

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 809 168**

51 Int. Cl.:

B01L 3/00 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.11.2007 PCT/US2007/084637**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.11.2008 WO08140568**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.11.2007 E 07874275 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.07.2020 EP 2089543**

54 Título: **Análisis biológico autónomo de alta densidad**

30 Prioridad:

15.11.2006 US 859225 P

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

03.03.2021

73 Titular/es:

**BIOFIRE DIAGNOSTICS, LLC (100.0%)
515 S. Colorow Dr.
Salt Lake City, UT 84108, US**

72 Inventor/es:

**RIRIE, KIRK, M.;
KESSLER, GARY, CLARK;
JONES, DAVID, E. y
PORITZ, MARK, AARON**

74 Agente/Representante:

DURAN-CORRETJER, S.L.P

ES 2 809 168 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

Análisis biológico autónomo de alta densidad

5 INTERÉS GUBERNAMENTAL

La presente invención se realizó con el respaldo del gobierno con las subvenciones Nos. U01 AI061611 y R43 AI063695 otorgadas por los Institutos Nacionales de Salud. El gobierno tiene ciertos derechos en la presente invención.

10 ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

15 En los Estados Unidos, Canadá y Europa occidental, las enfermedades infecciosas representan aproximadamente el 7 % de la mortalidad humana, mientras que en las regiones en vías de desarrollo las enfermedades infecciosas representan más del 40 % de la mortalidad humana. Las enfermedades infecciosas conducen a una variedad de manifestaciones clínicas. Entre las manifestaciones declaradas más habituales se encuentran la fiebre, neumonía, meningitis, diarrea y diarrea sanguinolenta. Aunque las manifestaciones físicas sugieren algunos agentes patógenos y eliminan otros como agente etiológico, quedan una variedad de agentes causales potenciales, y un diagnóstico claro requiere a menudo una variedad de ensayos. Las técnicas de microbiología tradicionales para el diagnóstico de patógenos pueden llevar días o semanas, retrasando a menudo un ciclo de tratamiento adecuado.

20 En los últimos años, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *polymerase chain reaction*) se ha convertido en un procedimiento de elección para el diagnóstico rápido de agentes infecciosos. La PCR puede ser una herramienta rápida, sensible y específica para diagnosticar enfermedades infecciosas. Un reto para la utilización de la PCR como medio primario de diagnóstico es la variedad de posibles organismos causales y los bajos niveles de microorganismo presente en algunas muestras patológicas. A menudo no es práctico realizar grandes paneles de ensayos de PCR, uno para cada posible organismo causal, la mayoría de los cuales se espera que sean negativos. El problema se agrava cuando el ácido nucleico patógeno está a baja concentración y requiere un gran volumen de muestra para reunir moldes de reacción adecuados. En algunos casos, no existe una muestra adecuada para someter a ensayo todos los posibles agentes etiológicos. Una solución es ejecutar "PCR múltiplex" en la que la muestra se somete a ensayo simultáneamente para detectar múltiples dianas en una única reacción. Aunque la PCR múltiplex ha demostrado ser valiosa en algunos sistemas, existen deficiencias con respecto a la robustez de las reacciones múltiplex de alto nivel y las dificultades para un análisis claro de múltiples productos. Para resolver estos problemas, el ensayo se puede dividir posteriormente en múltiples PCR secundarias. Anidar reacciones secundarias dentro del producto primario aumenta la robustez. Sin embargo, este manejo adicional puede ser caro y puede provocar contaminación u otros problemas.

35 De manera similar, la inmuno-PCR ("iPCR") tiene el potencial para la detección sensible de una amplia variedad de antígenos. Sin embargo, debido a que las técnicas de ELISA tradicionales se han aplicado a iPCR, la iPCR experimenta a menudo problemas de contaminación que son complicados al utilizar un procedimiento de detección basado en PCR.

40 La Patente US 2005/250199 A1 describe sistemas fluidicos integrados en miniatura para realizar el análisis y la preparación de ácidos nucleicos dentro de una única unidad integrada.

45 La Patente EP 0 572 057 A1 se refiere a kits de prueba de diagnóstico para la amplificación de ácidos nucleicos mediante procedimientos de PCR y proporciona paquetes de prueba con blísteres llenos de reactivos. La Patente US 6 143 496 A describe, en el contexto de las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos, un conjunto analítico con un sustrato y una cubierta, incluyendo el sustrato una serie de pocillos.

50 La presente invención aborda diversos problemas de contaminación en el análisis biológico.

CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION

55 Por consiguiente, se proporciona un ensayo rápido y sensible que realiza simultáneamente ensayos para múltiples sustancias biológicas, incluidos los microorganismos. El sistema autónomo emplea, de manera ilustrativa, una bolsa de plástico desechable de bajo coste en un formato autónomo, que permite la PCR anidada y otros medios para identificar biomoléculas, de manera ilustrativa, mientras se minimiza la contaminación y se proporciona una amplificación robusta.

60 La invención descrita en el presente documento comprende un recipiente para realizar reacciones de amplificación en un sistema cerrado que comprende una porción flexible que tiene una serie de blísteres en conexión de fluido a través de una serie de canales, y una serie de depósitos, conteniendo cada depósito un componente de reacción, y estando cada depósito en conexión de fluido como mínimo, con una de la serie de blísteres, y un puerto sellable (12) configurado para recibir una muestra, estando el puerto sellable en conexión de fluido con una de la serie de blísteres, en el que el recipiente comprende:
 65 una zona (580) de reacción de alta densidad que comprende:

un canal (565),
 una red (581) de alta densidad, que comprende como mínimo 50 pocillos (582) de reacción de alta densidad en
 5 conexión de fluido con el canal (565), en el que cada pocillo (582) de reacción de alta densidad comprende uno o
 varios reactivos,

una capa (587) sellada a un lado de la red de alta densidad y,
 una capa (585) de barrera sellada al lado opuesto de la red, que minimiza la contaminación cruzada entre pocillos
 10 (582) de reacción de alta densidad

tras la introducción de la muestra en la zona (580) de reacción de alta densidad, en la que la capa de barrera es una
 capa perforada (585), en la que las perforaciones (586) se alinean con los pocillos (582) de reacción de alta
 densidad, minimizando el flujo a través de las perforaciones (586) en ausencia de una fuerza de vacío para forzar el
 15 fluido dentro o fuera de los pocillos (582) de reacción de alta densidad.

En otra realización, se describe un procedimiento de amplificación de ácidos nucleicos en el recipiente de la
 presente invención, que comprende las etapas de:

inyectar la muestra en la zona (580) de reacción de alta densidad a través del canal (565),
 20 Introducir una porción de la muestra en cada uno de los pocillos (582) de reacción de alta densidad,
 sellar las porciones de la muestra en los pocillos (582) de reacción de alta densidad, y
 someter a ciclado térmico de la zona (580) de reacción de alta densidad, en el que
 se proporciona vacío en cada pocillo (582) de reacción, y
 25 las porciones de la muestra se introducen en cada uno de los pocillos (582) de reacción de alta densidad a través de
 las perforaciones.

