucho 102. As câmaras de processamento 124a-b podem ser usadas para uma variedade de

aplicações de processamento e/ou refugo. Em um exemplo, a câmara 124a é uma câmara de refugo, e a câmara 124b é uma câmara dimensionada para receber o comprimento de um cotonete tendo uma amostra sobre ele.

[00038] As amostras são introduzidas dentro do alojamento de cartucho 102 por intermédio do orifício de amostra 114, de acordo com uma forma de realização. Um usuário pode colocar um cotonete completamente dentro do orifício de amostra 114 e a sua câmara correspondente 124b, e subsequentemente selar o orifício com uma tampa de orifício 112. Em um outro exemplo, o orifício de amostra 114 recebe amostras sólidas, semissólidas, ou líquidas. Em uma forma de realização, o alojamento de cartucho 102 inclui mais do que uma entrada para introduzir amostras.

[00039] As várias câmaras e canais em torno do alojamento de cartucho 102 podem ser seladas por intermédio do uso das coberturas 118, 126, 127, e 128. As coberturas podem ser películas capazes de selar o fluido dentro do alojamento de cartucho 102. Em um outro exemplo, as coberturas podem ser painéis plásticos. Em um exemplo, uma ou mais das coberturas são transparentes. Adicionalmente, uma ou mais das coberturas podem ser termicamente controladas para o aquecimento de porções do alojamento 102.

[00040] O sistema de cartucho de teste integrado permite que um usuário coloque uma amostra, por exemplo, dentro do orifício de amostra 114, depois coloque o sistema de cartucho de teste dentro de um analisador. Nas formas de realização, as etapas de reação a serem realizadas incluindo, por exemplo, purificação, lise, mistura, ligação, rotulação e/ou detecção podem ser todas realizadas dentro do sistema de cartucho de teste por intermédio de interação com o analisador sem nenhuma necessidade de intervenção do usuário final. Adicionalmente, visto que todos os líquidos permanecem selados dentro do sistema de cartucho de teste, depois que o teste é completado, o sistema de cartucho de teste pode ser removido do analisador e descartado com segurança sem contaminação do analisador.

[00041] O sistema de cartucho de teste pode incluir ainda canais fluídicos que levam a uma câmara de processamento interna tendo uma abertura 132. Em uma forma de realização, a câmara de processamento interna é uma câmara integrada ao agitador de glóbulo disposta dentro do alojamento de cartucho 102. Embora a própria câmara esteja escondida da vista na FIG. 1, vários outros componentes do sistema são mostrados na vista explodida. Por exemplo, o sistema de agitador de glóbulo inclui uma tampa de processamento 134 que se adapta na abertura 132. Dentro da própria câmara, um elemento rotativo 136 é disposto, de acordo com uma forma de realização. Em uma forma de realização, o elemento rotativo 136 acopla-se a um atuador (não mostrado) por intermédio da vedação 138 e bucha 139. A vedação 138 e bucha 139 podem ser mantidas no lugar por um suporte 140. Em um exemplo, a vedação 138 é uma vedação labial. Outros tipos de componentes de vedação podem ser utilizados. O suporte 140 também pode ajustar-se na extremidade da câmara de processamento interna e vedar a mesma de qualquer vazamento. Cada um dos componentes do sistema de agitador de glóbulo será explicado aqui em mais detalhes.

[00042] As FIGs. 2A e 2B ilustram as formas de realização de exemplo de um sistema de agitador de glóbulo rotativo. Aos traços similares em ambas as formas de realização são dados o mesmo rótulo numérico. A descrição de cada forma de realização é apresentada para descrever traços que podem estar presentes no ou dentro do sistema de agitador de glóbulo, mas não deve ser limitante como para as propriedades de colocação ou dimensionais dos traços.

[00043] As FIGs. 2A e 2B fornecem uma vista em perspectiva de um agitador de glóbulo 201 que pode ser integrado dentro do sistema de cartucho de teste, de acordo com as formas de realização. A vista externa do agitador de glóbulo 201 ilustrado na FIG. 2B demonstra a entrada de processamento 132 em uma superfície de topo do agitador de glóbulo 201, de acordo com uma forma de realização. Na forma de realização do agitador de glóbulo

ilustrado na FIG. 2A, a entrada de processamento está em um lado do agitador de glóbulo 201 voltado para a página, e assim não é mostrado. A entrada de processamento 132 é configurada para aceitar qualquer tipo de amostra, incluindo líquido, sólido, semissólido, ou qualquer combinação dos mesmos. A entrada de processamento 132 leva para dentro de uma câmara encerrada onde o processo de batida com glóbulo ocorre. Em um outro exemplo, as amostras que entram pela entrada de processamento 132 são levadas a uma primeira câmara, e depois transferidas da primeira câmara para dentro de uma segunda câmara onde o processo de batida com glóbulo ocorre.

[00044] Em um lado do agitador de glóbulo 201, as entradas de fluido são fornecidas para acoplar com uma rede fluídica. A forma de realização do agitador de glóbulo da FIG. 2A tem três entradas de fluido 203a-c, enquanto que a forma de realização do agitador de glóbulo da FIG. 2B tem duas entradas de fluido 203a e 203b. Por exemplo, as entradas de fluido 203a-c podem acoplar a qualquer uma das câmaras de armazenagem 116 do alojamento de cartucho 102. Em uma forma de realização, as entradas de fluido de 203a-c levam para dentro da câmara onde a batida com glóbulo ocorre. Como tal, as entradas de fluido 203a-c podem ser usadas para introduzir qualquer líquido dentro da câmara de batida com glóbulo, extraíndo qualquer líquido da câmara de batida com glóbulo, ou para aplicar uma pressão diferencial na câmara de batida com glóbulo, ou qualquer combinação dos mesmos. Deve ser entendido que qualquer número de conexões fluídicas pode existir levando para dentro da câmara de batida com glóbulo. Além disso, qualquer uma da pluralidade de conexões fluídicas pode levar a uma ou mais câmaras de alojamento de cartucho 102. Em uma forma de realização, uma primeira rede fluídica é ligada às entradas de fluido e introduz pelo menos uma amostra à câmara de um primeiro reservatório, enquanto que uma segunda rede fluídica está ligada às conexões fluídicas e é usada para expelir pelo menos a amostra da câmara para um segundo reservatório. Em uma

forma de realização, as redes fluídicas, o agitador de glóbulo, e os reservatórios formam um sistema fechado.

[00045] Externo ao agitador de glóbulo 201, um sistema atuador 202 é ligado ao elemento rotativo 136 (não mostrado) disposto dentro da câmara do agitador de glóbulo, de acordo com uma forma de realização. Em um exemplo, o sistema atuador 202 é um atuador rotativo. O sistema atuador 202 pode receber vários sinais por intermédio do acoplamento 204. Por exemplo, os sinais podem incluir sinais de energia ou controle. O acoplamento 204 pode representar fios, sinais de RF, ou sinais ópticos. O sistema atuador 202 pode rotacionar o elemento rotativo 136 em qualquer velocidade dentro das capacidades do sistema atuador 202. Em um exemplo, o sistema atuador 202 rotaciona o elemento rotativo 136 nas velocidades que variam de 50 RPM a 30.000 RPM.

[00046] A forma de realização do agitador de glóbulo 201 ilustrada na FIG. 2A também inclui uma cavidade 205 disposta em uma parede lateral do agitador de glóbulo 201. A cavidade 205 pode ser coberta por um material termicamente condutivo, tal como, por exemplo, uma folha de alumínio. Pelo aquecimento do material termicamente condutivo, os conteúdos dentro da câmara de processamento interna do agitador de glóbulo 201 pode ser aquecido por intermédio da cavidade 205. Deve ser entendido que a colocação da cavidade 205 não é limitada ao lado do agitador de glóbulo 201. A cavidade também pode estar disposta no topo do agitador de glóbulo 201 ou em uma superfície traseira do agitador de glóbulo 201. Em um outro exemplo, uma ou mais das paredes da câmara de processamento interna pode ser uma superfície termicamente controlada para aquecer os conteúdos da câmara de processamento interna sem requerer uma cavidade. Uma ou mais das paredes da câmara de processamento interna pode ser fabricada a partir de metais tendo uma alta condutividade térmica tal como alumínio, cobre, etc. Introduzir calor dentro da câmara de processamento interna pode permitir que

a lise enzimática de uma amostra ocorra. Em um exemplo, a lise enzimática pode ser realizada usando um calor aplicado a uma amostra antes que a batida com glóbulo real da amostra comece.

[00047] A FIG. 3A ilustra uma outra vista do agitador de glóbulo 201 com atuador 202 separado do corpo principal do agitador de glóbulo 201. Um elemento de acoplamento 302 é fornecido para ligar o atuador 202 ao elemento rotativo 136 (não mostrado) dentro da câmara do agitador de glóbulo. O elemento de acoplamento 302 pode ser, por exemplo, um eixo, parafuso, ou um recesso para receber um outro elemento. O atuador 202 é configurado para ser manual ou automaticamente destacável do elemento rotativo 136 dentro da câmara do agitador de glóbulo com pouco esforço requerido pelo usuário. O elemento de acoplamento 302 pode ser adequadamente formado para se ajustar dentro de uma porção de recebimento do elemento rotativo 136, ou pode por si só receber uma porção do elemento rotativo 136. De acordo com uma forma de realização, a rotação do elemento de acoplamento 302 causa a rotação do elemento rotativo 136.

[00048] A FIG. 3B ilustra uma outra vista de agitador de glóbulo 201, de acordo com uma forma de realização. A FIG. 3B ilustra uma vista por outro ângulo do agitador de glóbulo 201 como mostrado na FIG. 2A com o atuador 202 removido. O suporte 140 é mostrado introduzido dentro de um buraco na lateral do agitador de glóbulo 201, de acordo com uma forma de realização. Uma porção externa do suporte 140 inclui um recesso 304. Dentro do recesso 304, parte do elemento rotativo 136 estende-se para fora da câmara encerrada, de acordo com uma forma de realização. Esta seção do elemento rotativo 136 inclui uma estrutura 306. A estrutura 306 pode ser projetada para ajustar firmemente dentro do elemento de acoplamento 302 do atuador 202. Em um exemplo, a rotação do elemento de acoplamento 302 pelo atuador 202 faz com que substancialmente a mesma rotação ocorra com a estrutura 306 na extremidade do elemento rotativo 136.

[00049] A FIG. 4 ilustra uma vista explodida de vários componentes do elemento rotativo 136 e atuador 202, de acordo com uma forma de realização. A abertura 401 do agitador de glóbulo 201 acolhe o suporte 140 que facilita a conexão do atuador 202 com o elemento rotativo 136, de acordo com uma forma de realização. Elementos adicionais também podem ser incluídos para conectar o elemento rotativo 136 ao atuador 202, tal como, por exemplo, vedação 138 e bucha 139. Estes elementos também podem fornecer uma barreira para impedir as amostras dentro da câmara do agitador de glóbulo de vazarem para fora da área em volta de onde o elemento rotativo 136 estende-se para fora da câmara.

[00050] O eixo 402 conecta a estrutura 306 na extremidade do elemento rotativo 136 com um corpo rotativo 404, de acordo com uma forma de realização. O corpo rotativo 404 pode assumir várias formas e tamanhos. O comprimento do eixo 402 pode ser ajustável para vários tamanhos de câmaras de agitador de glóbulo. Deve ser mencionado que, em algumas formas de realização, todos os componentes mostrados exceto para o atuador 202 são concebidos para serem descartáveis depois de um uso único, ou série de usos durante um único teste, de agitador de glóbulo 201.

[00051] Também ilustrado em um lado do agitador de glóbulo 201 são uma pluralidade de fritas 406. Cada frita 406 pode incluir vários materiais projetados para filtrar ou aprisionar vários tamanhos de partícula. Em um exemplo, a frita 406 é um material plástico tendo uma malha fina com tamanhos de poro selecionáveis que podem variar em qualquer lugar entre 5 microns a 500 microns. Em uma forma de realização, a frita 406 tem um tamanho de poro em torno de 20 microns. O fluido extraído da câmara de agitador de glóbulo pode passar através de pelo menos uma das fritas 406 de modo a ser filtrado.

[00052] A FIG. 5 ilustra uma vista dentro da câmara do agitador de glóbulo do agitador de glóbulo 201. Uma câmara encerrada 502 fornece a

área onde a homogeneização e/ou lise das amostras ocorrem. Em uma forma de realização, a câmara encerrada 502 é substancialmente cilíndrica na forma. A forma cilíndrica fornece um movimento de fluido eficiente em torno do elemento rotativo conforme o mesmo rotaciona. A câmara encerrada 502 também pode ter uma seção transversal retangular. Outras formas de câmara encerrada 502 também podem ser consideradas para realçar a agitação, por exemplo, de uma pluralidade de glóbulos dispostas dentro da câmara encerrada 502. O uso de uma pluralidade de glóbulos para melhorar o processo de homogeneização e/ou lise é descrito em mais detalhes com respeito à FIG. 6B.