Por tanto, en un ejemplo, se proporciona un recipiente para realizar la amplificación en dos etapas en una muestra
 en un sistema cerrado, comprendiendo el recipiente una zona de reacción de primera etapa que comprende un
 30 blíster de reacción de primera etapa configurada para la amplificación de primera etapa de la muestra, un depósito
 adicional en conexión de fluido con el blíster de reacción de primera etapa, estando el depósito adicional configurado
 para proporcionar fluidos adicionales a la muestra, y una zona de reacción de segunda etapa en conexión de fluido
 con la zona de reacción de primera etapa, comprendiendo la zona de reacción de segunda etapa una serie de
 cámaras de reacción de segunda etapa, comprendiendo cada cámara de reacción de segunda etapa un par de
 35 cebadores configurados para una amplificación adicional de la muestra. En un ejemplo ilustrativo, la zona de
 reacción de primera etapa es una zona de amplificación por PCR de primera etapa. En otro ejemplo ilustrativo, la
 zona de reacción de primera etapa es una zona de unión a antígeno para inmuno-PCR, en la que los antígenos
 presentes en la muestra se reconocen y asocian con un segmento de ácido nucleico en particular y la zona de
 reacción de segunda etapa es una zona de amplificación de ácidos nucleicos. Aun en otro ejemplo ilustrativo, el
 40 recipiente comprende, además, una zona de lisis celular que comprende partículas para lisar células o esporas
 ubicadas en la muestra, y una zona de preparación de ácidos nucleicos que comprende componentes para purificar
 ácidos nucleicos. Los blísteres comprenden un material flexible, de tal manera que la presión proporcionada sobre
 un blíster individual colapse el blíster, forzando el contenido del blíster.

En otro aspecto de la presente invención, se proporciona un recipiente que comprende una porción flexible que tiene
 45 una serie de blísteres en conexión de fluido a través de una serie de canales, y una serie de depósitos, conteniendo
 cada depósito un componente de reacción, y estando cada depósito en conexión de fluido como mínimo, con una de
 la serie de blísteres, y un puerto sellable configurado para recibir la muestra, el puerto sellable en conexión de fluido
 con una de la serie de blísteres. En una realización ilustrativa, los componentes de reacción están en forma seca, y
 el recipiente comprende, además, un segundo puerto sellable en conexión de fluido con cada uno de la serie de
 50 depósitos, estando el puerto configurado para recibir agua para rehidratar los componentes de reacción.

En un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un procedimiento para lisar células en una
 muestra, comprendiendo el procedimiento proporcionar un recipiente flexible que comprende un blíster de lisis
 55 celular, introducir células en el blíster de lisis celular y aplicar fuerza al blíster para desplazar las partículas y muestra
 para generar impactos de alta velocidad que dan como resultado un lisado.

Aun en otro aspecto de la presente invención, se proporciona un dispositivo para analizar una muestra para
 determinar la presencia de ácidos nucleicos, estando el dispositivo configurado para recibir en el mismo un
 60 recipiente de la presente invención, una serie de accionadores situados de manera correspondiente a diversos
 blísteres del recipiente, estando cada accionador configurado para aplicar presión al blíster correspondiente del
 recipiente, un primer dispositivo calentador/enfriador configurado para someter a ciclado térmico el contenido de uno
 de los blísteres, y un segundo dispositivo calentador/enfriador para someter a ciclado térmico la cámara de segunda
 etapa.

Todavía en otro aspecto de la presente invención, se proporcionan procedimientos. En un procedimiento, se
 65 amplifican ácidos nucleicos. En otro procedimiento ilustrativo, se detectan antígenos utilizando inmuno-PCR.

En un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona una zona de reacción de alta densidad, que comprende un canal, una serie de pocillos de reacción de alta densidad en conexión de fluido con el canal, comprendiendo cada pocillo de reacción de alta densidad uno o varios reactivos, y una capa de barrera que minimiza contaminación cruzada entre pocillos de reacción de alta densidad tras la introducción de la muestra en la zona de reacción de alta densidad. La capa de barrera es una capa física, una capa perforada que minimiza el flujo a través de las perforaciones en ausencia de una fuerza para desplazar la muestra a través de las perforaciones. En otro ejemplo, la barrera puede ser una barrera química que mantiene los reactivos en los pocillos hasta que los pocillos puedan sellarse.

Resultarán evidentes características adicionales de la presente invención para los expertos en la materia al considerar la siguiente descripción detallada de realizaciones preferentes que ejemplifican el mejor modo de llevar a cabo la presente invención, tal como se percibe actualmente.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LOS DIBUJOS

La figura 1 muestra una bolsa flexible, según una realización de esta presente invención.

La figura 2 muestra una realización de la zona de lisis celular de la bolsa flexible, según la figura 1.

La figura 2a muestra una realización de una porción de una vejiga correspondiente a la zona de lisis celular, mostrada en la figura 2.

La figura 2b muestra una realización de la zona de lisis celular de la bolsa flexible, según la figura 1, que tiene un mecanismo de agitación en vórtex alternativo.

La figura 3 muestra una realización de la zona de preparación de ácidos nucleicos de la bolsa flexible, según la figura 1.

La figura 4 muestra una realización de la zona de amplificación de primera etapa de la bolsa flexible según la figura 1.

La figura 5 es similar a la figura 1, excepto en que muestra una realización alternativa de una bolsa.

La figura 5a es una vista en sección transversal del accesorio de la bolsa de la figura 5.

La figura 5b es una ampliación de una porción de la bolsa de la figura 5.

La figura 6 es una vista en perspectiva de otra realización alternativa de una bolsa.

La figura 6a es una vista en sección transversal del accesorio de la bolsa de la figura 6.

La figura 7 muestra componentes de vejiga ilustrativos para su utilización con la bolsa de la figura 6.

La figura 8 es una vista en perspectiva en despiece ordenado de un instrumento para su utilización con la bolsa de la figura 6, que incluye la bolsa de la figura 6.

La figura 9 muestra una vista en sección transversal parcial del instrumento de la figura 8, que incluye los componentes de vejiga de la figura 7, mostrándose la bolsa de la figura 6 en la sombra.

La figura 10 muestra una vista en sección transversal parcial del instrumento de la figura 8, que incluye diversas vejigas para válvulas de pinza y la bolsa de la figura 6.

La figura 11 muestra esquemas para ELISA e inmuno-PCR, anticuerpo (secundario (A); anticuerpo de captura (C); enzima (E); anticuerpo indicador (R); resto de unión bifuncional (S) y antígeno (T).

La figura 12 es similar a la figura 6, excepto en que muestra una bolsa configurada para inmuno-PCR.

La figura 13 es similar a la figura 6, excepto en que muestra una bolsa configurada tanto para PCR como para inmuno-PCR.

La figura 14 muestra las curvas de amplificación de la amplificación de segunda etapa de una muestra que se lisó y amplificó en una bolsa de la figura 5 (- - - control positivo; - - - diana 1 de *S. cerevisiae*; - diana 2 de *S. cerevisiae*; - diana 3 de *S. cerevisiae*; - - - - - diana 1 de *S. pombe*; - - - - diana 2 de *S. pombe*; - - - - controles negativos).

La figura 15 es similar a la figura 6, excepto en que muestra una bolsa que tiene una red de alta densidad de segunda etapa.

La figura 15a muestra una modificación de un componente del instrumento de la figura 8. Un elemento de soporte se ha dotado de un motor configurado para su utilización con la bolsa de la figura 15.

La figura 16 es una vista en perspectiva en despiece ordenado de la red de alta densidad de segunda etapa de la figura 15.

La figura 17 es una vista desde abajo de la red de alta densidad de segunda etapa de la figura 15, mostrada durante la construcción de la red de alta densidad de segunda etapa.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Las bolsas de análisis de ácidos nucleicos autónomas descritas en el presente documento se pueden utilizar para analizar una muestra de la presencia de diversas sustancias biológicas, de manera ilustrativa antígenos y secuencias de ácido nucleico, en un único sistema cerrado. La bolsa se puede utilizar para analizar múltiples patógenos. De manera ilustrativa, se pueden realizar diversas etapas en la bolsa desechable opcionalmente, incluidas la preparación de ácidos nucleicos, PCR múltiplex de gran volumen primaria, dilución del producto de amplificación primaria y PCR secundaria, que culmina con la detección en tiempo real y/o el análisis posterior a la amplificación, tal como análisis de curvas de fusión. Sin embargo, se entiende que la detección de patógenos es una utilización a modo de ejemplo y las bolsas se pueden utilizar para otro análisis de ácidos nucleicos o detección de otras sustancias, incluyendo, pero sin limitación a las mismas, péptidos, toxinas y moléculas pequeñas. Además, se entiende que aunque las diversas etapas se pueden realizar en bolsas de la presente invención, una o varias de las

etapas se pueden omitir para determinadas utilizaciones, y la configuración de la bolsa se puede alterar en consecuencia.

Aunque la PCR es el procedimiento de amplificación utilizado en los ejemplos del presente documento, se entiende que cualquier procedimiento de amplificación que utilice un cebador puede ser adecuado. Tales procedimientos adecuados incluyen la reacción en cadena de la polimerasa (PCR); amplificación por desplazamiento de hebra (SDA, *strand displacement amplification*); amplificación basada en secuencia de ácido nucleico (NASBA, *nucleic acid sequence based amplification*); amplificación mediante círculo rodante en cascada (CRCA, *cascade rolling circle amplification*), amplificación isotérmica de ADN mediada por bucle (LAMP, *loop-mediated isothermal amplification of DNA*); amplificación isotérmica e iniciada por cebadores quiméricos (ICAN, *isothermal and chimeric primer-initiated amplification*) de ácidos nucleicos; amplificación dependiente de helicasa (HDA, *helicase dependant amplification*) basada en diana; amplificación mediada por transcripción (TMA, *transcription-mediated amplification*) y similares. Por tanto, cuando se utiliza el término PCR, se debe entender que incluye otros procedimientos de amplificación alternativos. Se entiende que puede ser necesario ajustar los protocolos en consecuencia.

La figura 1 muestra una bolsa 10 de análisis de ácidos nucleicos autónoma ilustrativa. La bolsa 10 tiene una zona 20 de lisis celular, una zona 40 de preparación de ácidos nucleicos, una zona 60 de amplificación de primera etapa y una zona 80 de amplificación de segunda etapa. Una muestra que contiene el ácido nucleico se introduce en la bolsa 10 a través del puerto 12 de inyección de muestra. La bolsa 10 comprende una variedad de canales y blísteres de diversos tamaños y se dispone de manera que la muestra fluya a través del sistema. La muestra pasa a través de las diversas zonas y se procesa en consecuencia.

El procesamiento de la muestra se produce en diversos blísteres ubicados dentro de la bolsa 10. Se proporcionan diversos canales para desplazar la muestra dentro y entre las zonas de procesamiento, mientras que se proporcionan otros canales para suministrar fluidos y reactivos a la muestra o para retirar tales fluidos y reactivos de la muestra. El líquido dentro de la bolsa 10 se desplaza de manera ilustrativa entre blísteres por presión, de manera ilustrativa presión neumática, tal como se describe a continuación, aunque se contemplan otros procedimientos para desplazar material dentro de la bolsa.

Aunque se pueden utilizar otros recipientes, de manera ilustrativa, la bolsa 10 está formada por dos capas de una película de plástico flexible u otro material flexible, tal como poliéster, poli(tereftalato de etileno) (PET), policarbonato, polipropileno, poli(metacrilato de metilo), y mezclas de los mismos que pueden producirse mediante cualquier proceso conocido en la técnica, incluyendo extrusión, deposición por plasma y laminación. También se pueden utilizar láminas metálicas o plásticos con laminación de aluminio. Se conocen otros materiales de barrera en la técnica que se pueden sellar conjuntamente para formar los blísteres y los canales. Si se utiliza película de plástico, las capas se pueden unir, de manera ilustrativa, mediante termosellado. De manera ilustrativa, el material tiene baja capacidad de unión a ácidos nucleicos.

Cuando se emplea monitorización con fluorescencia, son preferentes las películas de plástico que tengan, de manera adecuada, baja absorbancia y autofluorescencia a las longitudes de onda operativas. Tal material se podría identificar probando diferentes plásticos, diferentes plastificantes y proporciones de materiales compuestos, así como diferentes grosores de la película. Para los plásticos con laminación de aluminio u otra lámina metálica, la porción de la bolsa que debe ser leída por un dispositivo de detección de fluorescencia se puede dejar sin la lámina metálica. Por ejemplo, si se monitoriza la fluorescencia en los blísteres 82 de la zona 80 de amplificación de segunda etapa de la bolsa 10, entonces una o ambas capas en los blísteres 82 se dejarían sin la lámina metálica. En el ejemplo de PCR, los materiales laminados de película compuestos por poliéster (Mylar, Dupont, Wilmington DE) de aproximadamente 0,0048 pulgadas (0,1219 mm) de grosor y las películas de polipropileno de 0,001-0,003 pulgadas (0,025-0,076 mm) de grosor funcionan bien. De manera ilustrativa, la bolsa 10 está compuesta por un material transparente capaz de transmitir aproximadamente el 80 % - 90 % de la luz incidente.

En un ejemplo, los materiales se pueden desplazar entre blísteres mediante la aplicación de presión, de manera ilustrativa, presión neumática, sobre los blísteres y los canales. Por consiguiente, en los ejemplos que emplean presión neumática, el material de la bolsa es, de manera ilustrativa, flexible suficientemente como para permitir que la presión neumática tenga el efecto deseado. El término "flexible" se utiliza en el presente documento para describir una característica física del material de la bolsa. El término "flexible" se define en el presente documento como deformable fácilmente por los niveles de presión neumática utilizados en el presente documento sin agrietarse, romperse, fisurarse, o similar. Por ejemplo, las láminas de plástico delgadas, tales como la envoltura Saran[®] y las bolsas Ziploc[®], así como la lámina metálica delgada, tal como la lámina de aluminio, son flexibles. Sin embargo, sólo es necesario que sean flexibles determinadas regiones de los blísteres y los canales, incluso en ejemplos que emplean presión neumática. Además, sólo es necesario que un lado de los blísteres y los canales sea flexible, siempre que los blísteres y los canales sean deformables fácilmente. Otras regiones de la bolsa 10 pueden estar compuestas por un material rígido o pueden estar reforzadas con un material rígido.

De manera ilustrativa, se utiliza una película de plástico para la bolsa 10. Una lámina de metal, de manera ilustrativa, de aluminio u otro material adecuado, se puede fresar o cortar de otro modo, para crear un troquel que tenga un patrón de superficies elevadas. Cuando se instala en una prensa neumática (de manera ilustrativa, A-5302-PDS,

Janesville Tool Inc., Milton WI), regulada, de manera ilustrativa, a una temperatura de funcionamiento de 195 °C, la prensa neumática funciona como una prensa de impresión, fundiendo las superficies de sellado de la película de plástico sólo donde el troquel entra en contacto con la película. Diversos componentes, tales como cebadores de PCR (aplicados, de manera ilustrativa, sobre la película y secados), sustratos de unión a antígeno, perlas magnéticas y perlas de silicato de zirconio se pueden sellar en el interior de diversos blísteres a medida que se forma la bolsa 10. Los reactivos para el procesamiento de muestras se pueden aplicar sobre la película antes del sellado, ya sea colectivamente o por separado. En un ejemplo, se aplican nucleótidos trifosfato (NTP) sobre la película por separado de la polimerasa y los cebadores, eliminando esencialmente la actividad de la polimerasa hasta que la reacción sea hidratada por una muestra acuosa. Si la muestra acuosa se ha calentado antes de la hidratación, esto crea las condiciones para una verdadera PCR de arranque en caliente y reduce o elimina la necesidad de componentes químicos caros de arranque en caliente. Esta aplicación por separado se comenta más adelante, con respecto a la figura 5b, pero se entiende que tal aplicación se puede utilizar con cualquiera de los ejemplos comentados en el presente documento.