[00053] Várias conexões fluídicas à câmara encerrada 502 são incluídas, de acordo com uma forma de realização. As entradas de fluido 203a-c são mostradas ao longo de uma lateral como anteriormente descrito. Em um exemplo, uma amostra e/ou outros líquidos podem ser introduzidos dentro da câmara encerrada 502 por intermédio da entrada de fluido 203a ou 203b. Em um outro exemplo, a mistura resultante a seguir da lise ou homogeneização pode ser expelida da câmara encerrada 502 por intermédio da entrada de fluido 203c. As várias conexões fluídicas podem ser colocadas em qualquer lugar em torno da câmara encerrada 502 e em qualquer ângulo. A entrada de processamento 132 e cavidade de aquecimento 205 também são ilustradas nas laterais da câmara encerrada 502. Uma superfície termicamente controlada pode vedar a cavidade de aquecimento 205 e aquecer os conteúdos da câmara encerrada 502. Em um exemplo, o aquecimento dos conteúdos da câmara encerrada 502 faz com que a lise enzimática ocorra. Em um outro exemplo, o eixo 402 pode ser rotacionado para agitar a amostra e homogeneizar a temperatura dentro da câmara encerrada 502 durante o processo de aquecimento.

[00054] A FIG. 6A ilustra uma vista lateral do agitador de glóbulo 201 examinando dentro da entrada de processamento 132 com a cobertura

removida, de acordo com uma forma de realização. Em um exemplo, o corpo rotativo 404 é observado como sendo substancialmente centralizado dentro da câmara encerrada 502.

[00055] A FIG. 6B ilustra uma vista de seção transversal do interior da câmara encerrada 502 incluindo o suporte 140, de acordo com uma forma de realização. O eixo 402 estende-se através do suporte 140 e conecta ao corpo rotativo 404 dentro da câmara encerrada 502. Uma extremidade do eixo 402 é configurada para se adaptar dentro de um entalhe 602 da câmara encerrada 402, de acordo com uma forma de realização. O entalhe 602 pode ser usado para estabilizar a posição do eixo 402 dentro da câmara encerrada 502, enquanto ainda permite a rotação do corpo rotativo 404. A câmara encerrada 502 pode também incluir uma pluralidade de glóbulos 604. Os glóbulos podem ser incluídos para ajudar no processo de homogeneização e/ou lise de uma amostra dentro da câmara encerrada 502. A rotação do corpo rotativo 404 também excita a pluralidade de glóbulos 604 em movimento. Os glóbulos individuais na pluralidade de glóbulos 604 pode variar no tamanho de um micron no diâmetro até 3000 microns no diâmetro. Adicionalmente, a pluralidade de glóbulos 604 pode ser fabricada a partir de vários materiais inertes, incluindo plásticos, vidro, cerâmicas, e sílica.

[00056] As FIGs. 7A a 7E ilustram várias formas de realização de elemento rotativo 136. Estas formas de realização são exemplares, e deve ser entendido que outros projetos também podem ser considerados por uma pessoa tendo habilidade comum na técnica dada a descrição aqui. O elemento rotativo 136 em cada forma de realização inclui o eixo 402 com estrutura 306 em uma extremidade como descrito anteriormente. Vários projetos são ilustrados para o corpo 702 e pontos salientes 704. O corpo 702 pode ser qualquer material adequadamente duro o bastante para realizar a homogeneização de tipos de amostra duros, tais como osso e tecido. Adicionalmente, o corpo 702 pode ser um material que é biocompatível. Os

pontos salientes 704 são fornecidos para dar uma forma padronizada ao corpo 702. A rotação dos pontos salientes 704 dentro da câmara encerrada 502 causa o movimento rápido da amostra e qualquer outro material em torno da câmara. Em um outro exemplo, a rotação de pontos salientes 704 causa a excitação e movimento da pluralidade de glóbulos 604. Cada projeto ilustrado também inclui um pino 706 em uma extremidade do elemento rotativo 136, de acordo com algumas formas de realização. O pino 706 pode ser configurado para se adaptar dentro do entalhe 602 da câmara encerrada 502. Deve ser entendido que o pino 706 não é um elemento requerido do elemento rotativo 136, mas pode ser usado para realçar a estabilidade dentro da câmara encerrada 502.

[00057] As FIGs. 8-11 descrevem métodos de exemplo a serem utilizados para homogeneizar ou lisar uma amostra com ou sem glóbulos, de acordo com as formas de realização. Deve ser entendido que os métodos 800, 900, 1000, e 1100 descrevem sequências de operação de exemplo que podem ser realizadas com o agitador de glóbulo 201, e não devem ser considerados limitantes. Qualquer um dos métodos 800, 900, 1000, e 1100 também podem incluir uma etapa de aquecimento dos conteúdos dentro do agitador de glóbulo 201 para realizar uma lise enzimática. Em um exemplo, a lise enzimática é realizada antes que a batida com glóbulo ocorra.

[00058] A FIG. 8 demonstra um fluxograma de um método de exemplo 800 para lisar uma amostra usando o agitador de glóbulo 201. O objetivo da lise de célula é liberar conteúdos celulares que são requeridos para análise. Os exemplos de conteúdos celulares incluem, mas não são limitados a, DNA, RNA, polipeptídeos, enzimas, prions, proteínas, anticorpos, antígenos, alérgenos, e vírions.

[00059] No bloco 802, pelo menos a amostra é introduzida dentro de uma câmara encerrada por intermédio de um orifício de entrada conectado a uma rede fluídica. A amostra pode ser introduzida, por exemplo, através das

entradas de fluido 203a-c.

[00060] No bloco 804, um elemento rotativo é rotacionado dentro da câmara encerrada. O elemento rotativo é configurado para ser rotacionado ao longo de um eixo que se estende ao longo de um comprimento do elemento rotativo por um atuador externo.

[00061] No bloco 806, a amostra é lisada dentro da câmara encerrada por intermédio do movimento do elemento rotativo. O lisado pode ser transferido da câmara encerrada a uma segunda câmara por intermédio de uma das entradas de fluido 203a-c.

[00062] A FIG. 9 demonstra um fluxograma de um método de exemplo 800 para lisar uma amostra usando o agitador de glóbulo 201 contendo uma pluralidade de glóbulos. O objetivo da lise de célula é liberar conteúdos celulares que são requeridos para análise. Os exemplos de conteúdos celulares incluem, mas não são limitados a, DNA, RNA, polipeptídeos, enzimas, prions, proteínas, anticorpos, antígenos, alérgenos, e vírions. Os glóbulos incluídos atuam para acelerar o processo de dilacerar a parede das células para liberar os conteúdos celulares.

[00063] No bloco 902, pelo menos a amostra é introduzida dentro de uma câmara encerrada por intermédio de um orifício de entrada conectado a uma rede fluídica. A amostra pode ser introduzida, por exemplo, através das entradas de fluido 203a-c.

[00064] No bloco 904, um elemento rotativo é rotacionado dentro da câmara encerrada. O elemento rotativo é configurado para ser rotacionado ao longo de um eixo que se estende ao longo de um comprimento do elemento rotativo por um atuador externo.

[00065] No bloco 906, uma pluralidade de glóbulos dentro da câmara é excitada pelo movimento do elemento rotativo. Os glóbulos podem variar na forma, tamanho e/ou material como descrito anteriormente. O movimento adicionado dos glóbulos dentro da câmara fornece ainda o batimento das

células e leva a um processo de lise mais eficiente.

[00066] No bloco 908, a amostra é lisada dentro da câmara encerrada por intermédio do movimento do elemento rotativo e da pluralidade de glóbulos. O lisado pode ser transferido da câmara encerrada para uma segunda câmara por intermédio de uma das entradas de fluido 203a-c.

[00067] A FIG. 10 demonstra um fluxograma de um método do exemplo 1000 para homogeneizar uma amostra usando o agitador de glóbulo 201.

[00068] No bloco 1002, pelo menos a amostra é introduzida dentro de uma câmara encerrada por intermédio de um orifício de entrada conectado a uma rede fluídica. A amostra pode ser introduzida, por exemplo, através das entradas de fluido 203a-c ou através de qualquer outro orifício adequado. Em uma forma de realização, uma amostra sólida, semissólida, ou líquida pode ser fornecida para a homogeneização. Por exemplo, as amostras com uma alta viscosidade (por exemplo catarro, tecido, osso) são bem apropriadas para a homogeneização para decompor matrizes complexas que retêm os componentes celulares da amostra juntos.

[00069] No bloco 1004, um elemento rotativo é rotacionado dentro da câmara encerrada. O elemento rotativo é configurado para ser rotacionado ao longo de um eixo que se estende ao longo de um comprimento do elemento rotativo por um atuador externo.

[00070] No bloco 1006, a amostra é homogeneizada dentro da câmara encerrada por intermédio do movimento do elemento rotativo. A amostra homogeneizada pode ser lisada usando o agitador de glóbulo 201 ou transferida para uma outra câmara para processamento adicional.

[00071] A FIG. 11 demonstra um fluxograma de um método do exemplo 1000 para homogeneizar uma amostra usando o agitador de glóbulo 201 contendo uma pluralidade de glóbulos.

[00072] No bloco 1102, pelo menos a amostra é introduzida dentro de

uma câmara encerrada por intermédio de um orifício de entrada conectado a uma rede fluídica. A amostra pode ser introduzida, por exemplo, através das entradas de fluido 203a-c ou através de qualquer outro orifício adequado. Em uma forma de realização, uma amostra sólida, semissólida, ou líquida pode ser fornecida para a homogeneização. Por exemplo, amostras com uma alta viscosidade (por exemplo catarro, tecido, osso) são bem adequadas para a homogeneização para romper matrizes complexas que retêm os componentes celulares da amostra juntos.

[00073] No bloco 1104, um elemento rotativo é rotacionado dentro da câmara encerrada. O elemento rotativo é configurado para ser rotacionado ao longo de um eixo que se estende ao longo de um comprimento do elemento rotativo por um atuador externo.

[00074] No bloco 1106, uma pluralidade de glóbulos dentro da câmara é excitada pelo movimento do elemento rotativo. Os glóbulos podem variar na forma, tamanho e/ou material como descrito anteriormente. O movimento adicionado dos glóbulos dentro da câmara fornece batimento adicional da amostra e um processo de homogeneização mais eficiente.

[00075] No bloco 1108, a amostra é homogeneizada dentro da câmara encerrada por intermédio do movimento do elemento rotativo e da pluralidade de glóbulos. A amostra homogeneizada pode ser lisada usando o agitador de glóbulo 201 ou transferida para uma outra câmara para processamento adicional.

Exemplos

[00076] Os protocolos de exemplo realizados usando formas de realização do agitador de glóbulo 201 são agora debatidos. Tais protocolos são apenas exemplos, e não limitantes das formas de realização da presente invenção. Para os protocolos de exemplo, o DNA e RNA extraídos de várias amostras foram analisados e comparados com os controles para determinar a eficácia do agitador de glóbulo. Deve ser entendido que as etapas aqui citadas

fornecem apenas uns poucos exemplos possíveis para usar o sistema.

EXEMPLO 1: Extração do DNA dos endosporos de Bacillus subtilis

[00077] O *Bacillus subtilis*, também conhecido como o bacilo do feno ou bacilo da grama, é uma bactéria Gram-positiva, positiva em catalase. Um membro do gênero *Bacillus*, *B. subtilis* tem a forma de bastão, e tem a capacidade para formar um endosporo protetivo, duro, que permite que o organismo tolere condições ambientais extremas. Os endosporos de várias espécies de *Bacillus* são formados na esporulação, um processo que é no geral induzido pelos níveis reduzidos de nutrientes no ambiente. Os endosporos contêm um córtex de esporo externo que é extremamente resistente aos tratamentos físicos e químicos severos constituindo um desafio identificar um método de lise de esporo que possa ser completado em uns poucos minutos.

[00078] Um protocolo de exemplo para lisar as células de *Bacillus subtilis* é adaptado de W. Nicholson e P. Setlow, *Molecular Biological Methods for Bacillus*, Nova Iorque, John Wiley, pp. 391-450, 1990. Neste protocolo de exemplo, uma cultura de 100 ml de *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* (ATCC 6633) cultivados em meio de esporulação (SM) é turbilhonado, depois separado em dois volumes de 50 ml. Depois da centrifugação a 3750g por 15 minutos, as pelotas são lavadas de três a cinco vezes com 50 ml de água destilada fria estéril, cada lavagem sendo centrifugada a 3750g por 15 minutos. As pelotas finais são recolocadas em suspensão em 50 ml de água destilada fria estéril. As suspensões de esporo são tratadas com DNase para remover o DNA residual externo, quantificado e diluído a uma concentração final de 5×10^9 endosporos/ml. As diluições em 10 vezes em série são preparadas (5×10^9 , 5×10^7 , 5×10^5 , 5×10^3 e 50 endosporos/ml) em tampão de Tris-EDTA a ser usado como um material de partida no agitador de glóbulo rotativo fluidicamente integrado.

[00079] Primeiro, 400 mg de glóbulos de vidro estéreis, lavadas com ácido com um diâmetro de 150 a 212 μm (SIGMA G1145-100G) são

introduzidos dentro da câmara do agitador de glóbulo. Segundo, uma diluição de 200 µl de endosporos é recolocada em suspensão em 200 µl de tampão de Tris-EDTA 1x e é transferido para a câmara do agitador de glóbulo por intermédio da entrada de processamento. O agitador de glóbulo é operado com uma velocidade rotativa de 10.000 RPM por cerca de 2 minutos. Os ácidos nucléicos bacterianos são liberados quando os esporos são rompidos pela ação mecânica do agitador de glóbulo. As extrações de ácido nucléico permanecem estáveis por vários meses quando armazenados congelado a -80°C ou -20°C e podem ser congelados e descongelados várias vezes sem nenhuma perda significativa na sensibilidade analítica na PCR.

[00080] A amplificação e detecção de DNA de endosporos de *Bacillus subtilis* são realizadas no Sistema de PCR em Tempo Real StepOnePlus® da Applied Biosystems com a PremixExTaq (Sonda qPCR) da Takara (cat. RR390A), de acordo com as instruções do fabricante. 1,5 µl de lisado preparado é adicionado diretamente a uma reação de qPCR consistindo de 1x Premix Ex Taq (contém Ex Taq HS TaKaRa, Mistura de dNTP, Mg²⁺, e Tli RNaseH), 1x corante de referência ROX, 0,50 µM de cada iniciador SpoA específico de *Bacillus subtilis*, 0,20 µM de sonda TaqMan® SpoOA e 0,2 mg/ml de BSA; em um volume final de 15 µl. Em paralelo, os esporos sem processamento foram testados como controles não tratados (nas mesmas concentrações). 1,5 µl de água destilada é também adicionada a uma reação de qPCR como um controle negativo. As condições de ciclagem ideais para a sensibilidade e especificidade máximas são de 10 segundos a 95°C para a desnaturação inicial, depois cinquenta ciclos de duas etapas consistindo de 1 segundo a 95°C e 10 segundos a 60°C. A amplificação é monitorada durante cada ciclo de alongamento pela medição do nível de fluorescência. As concentrações de DNA também são calculadas pela interpolação dos valores de Ct (número de ciclos de PCR necessários para produzir um sinal positivo) em uma curva de calibração. A Tabela 1 abaixo fornece os iniciadores SpoOA

específicos de *Bacillus subtilis* e a sequência de sonda usada na reação de qPCR TaqMan®.

Tabela 1

Iniciador	Sequência (5' → 3')	Comprimento (pares de base)	Tamanho do produto (pares de base)
SpoOA F	ccatcatcgcaaagcagtatt	21	70
SpoOA R	tgggacgccgatttcattg	18	
Sonda SpoOA	ctcgacgcgagcatcacaagcatt	24	

[00081] A FIG. 12 fornece um gráfico dos resultados do protocolo de Extração do DNA para *Bacillus subtilis*. Os resultados são mostrados com base na concentração de DNA extraído comparados com a concentração de partida de esporos de *Bacillus subtilis*. Os resultados são uma média de 15 réplicas em cada concentração. Como observado, os endosporos lisados com o agitador de glóbulo rotativo fluidicamente integrado produziu concentrações de DNA mais altas do que os endosporos não tratados para cada concentração de partida dos esporos de *Bacillus subtilis*.

EXEMPLO 2: Extração do DNA de células vegetativas de Bacillus subtilis

[00082] Neste exemplo, o agitador de glóbulo é primeiro carregado com 400 mg de glóbulos de vidro estéreis, lavadas com ácido com um diâmetro de 150 a 212 µm (SIGMA G1145-100G). Um volume de 3 ml de cultura de caldo de *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* (ATCC 6633) células vegetativas na fase de mid-log de crescimento (OD₅₅₀ = 0,60 a 0,70) é centrifugado e a pelota é recolocada em suspensão em tampão de Tris-EDTA para se obter uma concentração de *Bacillus subtilis* final a 5 x 10⁸ CFU/ml. As diluições em série de Serial 10 vezes são preparadas (5 x 10⁸, 5 x 10⁶, 5 x 10⁴, 5 x 10² e 5 CFU/ml) em tampão de Tris-EDTA. 200 µl de diluição de células vegetativas são recolocados em suspensão em 200 µl de tampão de Tris-EDTA 1x e a mistura final é transferido para o dispositivo de agitador de glóbulo pela entrada de processamento. O agitador de glóbulo é operado com uma velocidade rotativa de 10.000 RPM por cerca de 2 minutos.

[00083] A amplificação e detecção de DNA reforçado de células vegetativas *Bacillus subtilis* são realizados no Sistema de PCR em Tempo

Real StepOnePlus® da Applied Biosystems com a PremixExTaq (Sonda qPCR) da Takara (cat. RR390A), de acordo com as instruções do fabricante. 1,5 µl de lisado preparado é adicionado diretamente a uma reação de qPCR consistindo de 1x Premix Ex Taq (contém Ex Taq HS TaKaRa, Mistura de dNTP, Mg²⁺, e Tli RNaseH), 1x corante de referência ROX, 0,50 µM de cada iniciador SpoA específico de *Bacillus subtilis*, 0,20 µM de sonda SpoOA TaqMan® (ver a tabela 1 do Exemplo 1) e 0,2 mg/ml de BSA; em um volume final de 15 µl. Em paralelo, as células vegetativas sem processamento foram testadas como controles não tratados (nas mesmas concentrações). 1,5 µl de água destilada é adicionado também a uma reação de qPCR como um controle negativo. As condições de ciclagem ideal para a sensibilidade e especificidade máximas são de 10 segundos a 95°C para a desnaturação inicial, depois cinquenta ciclos de duas etapas consistindo de 1 segundo a 95°C e 10 segundos a 60°C. A amplificação é monitorada durante cada ciclo de alongamento pela medição do nível de fluorescência. As concentrações de DNA também são calculadas pela interpolação de valores de Ct em uma curva de calibração.

[00084] A FIG. 13 fornece um gráfico dos resultados do protocolo de extração do DNA para células vegetativas *Bacillus subtilis*. Os resultados são mostrados com base na concentração de DNA extraída comparada com a concentração de partida de células. Os resultados são uma média de 15 réplicas em cada concentração. A detecção do lisado de células vegetativas de *B. subtilis* com o agitador de glóbulo rotativo fluidicamente integrado foi de aproximadamente entre 50 e 500 CFU/ml (10 a 100 CFU por reação). Nenhum sinal de amplificação foi observado nas células vegetativas de *B. subtilis* não tratadas até uma concentração de $5,0 \times 10^4$ CFU/ml.

EXEMPLO 3: Comparação da Recuperação de DNA para células vegetativas de Bacillus subtilis

[00085] Neste exemplo, um controle de DNA é extraído de células

vegetativas de *B.subtilis* subsp. *spizizenii* (ATCC 6633) usando um Kit de Purificação de RNA/DNA/Proteína Norgen. Para cada amostra, 1,6 ng de DNA é reforçado em 800 µl de uma solução tampão que também inclui um agente de quelatação (tampão de Tris-EDTA 1x, preparada a partir de tampão SIGMA Tris-EDTA concentrado 100x).

[00086] Em paralelo, um protocolo de lise é realizado nas células vegetativas de *Bacillus subtilis* preparadas substancialmente do mesmo modo e usando o agitador de glóbulo tendo substancialmente os mesmos glóbulos de vidro como descrito nos exemplos anteriores. O agitador de glóbulo é operado em uma velocidade rotativa de 20.000 RPM por cerca de 3 minutos para lisar a amostra.

[00087] Neste exemplo, a amplificação e detecção de DNA reforçado é realizada no Sistema de PCR em Tempo Real StepOnePlus® da Applied Biosystems com o PremixExTaq (Sonda de qPCR) da TaKaRa (cat. RR390A), de acordo com as instruções do fabricante. 1,5 µl de lisado preparado é adicionado diretamente a uma reação de qPCR consistindo de 1x Premix Ex Taq (contém Ex Taq HS TaKaRa, Mistura de dNTP, Mg²⁺, e Tli RNaseH), 1x corante de referência ROX, 0,50 µM de cada iniciador SpoA específico de *Bacillus subtilis*, 0,20 µM de sonda SpoOA TaqMan® (Ver a tabela 1, Exemplo 1) e 0,2 mg/ml de BSA; em um volume final de 15 µl. Em paralelo, o DNA sem processamento é testado como um controle positivo (na mesma concentração). 1,5 µl de água destilada também é adicionado a uma reação de qPCR como um controle negativo.

[00088] A Tabela 2 fornece os resultados da concentração de DNA recuperado da lise do agitador de glóbulo vs. o controle positivo. As amostras de controle negativo indicaram que nenhum DNA foi presente. Os valores de Ct também são dados para ambos os métodos de lise. A FIG. 14 ilustra um gráfico da recuperação de DNA média usando o agitador de glóbulo comparado com o controle positivo. A recuperação do DNA depois da lise

mecânica com o agitador de glóbulo rotativa fluidicamente integrado é comparável ao Controle Positivo (diferença de cerca de 7,6 %). Nenhuma degradação de DNA foi observada depois do processo de agitador de glóbulo rotativo fluidicamente integrado.

Tabela 2

Tratamento	Valores médios de Ct	Concentração de DNA média de Ct (ng/μl)	% de recuperação
DNA reforçado-Agitador de glóbulo rotativo fluidicamente integrado	30,20	1,04E-03	92,4
Controle positivo de DNA	29,54	1,12E-03	100,0
Controle negativo	UND	UND	NA

EXEMPLO 4: Extração de DNA e RNA de células vegetativas de Bacillus subtilis

[00089] Este experimento de exemplo mostra que o RNA, adequado para a síntese de cDNA e amplificação pela RT-qPCR, pode ser extraído de células bacterianas usando o agitador de glóbulo rotativo fluidicamente integrado. Um volume de 3 ml de cultura de caldo de células vegetativas de *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* (ATCC 6633) na fase mid-log de crescimento ($OD_{550} = 0,60$ a $0,70$) é centrifugado e a pelota é recolocada em suspensão em tampão de Tris-EDTA para se obter uma concentração final de *Bacillus subtilis* de $1,5 \times 10^8$ CFU/ml. Uma diluição de 5×10^4 CFU/ml é preparada em tampão de Tris-EDTA a ser usada como um material de partida no agitador de glóbulo rotativo fluidicamente integrado.

[00090] O agitador de glóbulo é preparado com substancialmente os mesmos glóbulos de vidro como descritos nos exemplos anteriores e carregado com uma diluição de 200 μl de células vegetativas recolocada em suspensão em 200 μl de tampão de Tris-EDTA 1x. O agitador de glóbulo é operado em uma velocidade rotativa de 20.000 RPM por cerca de 3 minutos para lisar a amostra.

[00091] A purificação dos lisados de *Bacillus subtilis* é realizada neste exemplo com dois kits de purificação comerciais diferentes da Norgen (Kit de Purificação de RNA/DNA/Proteína) e Fermentas (Kit de Purificação de

DNA/RNA Virais GeneJET). A amplificação e detecção de RNA e DNA a partir de células vegetativas de *Bacillus subtilis* é realizada no Sistema de PCR em Tempo Real StepOnePlus® da Applied Biosystems com o kit de RT-PCR PrimeScript® One Step (Perfect Real Time) da Takara (cat. RR064A), de acordo com as instruções do fabricante. 2,0 µl de lisado preparado são adicionados diretamente em duas misturas de RT-qPCR, com ou sem a enzima de transcriptase reversa (enzima PrimeScript RT Mix II), para detectar RNA e DNA. As misturas finais consistem de 1x tampão III RT-PCR One Step (inclui Mistura de dNTP, Mg²⁺), 0,1 U/µl de exTaq HS TaKaRa, 1x enzima PrimeScript RT Mistura II (na mistura RT+), 1x corante de referência ROX, 0,38 µM de cada iniciador SpoA específico de *Bacillus subtilis* e 0,15 µM de sonda SpoOA TaqMan® (Ver a tabela 1 do Exemplo 1); em um volume final de 20 µl. Em paralelo, as células vegetativas sem processar são testadas como controles não tratados (nas mesmas concentrações). 2,0 µl de água destilada também é adicionada às reações de RT-qPCR (enzima ±RT) como um controle negativo. A primeira etapa é de 5 min a 42°C para a transcrição reversa (síntese de cDNA). As condições de ciclagem ideais para a sensibilidade e especificidade máximas são de 10 segundos a 95°C para a desnaturação inicial, depois quarenta ciclos de duas etapas sendo de 1 segundo a 95°C e 10 segundos a 60°C. A amplificação foi monitorada durante cada ciclo de alongamento pela medição do nível de fluorescência. As concentrações de DNA e RNA também são calculadas pela interpolação dos valores de Ct nas suas curvas de calibração correspondentes.

[00092] A FIG. 15 mostra uma apresentação gráfica das concentrações médias de recuperação de RNA e DNA (ng/µl) nas condições testadas diferentes: A partir do lisado de NA depois do agitador de glóbulo rotativo fluidicamente integrado, a partir do lisado de NA depois do agitador de glóbulo rotativo fluidicamente integrado e purificação com o kit de purificação da Norgen, a partir do lisado de NA depois do agitador de glóbulo

rotativo fluidicamente integrado e purificação com o kit de purificação da Fermentas e a partir da recolocação em suspensão de *B. subtilis* não tratado. Os resultados são uma média de 15 réplicas em cada concentração. A recuperação de ácido nucléico em termos de concentrações de DNA e RNA aumentou depois da lise mecânica com o agitador de glóbulo rotativo fluidicamente integrado, comparado com a condição não tratada, especialmente com respeito à recuperação de RNA. Depois da purificação de ácido nucléico, a % de recuperação de NA diminuiu (25 a 30 % vs a condição não purificada) devido ao processo de purificação de membrana.

EXEMPLO 5: Comparação da Recuperação de RNA para células vegetativas de Bacillus subtilis

[00093] Neste exemplo, o controle de RNA é extraído das células vegetativas de *B.subtilis* subsp. *spizizenii* (ATCC 6633) usando o Kit de Purificação de RNA/DNA/Proteína da Norgen. Para cada amostra, 9,00 ng de RNA são reforçados em 800 µl de uma solução tamponada que também inclui um agente de quelação (tampão de Tris-EDTA 1x, isento de nucleases da SIGMA).