15 Cuando se utiliza presión neumática para desplazar materiales dentro de la bolsa 10, se puede emplear una “vejiga” (“bladder”). El conjunto 710 de vejigas, una porción del cual se muestra en la figura 2a, se puede fabricar en un proceso similar al de la producción de la bolsa, pero los blísteres individuales en el conjunto 710 de vejigas incluyen conectores neumáticos (de manera ilustrativa, el conector 724a) que permiten que se presuricen las vejigas individuales dentro del conjunto 710 de vejigas mediante una fuente de gas comprimido. Debido a que el conjunto de vejigas se somete a gas comprimido y se puede utilizar varias veces, el conjunto de vejigas puede estar compuesto por un material más tenaz o más grueso que la bolsa. Alternativamente, las vejigas se pueden formar a partir de una serie de placas sujetas entre sí con juntas de estanqueidad, sellos, válvulas y pistones. Otras disposiciones están dentro del alcance de la presente invención.

25 Cuando la bolsa 10 se coloca dentro del instrumento, el conjunto 710 de vejigas neumáticas se presiona contra una cara de la bolsa 10, de modo que si se infla una vejiga en particular, la presión obligará al líquido a salir del blíster correspondiente en la bolsa 10. Además de las vejigas neumáticas correspondientes a muchos de los blísteres de la bolsa 10, el conjunto de vejigas puede tener accionadores neumáticos adicionales, tales como vejigas o pistones de accionamiento neumático, que corresponden a diversos canales de la bolsa 10. Cuando se activan, estos accionadores neumáticos adicionales forman válvulas de pinza para pinzar y cerrar los canales correspondientes. Para confinar el líquido dentro de un blíster en particular de la bolsa 10, los accionadores neumáticos de la válvula de pinza se inflan sobre los canales que conducen hasta desde el blíster y desde el mismo, de tal manera que los accionadores funcionan como válvulas de pinza para cerrar los canales. De manera ilustrativa, para mezclar dos volúmenes de líquido en diferentes blísteres, el accionador neumático de la válvula de pinza que sella el canal de conexión se despresuriza, y las vejigas neumáticas sobre los blísteres se presurizan alternativamente, forzando el líquido hacia atrás y hacia adelante a través del canal que conecta los blísteres para mezclar el líquido en las mismas. Los accionadores neumáticos de la válvula de pinza pueden ser de diversas formas y tamaños y se pueden configurar para pinzar más de un canal a la vez. Una válvula de pinza de este tipo ilustrativa se ilustra en la figura 1 como válvula 16 de pinza, que se puede utilizar para cerrar todos los puertos de inyección. Aunque se comentan en el presente documento accionadores neumáticos, se entiende que se contemplan otras formas de proporcionar presión a la bolsa, entre las que se incluyen diversos accionadores electromecánicos, tales como motores paso a paso lineales, levas accionadas por motor, paletas rígidas accionadas por fuerzas neumáticas, hidráulicas o electromagnéticas, rodillos, brazos oscilantes y, en algunos casos, resortes engatillados. Además, existe una variedad de procedimientos para cerrar canales de manera reversible o irreversible, además de aplicar presión normal al eje del canal. Estos incluyen retorcer la bolsa a través del canal, termosellar, hacer rodar un accionador y una variedad de válvulas físicas selladas en el canal, tales como válvulas de mariposa y válvulas esféricas. Adicionalmente, se pueden colocar pequeños dispositivos Peltier u otros reguladores de temperatura adyacentes a los canales y ajustarlos a una temperatura suficiente para congelar el fluido, formando eficazmente un sello. Además, aunque el diseño de la figura 1 está adaptado para un instrumento automatizado que presenta elementos de accionador situados sobre cada uno de los blísteres y los canales, también se contempla que los accionadores puedan permanecer estacionarios, y la bolsa puede transitar en una o dos dimensiones, de tal manera que podría utilizarse un número pequeño de accionadores para varias de las estaciones de procesamiento, incluyendo la perturbación de la muestra, la captura de ácidos nucleicos, la PCR de primera y segunda etapa, y otras aplicaciones de la bolsa, tales como inmunoensayo e inmuno-PCR. Los rodillos que actúan sobre canales y blísteres podrían resultar particularmente útiles en una configuración en la que la bolsa se traslada entre estaciones. Por tanto, aunque se utilizan accionadores neumáticos en los ejemplos descritos actualmente, cuando se utiliza el término “accionador neumático” en el presente documento, se entiende que se pueden utilizar otros accionadores y otras formas de proporcionar presión, dependiendo de la configuración de la bolsa y el instrumento.

60 Con referencia a la figura 1, se proporciona una bolsa 10 de muestra ilustrativa configurada para la extracción de ácidos nucleicos y PCR múltiplex. La muestra entra en la bolsa 10 a través del puerto 12 de inyección de muestra en el accesorio 90. El puerto 12 del inyector puede ser un sello frangible, una válvula unidireccional u otro puerto de entrada. Se puede utilizar vacío desde el interior de la bolsa 10 para introducir la muestra en la bolsa 10, se puede utilizar una jeringa u otra presión para forzar la muestra dentro de la bolsa 10 u otros medios para introducir la muestra en la bolsa 10 a través del puerto 12 del inyector. La muestra se desplaza a través del canal 14 hasta el blíster 22 de tres lóbulos de la zona 20 de lisis celular, en la que las células en la muestra se lisan. Una vez que la

muestra entra en el blíster 22 de tres lóbulos, se cierra la válvula 16 de pinza. Junto con la válvula 36 de pinza, que puede haberse cerrado ya, el cierre de la válvula 16 de pinza sella la muestra en un blíster 22 de tres lóbulos. Se entiende que la lisis celular puede no ser necesaria con cada muestra. Para tales muestras, la zona de lisis celular se puede omitir o la muestra se puede desplazar directamente a la siguiente zona. Sin embargo, con muchas muestras, es necesaria la lisis celular. En un ejemplo, la molienda con perlas se utiliza para lisar las células.