[00094] Em paralelo, um protocolo de lise é realizado nas células vegetativas de *Bacillus subtilis* preparadas substancialmente da mesma maneira e usando o agitador de glóbulo tendo substancialmente os mesmos glóbulos de vidro como descrito nos exemplos anteriores. O agitador de glóbulo é operado em uma velocidade rotativa de 20.000 RPM por cerca de 3 minutos para lisar a amostra.

[00095] Neste exemplo, a amplificação e detecção de RNA reforçado é realizado no Sistema de PCR em tempo Real StepOnePlus® da Applied Biosystems com o kit de RT-PCR PrimeScript® One Step (Perfect Real Time) da TaKaRa (cat. RR064A), de acordo com as instruções do fabricante. 2,0 µl de lisado preparado são adicionados diretamente a uma reação de RT-qPCR consistindo de 1x tampão III de RT-PCR One Step (inclui Mistura de dNTP,

Mg²⁺), 0,1 U/μl de exTaq HS TaKaRa, 1x a enzima PrimeScript RT Mistura II, 1x o corante de referência ROX, 0,38 μM de cada iniciador SpoA específico de *Bacillus subtilis* e 0,15 μM de sonda SpoOA TaqMan® (Ver a tabela 1 do Exemplo 1); em um volume final de 20 μl. Em paralelo, o RNA sem processamento é testado como um controle positivo (na mesma concentração). 2,0 μl de água destilada também são adicionados a uma reação de RT-qPCR como um controle negativo.

[00096] A Tabela 3 fornece os resultados da concentração de RNA recuperado da lise no agitador de glóbulo vs. o controle positivo. As amostras de controle negativo indicaram que nenhum RNA foi presente. Os valores de Ct (número de ciclos de PCR necessários para produzir um sinal positivo) também são dados para ambos os métodos de lise. A FIG. 16 ilustra um gráfico do RNA recuperado médio usando o agitador de glóbulo comparado com o controle positivo. A recuperação de RNA depois da lise mecânica com o agitador de glóbulo rotativo fluidicamente integrado é comparável ao Controle Positivo (diferença de cerca de 5,3 %). Nenhuma degradação de RNA foi observada depois do processo do agitador de glóbulo rotativo fluidicamente integrado.

Tabela 3

Tratamento	Valores médios de Ct	Concentração de RNA média da qPCR (ng/μl)	% de recuperação
RNA reforçado-Agitador de glóbulo rotativo fluidicamente integrado	30,04	5,24E-03	105,3
Controle positivo de RNA	30,10	4,98E-03	100,0
Controle negativo	UND	UND	NA

EXEMPLO 6: Análise da Integridade do RNA

[00097] Neste exemplo, um bioanalisador Agilent com um Kit LabChip® associado fornece um método particularmente eficaz para avaliar a integridade de RNA total. O Bioanalisador Agilent 2100 é uma plataforma com base microfluídica para classificação por tamanho, quantificação e controle de qualidade de DNA, RNA, proteínas e células. A mesma pode ser usada para observar a qualidade do RNA total pela observação dos picos

ribossômicos 16S e 23S de procariotas e a sua razão. A razão das áreas por detrás dos picos 23S:16S é uma medida da pureza do RNA, e a mesma deve se situar na faixa de 1,5 a 2,0.

[00098] As amostras de RNA (1 µl) do RNA não tratado e lisados de ácido nucléico do agitador de glóbulo rotativo fluidicamente integrado são conduzidos no Bioanalisador Agilent 2100 usando o Kit RNA 6000 Peak da Agilent (cat # 5067-1513) e o Kit RNA 6000 Nano da Agilent (cat # 5067-1511) para a análise de RNA total (eucariótico e procariótico) e amostras de mRNA. A FIG. 16A fornece o perfil de rRNA do Bioanalisador para o controle de RNA não tratado (referência), enquanto que as FIGs. 16B e 16C fornecem os perfis de rRNA do Bioanalisador para duas amostras diferentes lisadas com o agitador de glóbulo rotativo. Como é observado, as razões de rRNA nos dois exemplos de amostras de ácido nucléico processadas no agitador de glóbulo rotativo fluidicamente integrado estão dentro das especificações (1,5-2,0), significando que a integridade do RNA está correta. Os picos 23S e 16S das amostras do agitador de glóbulo são visivelmente menores do que a amostra de controle. Isto é porque os lisados são uma mistura de RNA e DNA e a presença de DNA nas amostras do agitador de glóbulo afeta a resolução do eletroferograma do bioanalisador da Agilent.

[00099] A descrição precedente das formas de realização e exemplos específicos revelarão assim totalmente a natureza geral da invenção que outros podem, pela aplicação do conhecimento dentro da habilidade da técnica, facilmente modificar e/ou adaptar para várias aplicações tais formas de realização específicas, sem experimentação indevida, sem divergir do conceito geral da presente invenção. Portanto, tais adaptações e modificações são intencionadas a estarem dentro do significado e faixa de equivalentes das formas de realização descritas, com base na descrição e orientação aqui apresentadas. Deve ser entendido que a fraseologia ou terminologia aqui é para os propósitos de descrição e não de limitação, tal que a terminologia ou

fraseologia do presente relatório descritivo devam ser interpretadas pelo técnico habilitado considerando as descrições e orientações.

[000100] As formas de realização da presente invenção foram descritas acima com o auxílio dos blocos de construção funcionais ilustrando a implementação de suas funções e relações especificadas das mesmas. As fronteiras destes blocos de construção funcionais foram arbitrariamente aqui definidas por conveniência da descrição. Fronteiras alternativas podem ser definidas de modo que as suas funções e relações especificadas sejam apropriadamente realizadas.

[000101] As seções de Resumo e Abstrato podem apresentar uma ou mais mas não todas as formas de realização exemplares da presente invenção como consideradas pelo(s) inventor(es), e assim, não são intencionadas a limitar a presente invenção e as reivindicações anexas de nenhum modo.

[000102] A amplitude e escopo da presente invenção não devem ser limitadas por nenhuma das formas de realização exemplares descritas acima, mas devem ser definidas apenas de acordo com as reivindicações que seguem e seus equivalentes.

REIVINDICAÇÕES

1. Sistema para homogeneização ou lise de uma amostra, o sistema caracterizado por:

um sistema de cartucho de teste descartável configurado para ser acoplado de forma removível a um analisador e compreendendo:

pelo menos um primeiro reservatório (124B);

pelo menos um segundo reservatório (116);

uma ou mais paredes que formam uma câmara encerrada (502) que tem uma entrada (132) e uma pluralidade de conexões fluídicas (203a-c); em que pelo menos uma das uma ou mais paredes da câmara encerrada compreende uma superfície controlada;

uma primeira rede fluídica acoplada a pelo menos uma da pluralidade de conexões fluídicas (203a-c) e configurada para introduzir, pelo menos, a amostra na câmara encerrada (502) a partir de, pelo menos, um primeiro reservatório (124B);

uma segunda rede fluídica acoplada a pelo menos uma da pluralidade de conexões fluídicas (203a-c) e configurada para expelir a amostra, pelo menos, a partir da câmara encerrada (502) para o pelo menos um segundo reservatório (116);

um elemento rotativo (136) disposto no interior da câmara encerrada (502); e

um atuador acoplado (202) com o elemento rotativo (136) do sistema de cartucho de teste descartável e configurado para rotar o elemento rotativo (136) em torno de um eixo geométrico que se estende ao longo do comprimento do elemento rotativo (136).

2. Sistema de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a uma ou mais paredes formam uma câmara encerrada substancialmente cilíndrica (502).

3. Sistema de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo

fato de que a uma ou mais paredes formam uma câmara encerrada (502) que tem uma seção transversal retangular.

4. Sistema de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a entrada (132) é configurada para introduzir amostras sólidas, semissólidas ou líquidas a partir de um ambiente externo.

5. Sistema de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a entrada (132) fica localizada na parte superior da câmara encerrada (502).

6. Sistema de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a entrada (132) fica localizada sobre um lado da câmara encerrada (502).

7. Sistema de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente uma tampa (134) configurada para se encaixar sobre a entrada (132) e prevenir vazamentos.

8. Sistema de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que pelo menos uma porção de qualquer da primeira rede fluídica ou da segunda rede fluídica está configurada para pressurizar ou despressurizar a câmara encerrada (502).

9. Sistema de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente uma terceira rede fluídica acoplada à câmara encerrada (502) e configurada para pressurizar ou despressurizar a câmara encerrada (502).

10. Sistema de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente uma pluralidade de glóbulos (604) dispostos no interior da câmara encerrada (502).

11. Sistema de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que a pluralidade de glóbulos (604) compreende materiais selecionado do grupo sendo plástico, vidro, cerâmica e sílica.

12. Sistema de acordo com a reivindicação 10, caracterizado

pelo fato de que a pluralidade de glóbulos (604) varia em diâmetro de 1 micron a aproximadamente 3000 microns.

13. Sistema de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que o elemento rotativo (136) é configurado para excitar a pluralidade de grânulos (604).

14. Sistema de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o atuador (202) está ligado de forma removível ao elemento rotativo (136) através de um mecanismo de acoplamento (302).

15. Sistema de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente um suporte (140) disposto substancialmente no mecanismo de acoplamento (302) e configurado para prevenir vazamentos.

16. Sistema de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente uma cavidade (205) disposta em um lado da câmara encerrada (502), de tal modo que uma superfície aquecida colocada contra a cavidade (205) aumenta substancialmente a temperatura no interior da câmara encerrada (502).

17. Método para lise de uma amostra, caracterizado pelo fato de:

introduzir, pelo menos, a amostra em uma câmara encerrada (502) através de uma conexão fluídica (203a-c) acoplada a uma rede fluídica que está adicionalmente acoplada a uma ou mais outras câmaras (116), em que uma ou mais paredes da câmara encerrada (502) compreende uma superfície controlada, em que a câmara encerrada (502), a conexão fluídica (203a-c), a rede fluídica, e a uma ou mais outras câmaras (116) estão dispostas dentro de um sistema de cartucho de teste descartável acoplado de forma removível a um analisador;

rotar um elemento rotativo (136), disposto no interior da câmara encerrada (502), ao longo de um eixo geométrico que se estende ao longo de um comprimento do elemento rotativo (136); e

lise da amostra no interior da câmara encerrada (502) através do movimento do elemento rotativo (136).

18. Método de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente expelir, pelo menos, a amostra da câmara encerrada (502) através de uma outra conexão fluídica (203a-c) acoplado à rede fluídica.

19. Método de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente a pressurização ou despressurização da câmara encerrada (502) através da rede fluídica.

20. Método de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente a afixação de um atuador (202) para o elemento rotativo (136) através de um mecanismo de acoplamento (302).

21. Método de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente introdução de, pelo menos, a amostra para a câmara encerrada (502) através de uma entrada (132) configurada para introduzir as amostras a partir de um ambiente externo.

22. Método de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato de que introduzir, pelo menos, a amostra através da entrada (132) compreende introduzir amostras de sólidos, semissólidos, ou líquidos.

23. Método de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente o aquecimento da amostra através de uma cavidade (205) disposta em um lado da câmara encerrada (502).