La molienda con perlas, al agitar o agitar en vórtex la muestra en presencia de partículas de lisis tales como perlas 34 de silicato de zirconio (ZS), es un procedimiento eficaz para formar un lisado. Se entiende que, tal como se utiliza en el presente documento, los términos tales como "lisar", "que lisa" y "lisado" no se limitan a la ruptura de células, sino que tales términos incluyen la disrupción de partículas acelulares, tales como virus. La figura 2 muestra una realización de una zona 20 de lisis celular, en la que el flujo convergente crea impactos de perlas de alta velocidad, para crear un lisado. De manera ilustrativa, los dos lóbulos inferiores 24, 26 del blíster 22 de tres lóbulos se conectan a través del canal 30, y el lóbulo superior 28 se conecta a los lóbulos inferiores 24, 26 en el lado opuesto 31 del canal 30. La figura 2a muestra una porción homóloga del conjunto 710 de vejigas que estaría en contacto con la zona 20 de lisis celular de la bolsa 10. Cuando la bolsa 10 se coloca en un instrumento, adyacente a cada lóbulo 24, 26, 28 en la bolsa 10 existe una vejiga neumática 724, 726, 728 correspondiente en el conjunto 710 de vejigas. Se entiende que el término "adyacente", cuando se refiere a la relación entre un blíster o un canal en una bolsa y su accionador neumático correspondiente, se refiere a la relación entre el blíster o el canal y el accionador neumático correspondiente cuando la bolsa se coloca en el instrumento. En un ejemplo, los conectores neumáticos 724a, 726a de las dos vejigas neumáticas inferiores 724, 726 adyacentes a los lóbulos inferiores 24, 26 se conectan entre sí. Los conectores neumáticos 724a, 726a y el conector neumático 728a de la vejiga neumática superior 728, adyacente al lóbulo superior 28, se conectan al lado opuesto de una válvula de accionamiento eléctrico configurada para impulsar un cilindro neumático de doble acción. Así configurada, la presión se alterna entre la vejiga neumática superior 728 y las dos vejigas neumáticas inferiores 724, 726. Cuando la válvula se conmuta hacia atrás y hacia adelante, el líquido en la bolsa 10 se impulsa entre los lóbulos inferiores 24, 26 y el lóbulo superior 28 a través de un nexo estrecho 32 en el canal 30. Como los dos lóbulos inferiores 24, 26 se presurizan al mismo tiempo, el flujo converge y se dispara hacia el lóbulo superior 28. Dependiendo de la geometría de los lóbulos, la velocidad de colisión de las perlas 34 en el nexo 32 puede ser, como mínimo, de aproximadamente 12 m/s, lo que proporciona colisiones de alto impacto que dan como resultado la lisis. El sistema de tres lóbulos ilustrativo permite una buena disrupción celular y robustez estructural, al tiempo que se minimiza el tamaño y el consumo de gas neumático. Aunque se utilizan perlas de ZS como partículas de lisis, se entiende que esta elección es sólo ilustrativa, y que se pueden utilizar otros materiales y partículas de otras formas. También se entiende que otras configuraciones para la zona 20 de lisis celular están dentro del alcance de la presente invención.

Aunque se utiliza un blíster de tres lóbulos para la lisis celular se entiende que otras configuraciones de múltiples lóbulos están dentro del alcance de la presente invención. Por ejemplo, se podría utilizar un blíster de cuatro lóbulos, de manera ilustrativa, en un patrón de hoja de trébol, en la que los blísteres opuestos se presurizan al mismo tiempo, forzando las partículas de lisis una hacia otra, y a continuación, inclinándose hacia los otros dos lóbulos que a continuación, pueden ser presurizados juntos. Tal blíster de cuatro lóbulos tendría la ventaja de tener impactos de alta velocidad en ambos sentidos. Además, se contempla la utilización de blísteres de un único lóbulo, en los que las partículas de lisis se desplazan rápidamente de una porción del blíster de un único lóbulo a la otra. Por ejemplo, se pueden utilizar accionadores neumáticos para cerrar áreas del blíster de un único lóbulo, formando temporalmente un blíster de múltiples lóbulos en las áreas restantes. También se pueden utilizar otros procedimientos de accionamiento, tales como paletas de motor, neumáticas, hidráulicas o de accionamiento electromagnético que actúan sobre los lóbulos del dispositivo. Se pueden utilizar rodillos o paletas rotatorias para impulsar el fluido conjuntamente en el nexo 32 de la figura 2, de manera ilustrativa, si se proporciona un medio de recirculación entre los lóbulos superior e inferior y el accionador proporciona acción de bombeo peristáltico. Otras configuraciones están dentro del alcance de la presente invención.

También es posible desplazar la muestra y las partículas de lisis lo suficientemente rápido como para efectuar la lisis dentro de un blíster de lisis de un único lóbulo sin formar temporalmente un blíster de múltiples lóbulos. En un ejemplo de este tipo, tal como se muestra en la figura 2b, se puede lograr la agitación en vórtex impactando la bolsa con palas o paletas rotatorias 21 unidas a un motor eléctrico 19. Las palas 21 pueden impactar contra la bolsa en el blíster de lisis o pueden impactar contra la bolsa cercal blíster de lisis, de manera ilustrativa en un borde 17 adyacente al blíster de lisis. En un ejemplo de este tipo, el blíster de lisis puede comprender uno o varios blísteres. La figura 15 muestra un ejemplo que comprende uno de tales blísteres 522 de lisis. La figura 15a muestra un motor 19 de batido de perlas, que comprende palas 21, que se pueden montar en un primer lado 811 del segundo elemento 804 de soporte, del instrumento 800 mostrado en la figura 8. Sin embargo, se entiende que el motor 19 puede estar montado en el primer elemento 802 de soporte o en otra estructura del instrumento 800.

La figura 2a también muestra la vejiga neumática 716 con el conector neumático 716a, y la vejiga neumática 736 con el conector neumático 736a. Cuando la bolsa 10 se pone en contacto con el conjunto 710 de vejigas, la vejiga 716 se alinea con el canal 12 para completar la válvula 16 de pinza. De manera similar, la vejiga 736 se alinea con el canal 38 para completar la válvula 36 de pinza. El funcionamiento de las vejigas neumáticas 716 y 736 permite que las válvulas 16 y 36 de pinza se abran y cierren. Aunque sólo se muestra la porción del conjunto 710 de vejigas adyacente a la zona de lisis celular, se entiende que el conjunto 710 de vejigas estaría dotado de disposiciones

similares de blísteres neumáticos para controlar el desplazamiento de fluidos a través de las zonas restantes de la bolsa 10.

Otros instrumentos de la técnica anterior dan a conocer PCR dentro de un recipiente flexible sellado. Véase, por ejemplo, las Patentes US 6,645,758 y 6,780,617 y la Patente US 10/478,453. Sin embargo, incluir la lisis celular dentro del recipiente de PCR sellado puede mejorar la facilidad de utilización y la seguridad, particularmente si la muestra que se a someter a prueba puede contener un peligro biológico. En los ejemplos ilustrados en el presente documento, los desechos de la lisis celular, así como los de todas las demás etapas, permanecen dentro de la bolsa sellada. Sin embargo, se entiende que el contenido de la bolsa podría retirarse para realizar pruebas adicionales.

Una vez que las células se lisan, se abre la válvula 36 de pinza y el lisado se desplaza a través del canal 38 hasta la zona 40 de preparación de ácidos nucleicos, tal como se observa de la mejor manera en la figura 3, después de lo cual, se cierra la válvula 36 de pinza, sellando la muestra en la zona 40 de preparación de ácidos nucleicos. En el ejemplo ilustrado en la figura 3, la purificación de ácidos nucleicos toma el material molido con perlas y utiliza unión por afinidad a perlas magnéticas 56 basadas en sílice, lavando las perlas con etanol y eluyendo los ácidos nucleicos con agua u otro fluido, para purificar el ácido nucleico del lisado celular. Los componentes individuales necesarios para la extracción de ácidos nucleicos residen, de manera ilustrativa, en los blísteres 44, 46, 48, que se conectan mediante canales 45, 47, 49 para permitir la mezcla de reactivos. El lisado entra en el blíster 44 desde el canal 38. El blíster 44 puede estar dotado de perlas magnéticas 56 y un tampón de unión adecuado, de manera ilustrativa un tampón de alto contenido en sal, tal como el del kit de preparación de muestras 1-2-3[®] (Idaho Technology, Salt Lake City, UT) o uno o ambos de estos componentes se pueden proporcionar posteriormente a través de uno o varios canales conectados al blíster 44. Los ácidos nucleicos se capturan en las perlas 56, a continuación, la válvula 53 de pinza se abre y el lisado y las perlas 56 se pueden mezclar mediante presión suave alternativamente sobre los blísteres 44 y 58 y, a continuación, se desplazan al blíster 58 mediante presión neumática, proporcionada, de manera ilustrativa, por una vejiga neumática correspondiente en el conjunto 710 de vejigas. Las perlas magnéticas 56 son capturadas en el blíster 58 por un imán retráctil 50, que está ubicado en el blíster 58 adyacente al instrumento, y los desechos se pueden desplazar hasta un depósito de residuos o se pueden devolver al blíster 44 aplicando presión al blíster 58. A continuación, la válvula 53 de pinza se cierra. Las perlas magnéticas 56 se lavan con etanol, isopropanol u otra solución de lavado orgánica o inorgánica proporcionada desde el blíster 46, tras la liberación de la válvula 55 de pinza. Opcionalmente, el imán 50 se puede retraer permitiendo que las perlas se laven proporcionando una presión alternativa sobre los blísteres 46 y 58. Las perlas 56 son capturadas una vez más en el blíster 58 por el imán 50, y la porción de ácido no nucleico del lisado se lava de las perlas 56 y se puede desplazar de vuelta al blíster 46 y fijarse con la válvula 55 de pinza o puede ser arrastrada a través de otro canal hasta un depósito de residuos. Una vez que se lavan las perlas magnéticas, se abre la válvula 57 de pinza, liberando agua (de manera ilustrativa, agua tamponada) u otro eluyente de ácidos nucleicos desde el blíster 48. Una vez más, el imán 50 se puede retraer para permitir la máxima mezcla de agua y perlas 56, de manera ilustrativa, proporcionando una presión alternativa sobre los blísteres 48 y 58. El imán 50 se despliega una vez más para recoger las perlas 56. Se libera la válvula 59 de pinza y el ácido nucleico eluido se desplaza a través del canal 52 hasta la zona 60 de amplificación de primera etapa. A continuación, la válvula 59 de pinza se cierra, fijando así la muestra en la zona 60 de amplificación de primera etapa.