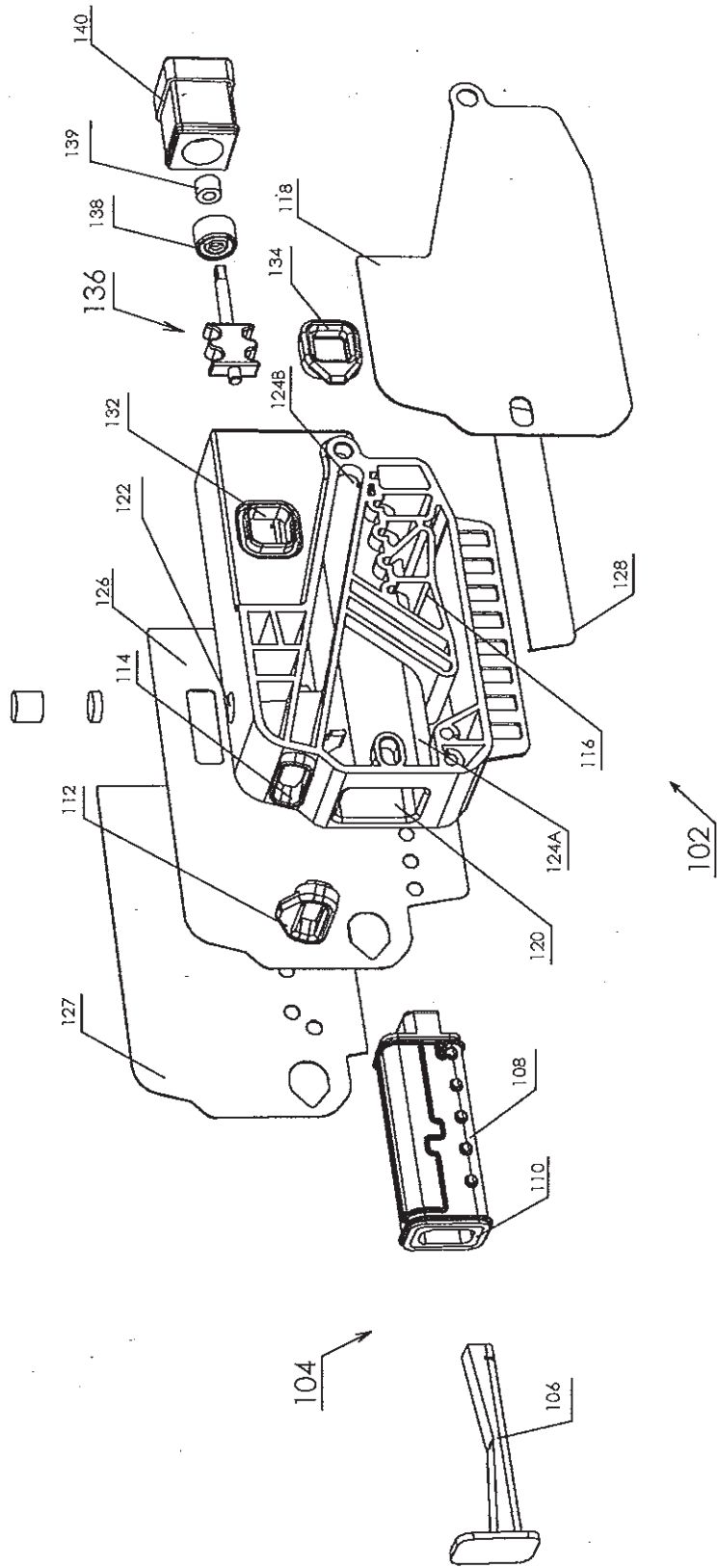


Fig. 1

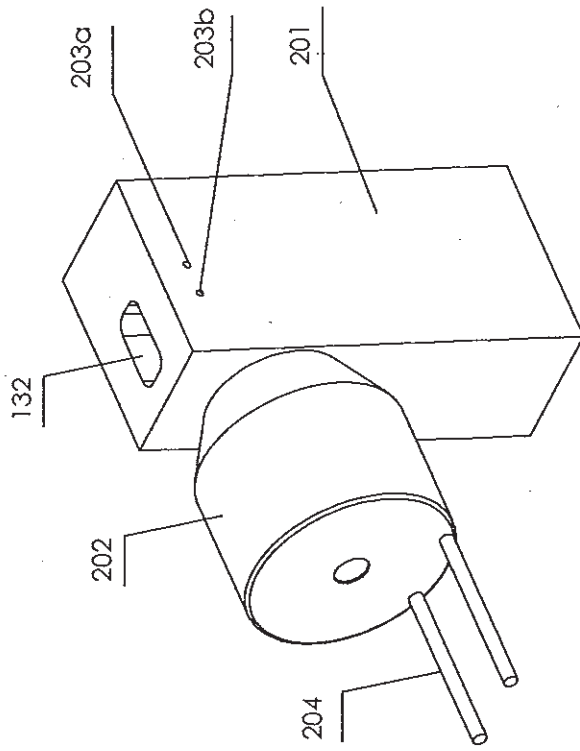


Fig.2B

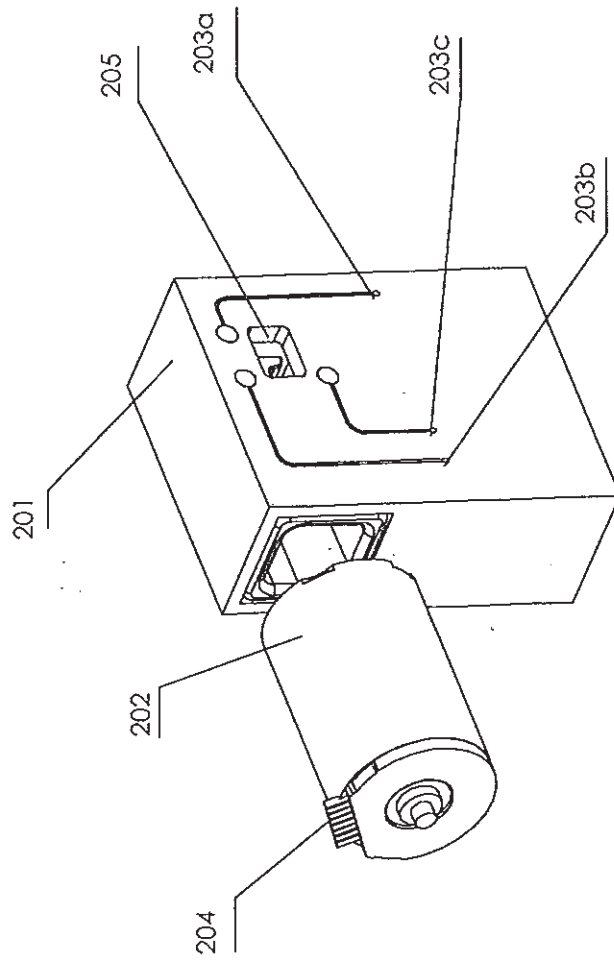


Fig.2A

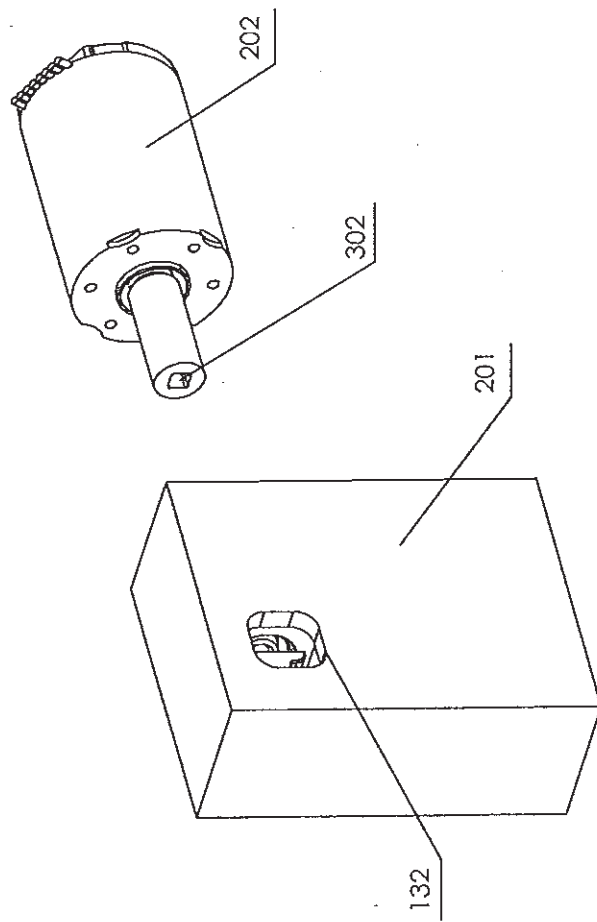


Fig.3A

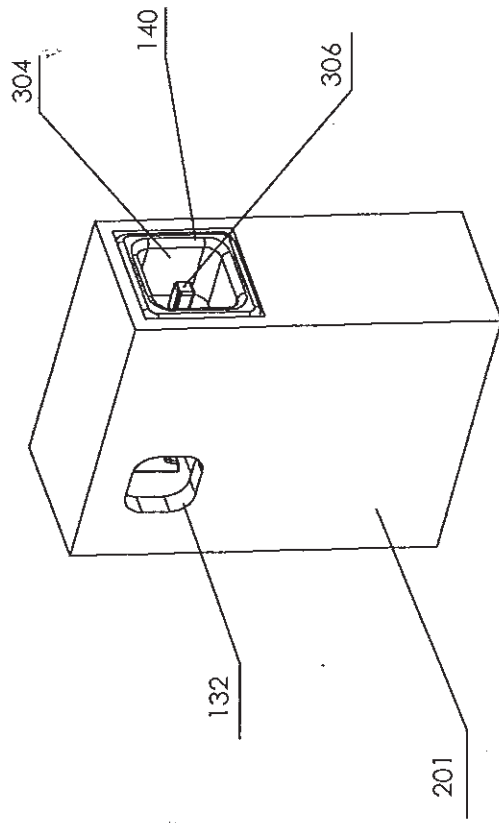


Fig.3B

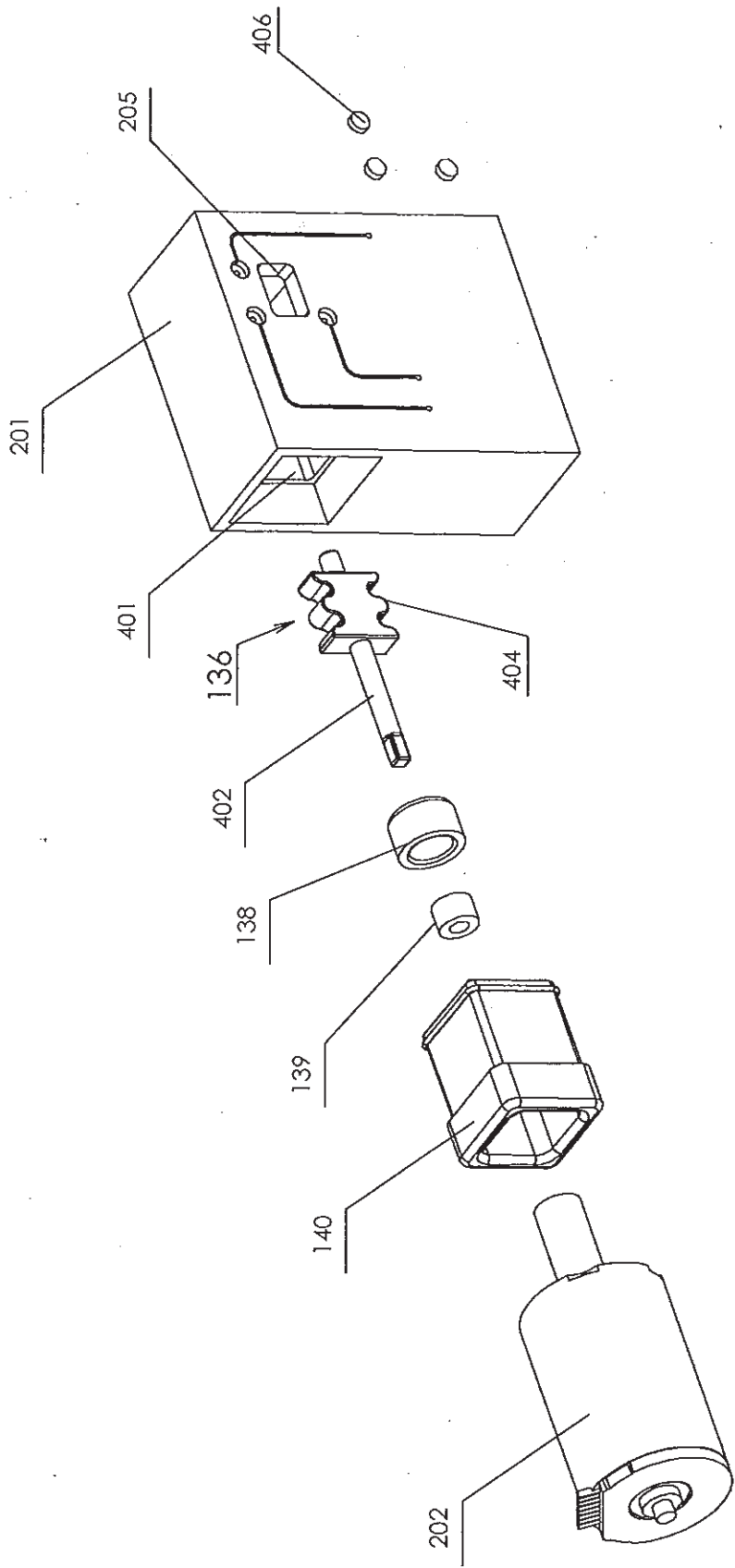


Fig.4

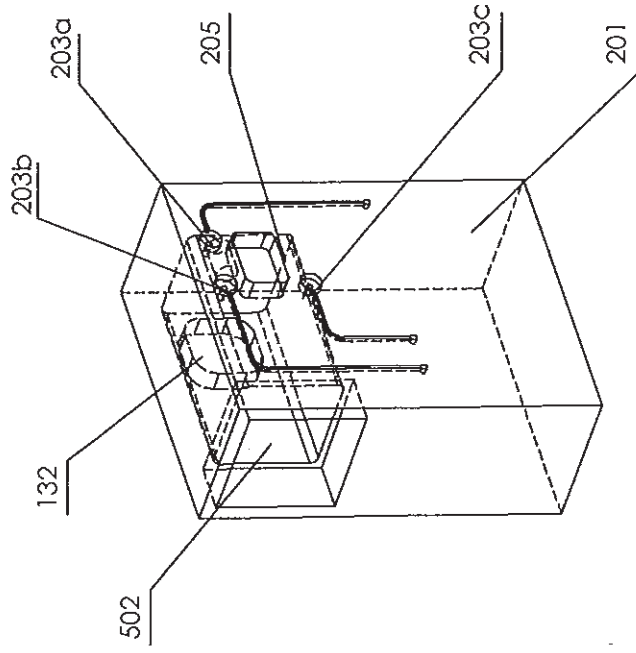


Fig.5

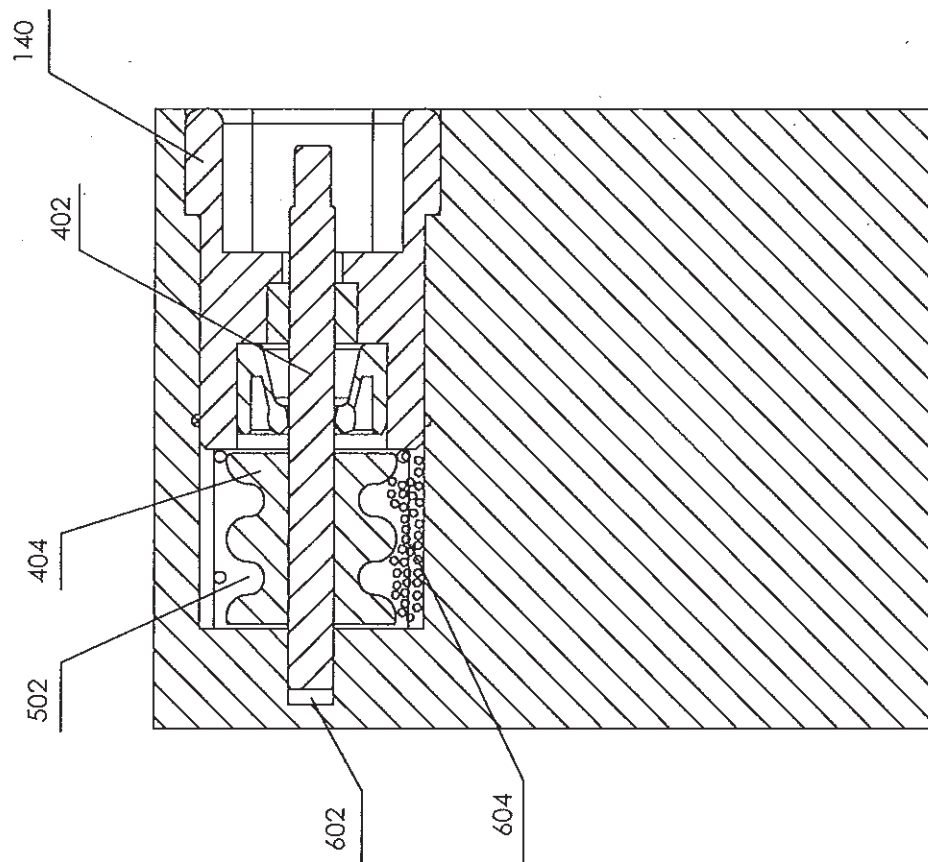


Fig.6B

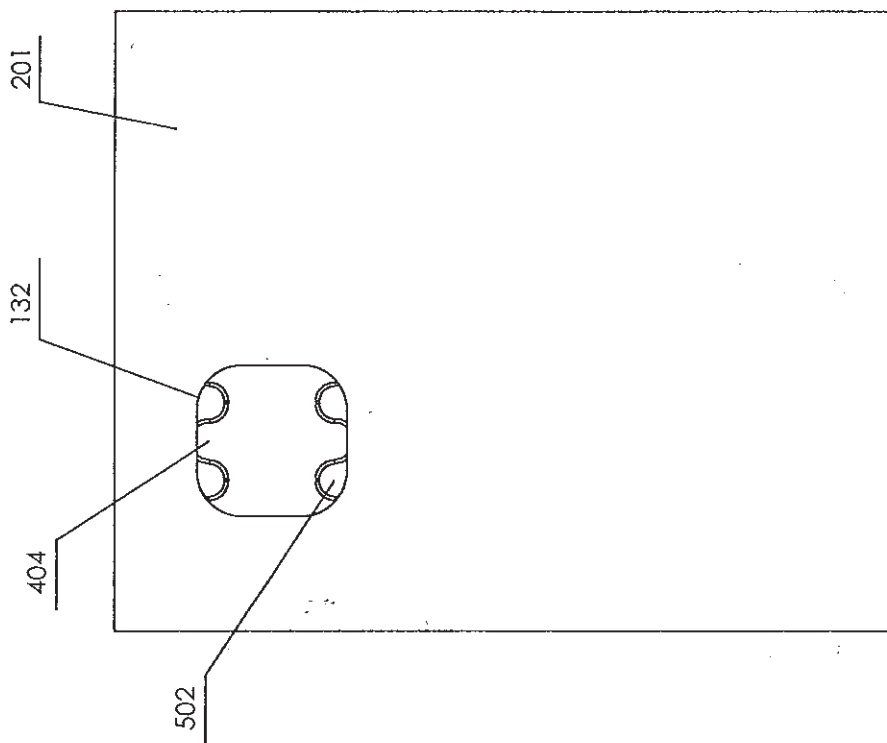


Fig.6A

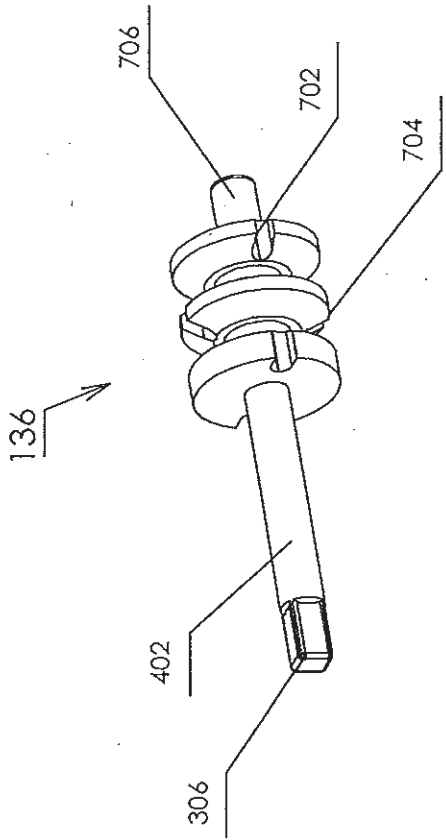


Fig. 7A

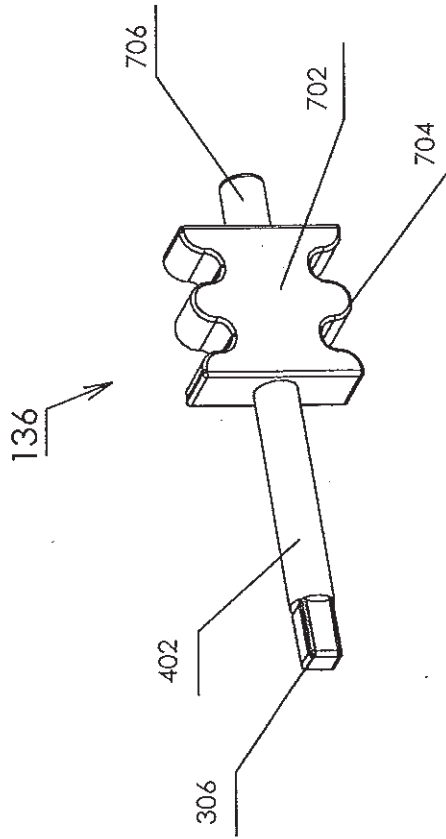


Fig. 7B

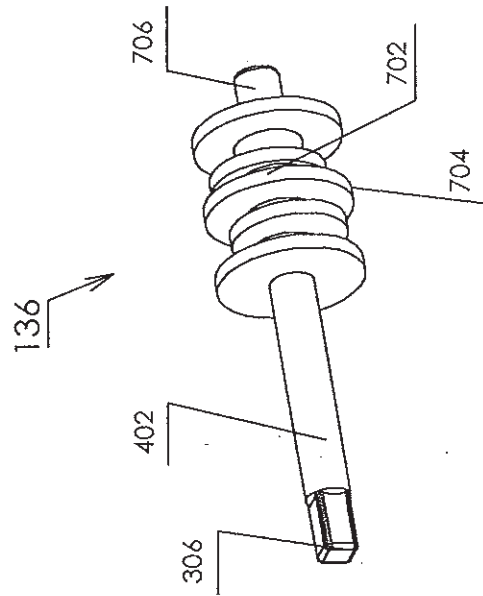


Fig. 7C

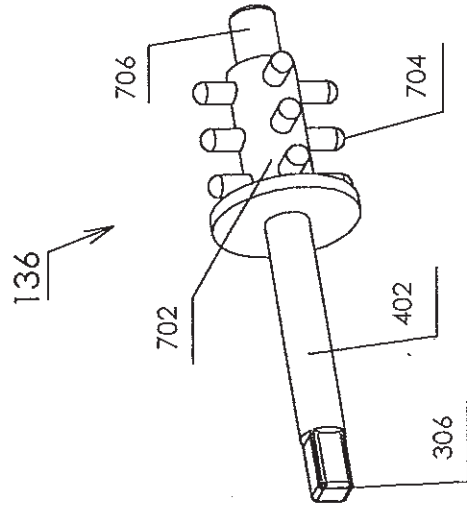


Fig. 7D

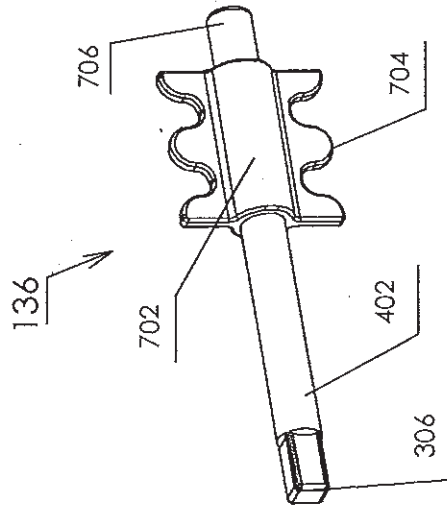


Fig. 7E

800

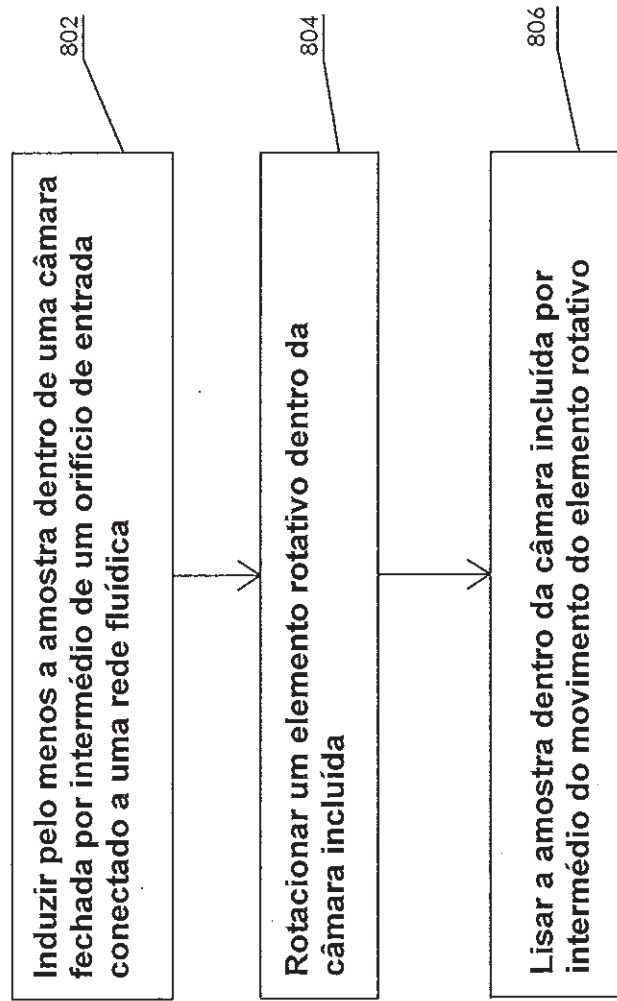


Fig.8

900

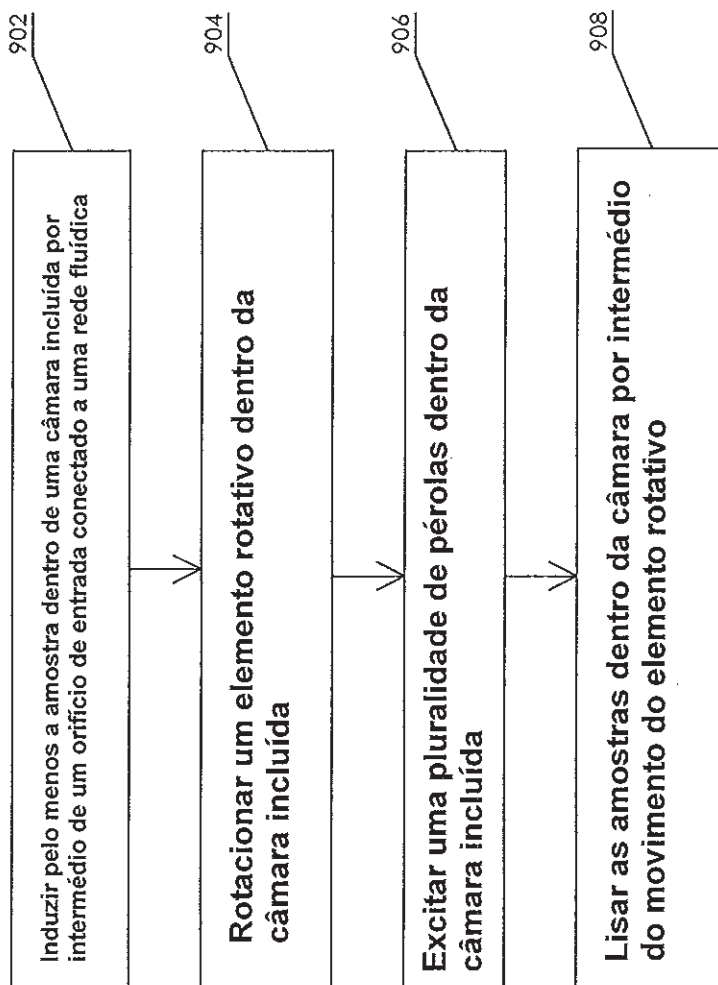


Fig.9

1000