Se entiende que la configuración para la zona 40 de preparación de ácidos nucleicos, tal como se muestra en la figura 3 y descrita anteriormente, es sólo ilustrativa, y que son posibles otras diversas configuraciones dentro del alcance de la presente invención.

El etanol, el agua y otros fluidos utilizados en el presente documento se pueden proporcionar a los blísteres de diversas maneras. Los fluidos se pueden almacenar en los blísteres, cuyos cuellos se pueden pinzar con diversas válvulas de pinza o porciones frangibles que se pueden abrir en el momento apropiado en la secuencia de preparación de muestras. Alternativamente, el fluido se puede almacenar en depósitos en la bolsa, tal como se muestra en la bolsa 110, en la figura 5, o en el accesorio, tal como se comenta con respecto a la bolsa 210 de la figura 6, y desplazarse a través de canales, según sea necesario. Los fluidos se pueden introducir desde una fuente externa, tal como se muestra en la figura 1, especialmente con respecto a los puertos 41, 88 de inyección de etanol y los émbolos 67, 68, 69. De manera ilustrativa, los émbolos 67, 68, 69 se pueden insertar en el accesorio 90, de manera ilustrativa de un material más rígido, y pueden proporcionar un volumen medido de fluido tras la activación del émbolo, tal como en la Patente US 10/512,255. El volumen medido puede ser igual o diferente para cada uno de los émbolos. La bolsa puede estar dotada de un volumen medido del fluido que se almacena en uno o varios blísteres, en la que el fluido está contenido dentro del blíster, que se proporciona, de manera ilustrativa, en una pequeña bolsa sellada dentro del blíster, formando eficazmente un blíster dentro del blíster. En el momento apropiado, la bolsa sellada se puede romper, de manera ilustrativa, mediante presión neumática, liberando de ese modo el fluido en el blíster de la bolsa. El instrumento también se puede configurar para proporcionar algunos o todos los reactivos directamente a través de los contactos líquidos entre el instrumento y el accesorio o material de la bolsa, siempre que el paso del fluido esté regulado estrictamente por una válvula unidireccional para impedir que el instrumento se contamine durante una ejecución. Además, será deseable, a menudo, que la bolsa o su accesorio se sellen después de la operación para prohibir que ADN contaminante escape de la bolsa. Se conocen diversos medios para proporcionar reactivos a demanda, tales como bombas de jeringa, y para entrar en contacto de fluido temporal con el accesorio o la bolsa, tales como accesorios de púas o sellos de juntas tóricas. Se entiende que

cualquiera de estos procedimientos de introducción de fluidos en el blíster apropiado se puede utilizar con cualquiera de los ejemplos de bolsa, tal como se comenta en el presente documento, según lo dicten las necesidades de una aplicación particular.

5 Tal como se comentó anteriormente, la PCR anidada implica la amplificación de diana realizada en dos etapas. En la primera etapa, las dianas se amplifican, de manera ilustrativa, a partir de un molde genómico o sometido a transcripción inversa. La amplificación de primera etapa se puede terminar antes de la fase de meseta, si se desea. En la reacción secundaria, los amplicones de primera etapa se pueden diluir y una amplificación secundaria utiliza los mismos cebadores o utiliza, de manera ilustrativa, cebadores anidados que se hibridan internamente con los
10 cebadores del producto de primera etapa. Las ventajas de la PCR anidada incluyen: a) el producto de reacción inicial forma un molde homogéneo y específico que garantiza una alta fidelidad en la reacción secundaria, en el que incluso una reacción de primera etapa de eficiencia relativamente baja crea un molde adecuado para soportar una reacción de segunda etapa robusta; b) los productos inespecíficos de la reacción de primera etapa no interfieren significativamente con la reacción de segunda etapa, ya que se utilizan diferentes cebadores anidados y el molde de amplificación original (de manera ilustrativa, ADN genómico o producto de transcripción inversa) se puede diluir en un grado que elimine su significación en la amplificación secundaria; y c) la PCR anidada permite la multiplexación de reacción de orden superior. Las reacciones de primera etapa pueden incluir cebadores para varios productos de amplificación únicos. A continuación, estos productos se identifican en las reacciones de segunda etapa. Sin embargo, se entiende que múltiplex de primera etapa y singleplex de segunda etapa son sólo ilustrativos y que otras configuraciones son posibles. Por ejemplo, la primera etapa puede amplificar una variedad de amplicones relacionados diferentes utilizando un único par de cebadores, y la segunda etapa se puede utilizar para seleccionar como diana diferencias entre los amplicones utilizando de manera ilustrativa, el análisis de curvas de fusión.

Volviendo a la figura 1, la muestra de ácido nucleico entra en la zona 60 de amplificación de primera etapa a través del canal 52 y se suministra al blíster 61. Se puede proporcionar una mezcla de PCR, que incluye una polimerasa (de manera ilustrativa una Taq polimerasa), dNTP y cebadores, de manera ilustrativa una serie de pares de cebadores para la amplificación múltiplex, en el blíster 61 o se puede introducir en el blíster 61 a través de diversos medios, tal como se comentó con anterioridad. Alternativamente, pueden aplicarse reactivos secados en la ubicación del blíster 61 al ensamblar la bolsa 10, y se puede introducir agua o tampón en el blíster 61, de manera ilustrativa, a través del émbolo 68, tal como se muestra en la figura 1. Tal como se observa de la mejor manera en la figura 4, la muestra ahora se fija en el blíster 61 mediante las válvulas 59 y 72 de pinza, y se termocicla entre dos o más temperaturas, de manera ilustrativa, mediante bloques térmicos o dispositivos Peltier que están ubicados en el instrumento y configurados para entrar en contacto con el blíster 61. Sin embargo, se entiende que otros medios de calentamiento y enfriamiento de la muestra contenida dentro del blíster 61, tal como se conoce en la técnica, están dentro del alcance de la presente invención. Entre los ejemplos no limitativos de dispositivos alternativos de calentamiento/enfriamiento para ciclado térmico se incluyen tener un blíster con ciclo de aire dentro de la vejiga, en la que el aire en el blíster neumática adyacente al blíster 61 se cicla entre dos o más temperaturas; o desplazar la muestra hasta zonas de temperatura dentro del blíster 61 utilizando, de manera ilustrativa, una serie de prensas neumáticas, tal como en la Patente US 10/478,453, o trasladando la bolsa 10 en un eje o dotando la bolsa 10 de un diseño rotatorio y girando la bolsa 10 para desplazar el contenido entre zonas de calor de temperatura fija.