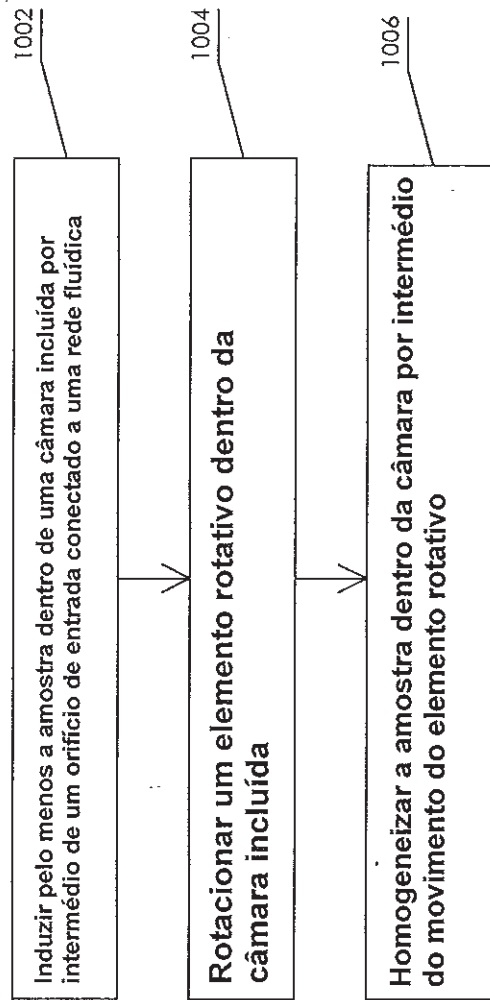


Fig.10

1100

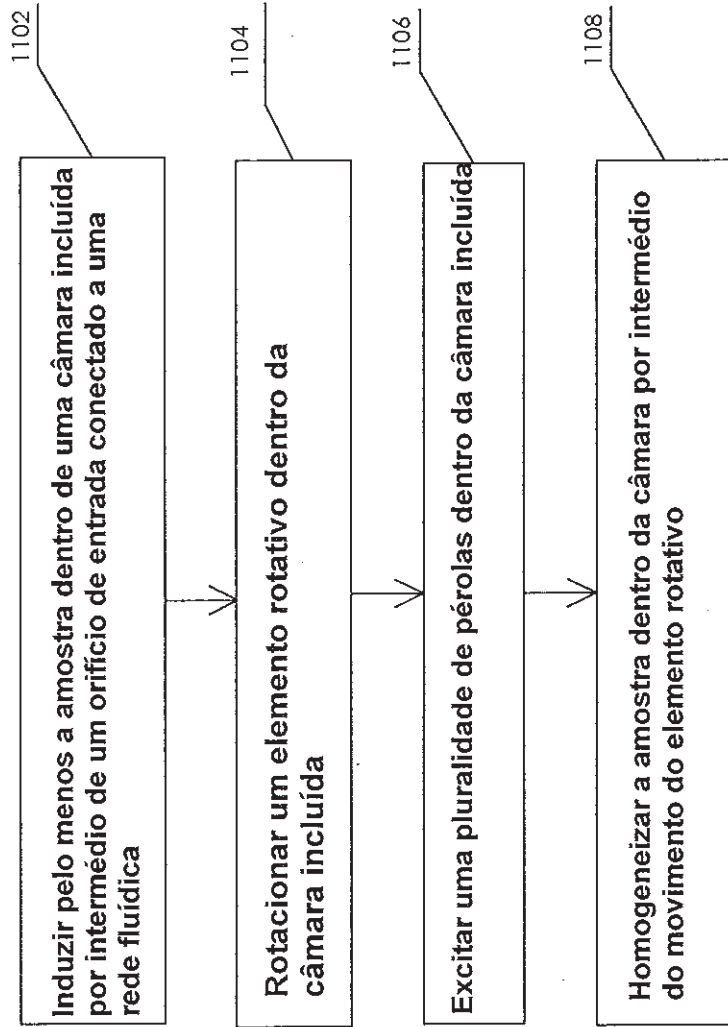


Fig.11

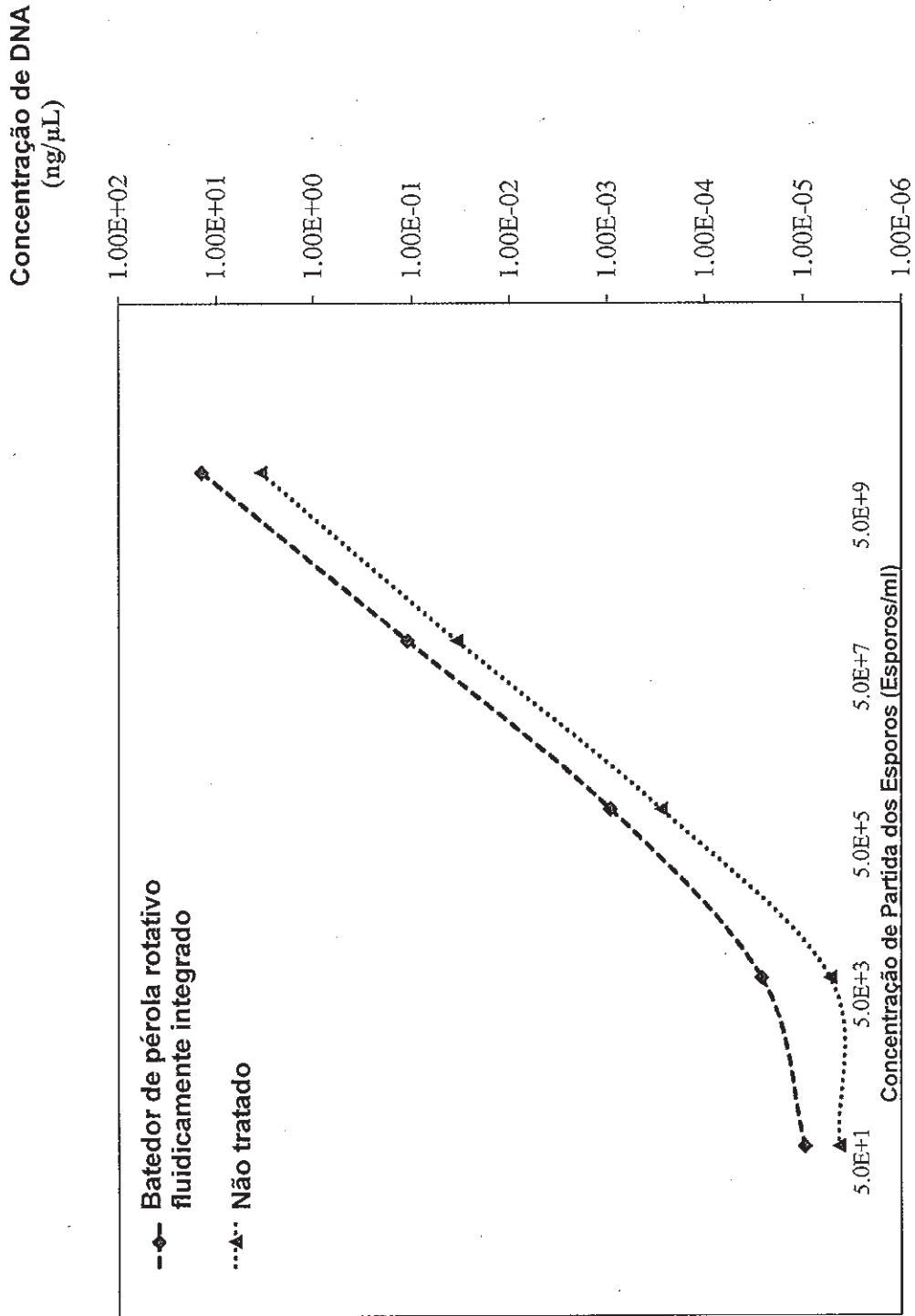


Fig. 12

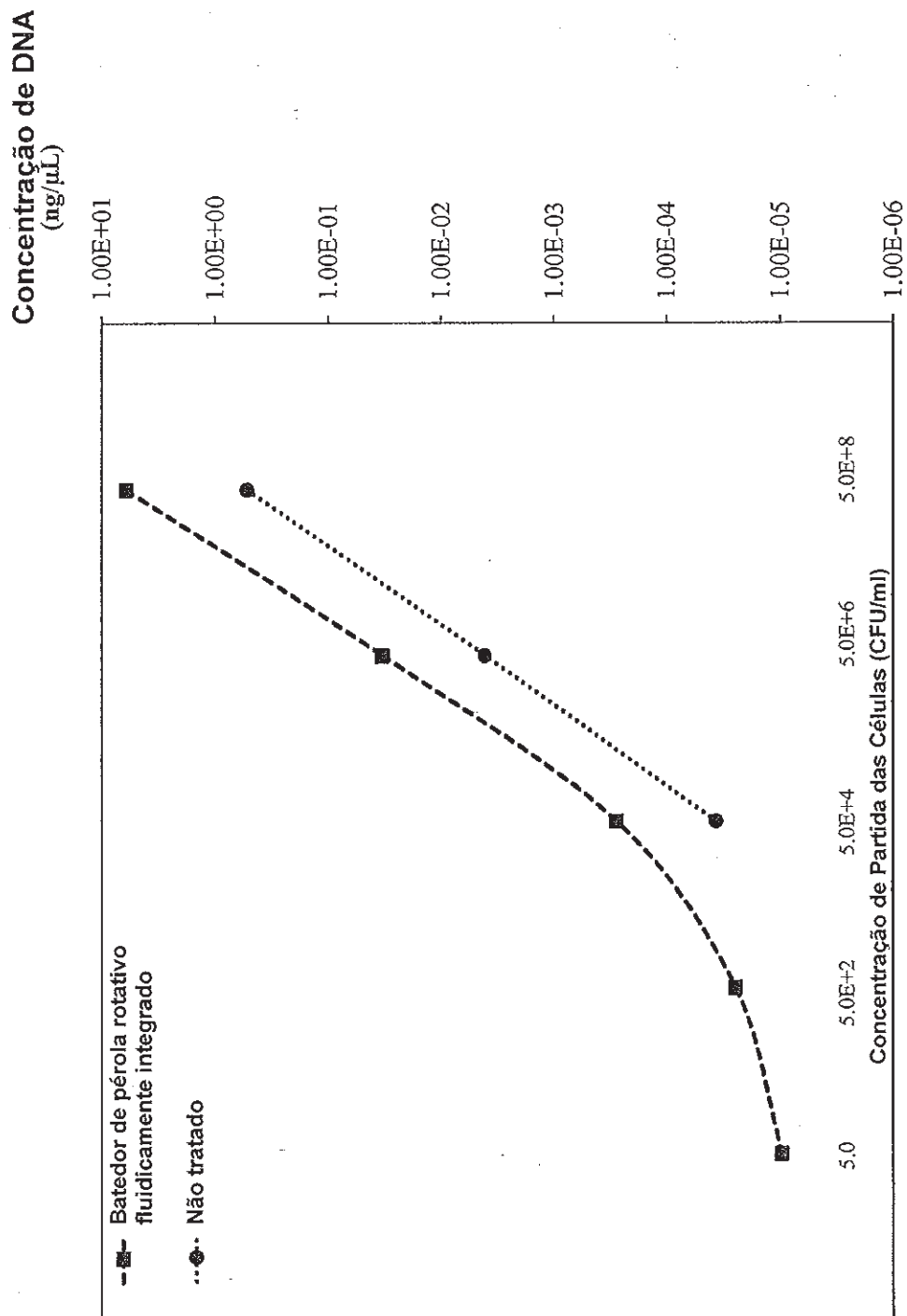


Fig. 13

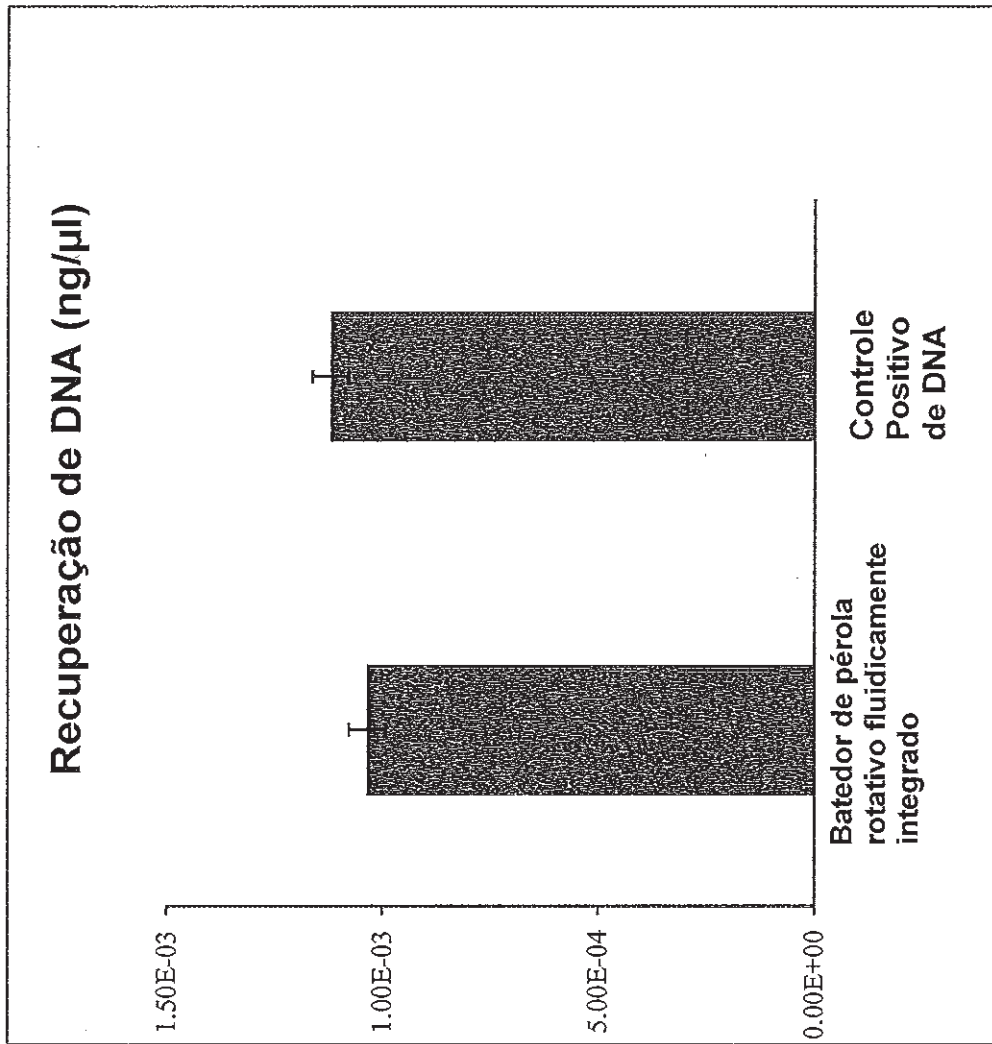


Fig. 14

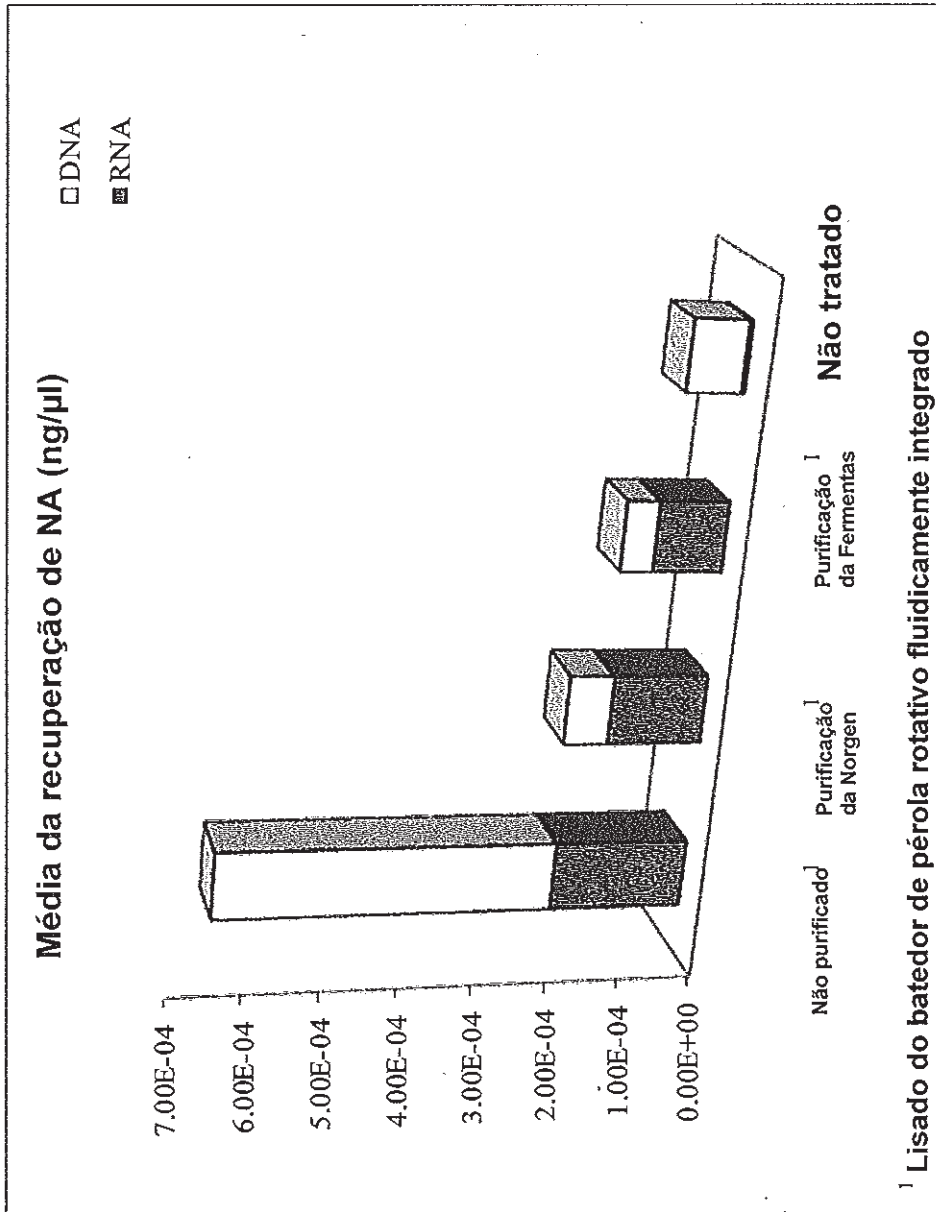


Fig. 15

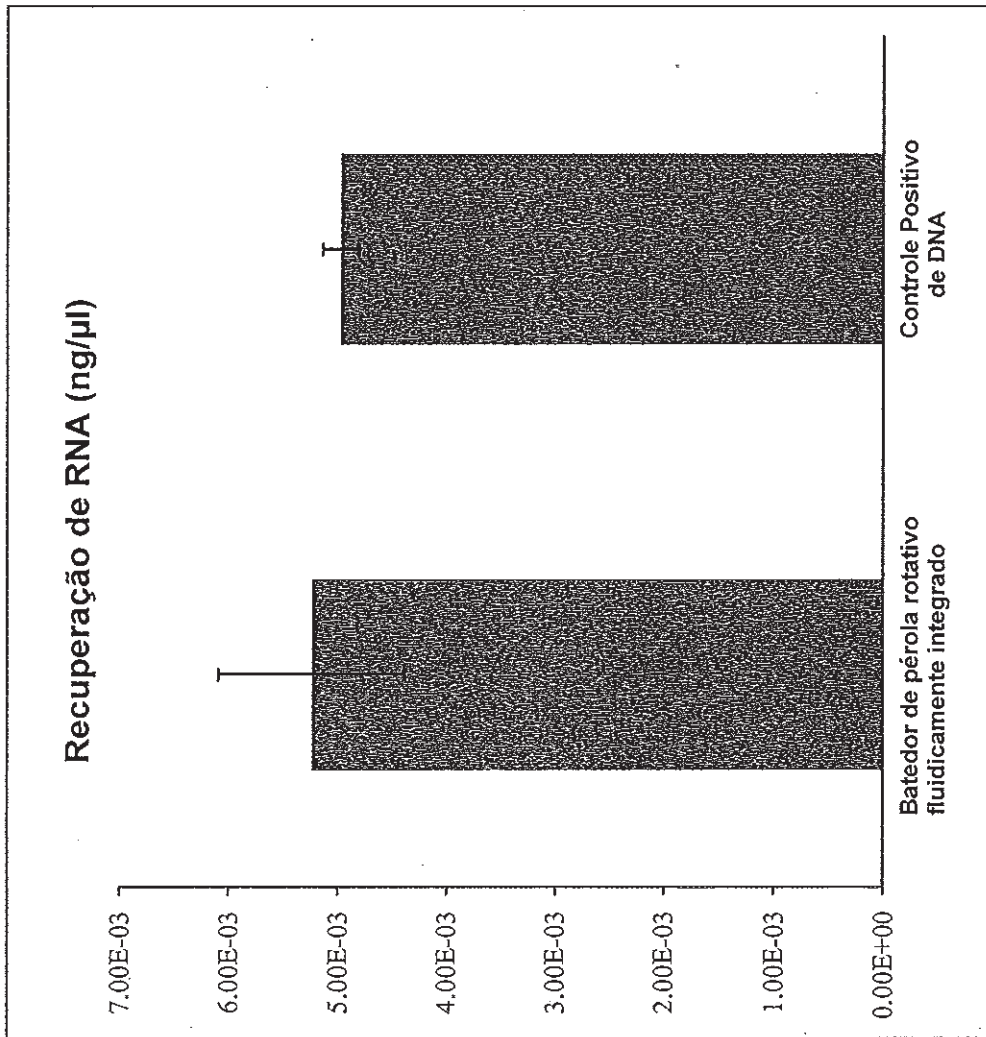
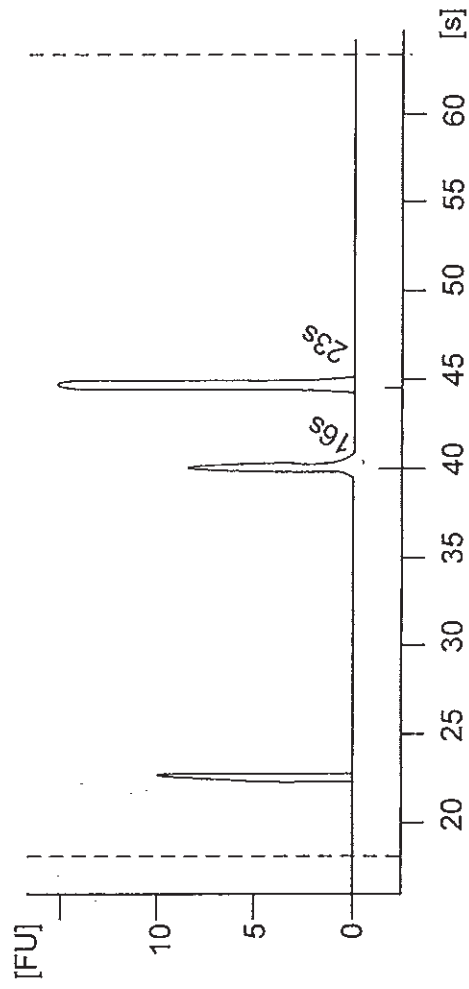


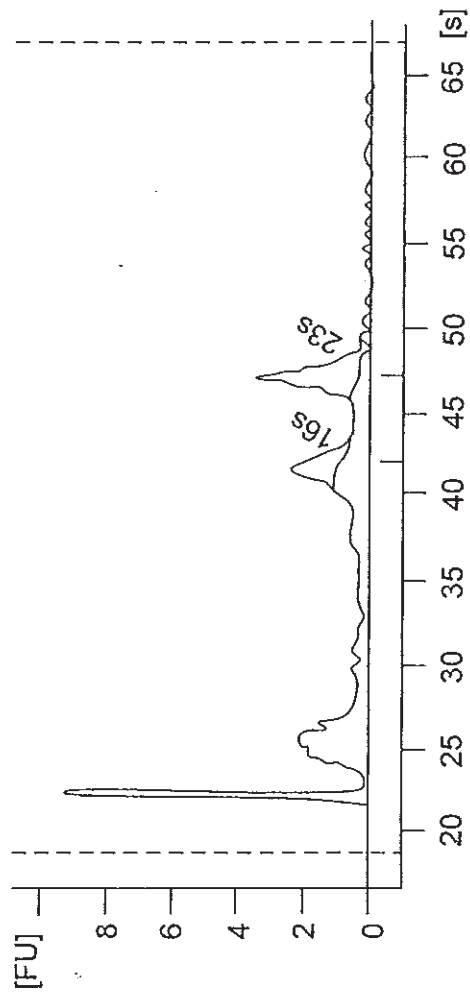