Los ácidos nucleicos de los patógenos a menudo se aíslan conjuntamente con cantidades considerables de ácidos nucleicos del huésped. Estos ácidos nucleicos derivados del huésped interactúan a menudo con los cebadores, lo que da como resultado la amplificación de productos no deseados que, a continuación, eliminan los cebadores, los dNTP y la actividad polimerasa, lo que priva potencialmente al producto deseado de recursos. Los ácidos nucleicos de organismos patógenos son, en general, de baja abundancia, y el producto no deseado es un problema potencial. El número de ciclos en la reacción de primera etapa de la zona 60 se puede optimizar para maximizar productos específicos y minimizar productos inespecíficos. Se espera que el número óptimo de ciclos sea entre aproximadamente 10 y aproximadamente 30 ciclos, de manera ilustrativa entre aproximadamente 15 y aproximadamente 20 ciclos, pero se entiende que el número de ciclos puede variar dependiendo de la diana, el huésped y la secuencia de cebador en particular.

Después de la amplificación múltiplex de primera etapa, el producto de amplificación de primera etapa se diluye, de manera ilustrativa en una mezcla maestra de PCR incompleta, antes de la transferencia fluidica a los sitios de reacción secundarios.

La figura 4 muestra un ejemplo ilustrativo para diluir la muestra en tres etapas. En la primera etapa, se abre la válvula 72 de pinza y la muestra experimenta una dilución doble mezclando la muestra en el blíster 61 con un volumen igual de agua o tampón del blíster 62, que se proporciona al blíster 62, así como a los blísteres 64 y 66, tal como se comentó anteriormente. Presionar el volumen hacia atrás y hacia delante entre los blísteres 61, 62 proporciona una mezcla exhaustiva. Tal como se indicó anteriormente, la mezcla puede ser proporcionada por vejigas neumáticas dotadas en la vejiga 710 y ubicadas en los blísteres 61, 62 adyacentes. Las vejigas neumáticas se pueden presurizar alternativamente, forzando el líquido hacia atrás y hacia adelante. Durante la mezcla, una válvula 74 de pinza impide el flujo de líquido hacia los blísteres adyacentes. Al concluir la mezcla, se captura un volumen de la muestra diluida en la región 70, y se cierra la válvula 72 de pinza, sellando la muestra diluida en la región 70. La válvula 74 de pinza se abre y la muestra se diluye adicionalmente con agua o tampón proporcionado

en uno o ambos blísteres 63, 64. Tal como anteriormente, presionando el volumen hacia atrás y hacia delante entre los blísteres 63, 64 proporciona la mezcla. Posteriormente, la válvula 74 de pinza se cierra, sellando un volumen de muestra diluido adicionalmente en la región 71. La dilución final tiene lugar utilizando de manera ilustrativa tampón o agua proporcionado en uno o ambos blísteres 65, 66, con mezcla, tal como se indicó anteriormente. De manera
 5 ilustrativa, esta dilución final tiene lugar utilizando una mezcla maestra de PCR incompleta (por ejemplo, que contiene todos los reactivos de PCR excepto los cebadores) como fluido. El calentamiento opcional del contenido del blíster 66 antes de la amplificación de segunda etapa puede proporcionar los beneficios de la amplificación de arranque en caliente sin la necesidad de costosos anticuerpos o enzimas. Sin embargo, se entiende que se puede utilizar agua u otro tampón para la dilución final, proporcionándose componentes de PCR adicionales en la zona 80
 10 de amplificación de segunda etapa. Aunque los ejemplos ilustrativos utilizan tres etapas de dilución, se entiende que se puede utilizar cualquier número de etapas de dilución, para proporcionar un nivel adecuado de dilución. También se entiende que la cantidad de dilución se puede controlar ajustando el volumen de la muestra capturada en las regiones 70 y 71, en la que cuanto menor es la cantidad de muestra capturada en las regiones 70 y 71, mayor es la cantidad de dilución o en la que se pueden utilizar alícuotas adicionales capturadas en la región 70 y/o la región 71
 15 abriendo y cerrando repetidamente las válvulas 72 y 74 de pinza y/o las válvulas 74 y 76 de pinza para disminuir la cantidad de dilución. Se espera que una dilución de aproximadamente 10^{-2} a 10^{-5} sea adecuada para muchas aplicaciones.

El éxito de las reacciones de PCR secundarias depende del molde generado por la reacción múltiple de primera
 20 etapa. Normalmente, la PCR se realiza utilizando ADN de alta pureza. Procedimientos como la extracción con fenol o los kits comerciales de extracción de ADN proporcionan ADN de alta pureza. Las muestras procesadas a través de la bolsa 10 pueden requerir que se realicen adaptaciones para compensar una preparación menos pura. La PCR puede ser inhibida por componentes de muestras biológicas, lo cual es un obstáculo potencial. De manera ilustrativa, la PCR de arranque en caliente, mayor concentración de enzima Taq polimerasa, ajustes en la
 25 concentración de $MgCl_2$, ajustes en la concentración de cebador y la adición de adyuvantes (tales como DMSO, TMSO o glicerol) se pueden utilizar, opcionalmente, para compensar la menor pureza de ácido nucleico. Aunque es probable que los problemas de pureza sean más preocupantes con la amplificación de primera etapa, se entiende que también se pueden proporcionar ajustes similares en la amplificación de segunda etapa.

Aunque la dilución y la preparación de muestras en la segunda etapa se pueden lograr reteniendo una pequeña
 30 cantidad de muestra amplificada en los blísteres y los canales de la porción de PCR de primera etapa de la bolsa, se entiende que estos procesos también se pueden realizar de otras maneras. En uno de tales ejemplos ilustrativos, la muestra preamplificada se puede capturar en una pequeña cavidad en un elemento, de manera ilustrativa, un elemento de traslación o rotación, capaz de desplazar un volumen fijo de muestra del reactivo de PCR de la primera
 35 etapa a la segunda etapa. Una fracción de un microlitro de la muestra preamplificada, mezclada con 100 microlitros de reactivo de PCR nuevo produciría una reducción de cien veces en la concentración. Se entiende que esta dilución es sólo ilustrativa, y que son posibles otros volúmenes y niveles de dilución. Este enfoque podría lograrse forzando el producto de amplificación de primera etapa al accesorio rígido en el que entra en contacto con uno de los émbolos 68 o 69 de la figura 1. En un ejemplo de este tipo, el émbolo se configuraría para llevar una pequeña
 40 fracción de la muestra a contacto con el tampón de dilución adyacente o el tampón de PCR de segunda etapa. De manera similar, se podría utilizar un elemento deslizante para llevar una pequeña cantidad del producto de amplificación de primera etapa a contacto con la mezcla de reacción de segunda etapa mientras se mantiene un sello entre las etapas y que contiene la muestra amplificada dentro del accesorio rígido 90.