Fig. 16



Resultados Globais para a referência:

Área do RNA:	23,0
Concentração do RNA:	16 pg/ul
Razão do rRNA: [23s / 16s]:	1,7

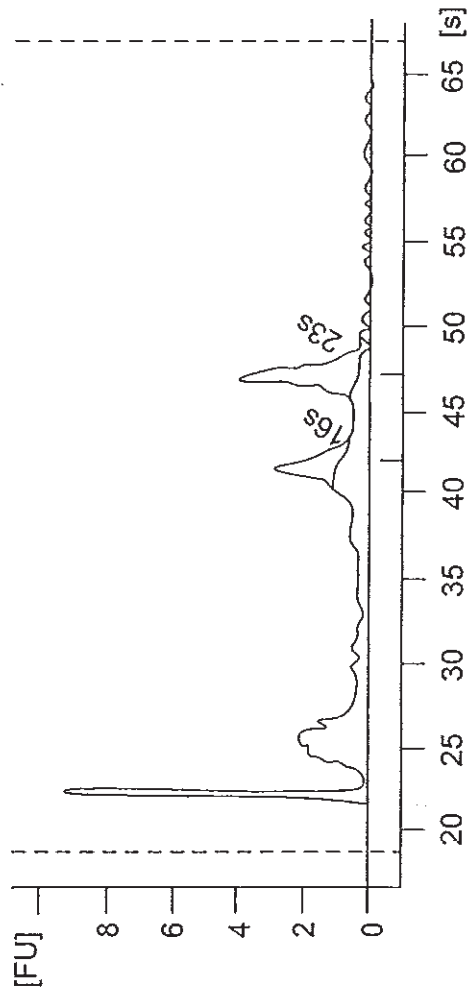
FIG. 17A



Resultados Globais para a amostra 1:

Área do RNA:	59,5
Concentração do RNA:	32 ng/ul
Razão do rRNA: [23s / 16s]:	1,6

FIG. 17B



Resultados Globais para a amostra 2:

Área do RNA:	57,7
Concentração do RNA:	31 ng/ul
Razão do rRNA:	1,5

FIG. 17C