Después de la PCR de primera etapa y dilución, el canal 78 transfiere la muestra a una serie de blísteres 82 de bajo
 45 volumen para la PCR anidada secundaria. Los cebadores secados proporcionados en los blísteres de segunda etapa se pueden resuspender por el material acuoso entrante para completar la mezcla de reacción. Opcionalmente, se pueden proporcionar colorantes fluorescentes, tales como LCGreen® Plus (Idaho Technology, Salt Lake City, UT) utilizados para la detección de ácido nucleico bicatenario en cada blíster o se pueden añadir a la mezcla maestra de
 50 PCR incompleta que se proporciona al final de la dilución en serie, aunque se entiende que LCGreen® Plus es sólo ilustrativo y que otros colorantes están disponibles, tal como se conoce en la técnica. En otro ejemplo ilustrativo, se pueden proporcionar sondas de oligonucleótido marcadas con fluorescencia secadas configuradas para cada amplicón específico en cada blíster de segunda etapa respectiva, junto con los respectivos cebadores secados. Además, aunque la bolsa 10 está diseñada para contener todas las reacciones y manipulaciones dentro, para
 55 reducir la contaminación, en algunas circunstancias puede ser deseable retirar los productos de amplificación de cada blíster 82 para realizar un análisis adicional. Otros medios para la detección del amplicón de segunda etapa, tal como se conocen en la técnica, están dentro del alcance de la presente invención. Una vez que la muestra se transfiere a los blísteres 82, las válvulas 84 y 86 de pinza se activan para cerrar los blísteres 82. Cada blíster 82 contiene ahora todos los reactivos necesarios para la amplificación de una diana particular. De manera ilustrativa,
 60 cada blíster puede contener un par único de cebadores, o una serie de blísteres 82 puede contener los mismos cebadores para proporcionar varias amplificaciones replicadas.

Cabe destacar que las realizaciones descritas en el presente documento utilizan blísteres para la amplificación de
 65 segunda etapa, en las que los blísteres están formados por la misma película de plástico o similar que el resto de la porción flexible. Sin embargo, en muchas realizaciones, el contenido de los blísteres de segunda etapa nunca se retira de los blísteres de segunda etapa y, por tanto, no existe la necesidad de que la reacción de segunda etapa

tenga lugar en blísteres flexibles. Se entiende que la reacción de segunda etapa puede tener lugar en una serie de cámaras rígidas, semirrígidas o flexibles que están en conexión de fluido con los blísteres. Las cámaras podrían sellarse como en el presente ejemplo imponiendo presión sobre canales flexibles que conectan las cámaras, o pueden ser selladas de otras maneras, de manera ilustrativa, mediante termosellado o la utilización de válvulas unidireccionales. Varios ejemplos comentados en el presente documento incluyen blísteres proporcionados únicamente para la recogida de residuos. Como los residuos nunca se pueden eliminar, los residuos se pueden recoger en cámaras rígidas, semirrígidas o flexibles.

Está dentro del alcance de la presente invención realizar la amplificación de segunda etapa con los mismos cebadores utilizados en la amplificación de primera etapa (véase la Patente US 6,605,451). Sin embargo, a menudo es ventajoso tener cebadores en las reacciones de segunda etapa que son internos al producto de primera etapa, de modo que no exista solapamiento o sea mínimo entre los sitios de unión del cebador de primera y segunda etapa. La dilución del producto de primera etapa elimina en gran medida la contribución del ADN molde original y los reactivos de primera etapa a la reacción de segunda etapa. Además, de manera ilustrativa, se pueden utilizar cebadores de segunda etapa con una T_f mayor que la utilizada en la primera etapa para potenciar la amplificación anidada. El cebador puede estar diseñado para evitar horquillas significativas, hetero/homodímeros e hibridación no deseada. Debido al formato anidado, los cebadores de segunda etapa toleran interacciones perjudiciales mucho más que los cebadores utilizados para amplificar las dianas del ADN genómico en una única etapa. Opcionalmente, el arranque en caliente se utiliza en la amplificación de segunda etapa.

Si se incluye un colorante fluorescente en la amplificación de segunda etapa, de manera ilustrativa como un colorante de unión a ADNbc o como parte de una sonda fluorescente, tal como se conoce en la técnica, la óptica proporcionada se puede utilizar para monitorizar la amplificación de una o varias de las muestras. Opcionalmente, se puede proporcionar un análisis de la forma de la curva de amplificación para llamar a cada muestra positiva o negativa. Los procedimientos ilustrativos para llamar a la muestra se comentan en la Patente US 6,730,501. Alternativamente, se pueden utilizar procedimientos que emplean un umbral de cruce. Se puede proporcionar un ordenador externamente o dentro del instrumento y se puede configurar para realizar los procedimientos y llamar a la muestra positiva o negativa en función de la presencia o ausencia de amplificación de segunda etapa y puede proporcionar información cuantitativa sobre la concentración de molde inicial comparando parámetros característicos de la curva de amplificación (tales como el umbral de cruce) con curvas patrón, o en relación con otras curvas de amplificación dentro de la ejecución. Sin embargo, se entiende que se pueden utilizar otros procedimientos, tal como se conocen en la técnica, para llamar a cada muestra. Se pueden realizar otros análisis sobre la información fluorescente. Un ejemplo no limitativo es la utilización del análisis de la curva de fusión para mostrar las características de fusión adecuadas (por ejemplo, T_f , forma del perfil de fusión) del amplicón. La óptica proporcionada se puede configurar para capturar imágenes de todos los blísteres 82 a la vez, o se pueden proporcionar ópticas individuales para cada blíster individual. Otras configuraciones están dentro del alcance de la presente invención.

La figura 5 muestra una bolsa 110 alternativa. En este ejemplo, se cargan diversos reactivos en la bolsa 110 a través del accesorio 190. La figura 5a muestra una sección transversal del accesorio 190 con uno de una serie de émbolos 168. Se entiende que, mientras que la figura 5a muestra una sección transversal a través del canal 115a de entrada, tal como se muestra en el ejemplo de la figura 5, existen 12 canales de entrada presentes (canales 115a a 115i de entrada), cada uno de los cuales puede tener su propio émbolo 168 para su utilización en el accesorio 190, aunque en esta configuración particular, los canales 115c, 115f y 115i de entrada no se utilizan. Se entiende que una configuración que tiene 12 canales de entrada es sólo ilustrativa, y que se puede utilizar cualquier número de canales de entrada y émbolos asociados. En el ejemplo ilustrativo, se forma un puerto 142 de vacío opcional del accesorio 190 a través de una primera superficie 194 del accesorio 190 para comunicarse con la cámara 192. Se puede proporcionar un puerto 142 de vacío opcional para comunicarse con una cámara de vacío o vacío (no mostrado) para extraer el aire del interior de la bolsa 110 para crear un vacío dentro de la cámara 192 y los diversos blísteres y cámaras de la bolsa 110. A continuación, se inserta el émbolo 168 lo suficiente en la cámara 192 para sellar el puerto 142 de vacío. La cámara 192 se proporciona, de manera ilustrativa, bajo una cantidad predeterminada de vacío para introducir un volumen deseado de líquido en la cámara 192 tras su utilización. Se puede hallar información adicional sobre la preparación de la cámara 192 en la Patente US 10/512,255.

El accesorio 190 ilustrativo incluye, además, un puerto 141 de inyección formado en la segunda superficie 195 del accesorio 190. De manera ilustrativa, el puerto 141 de inyección se sitúa más cerca de la porción de película de plástico de la bolsa 110 que el puerto 142 de vacío, tal como se muestra en la figura 5a, de tal manera que el émbolo 168 se inserta lo suficiente como para sellar el puerto 142 de vacío, al tiempo que permite todavía el acceso a la cámara 192 a través del puerto 141 de inyección. Tal como se muestra, la segunda superficie 119 de la porción 117 de película de plástico proporciona un sello penetrable 139 para impedir la comunicación entre la cámara 192 y la atmósfera circundante a través del puerto 141 de inyección. Sin embargo, se entiende que la segunda superficie 119 no se puede extender opcionalmente hasta el puerto 141 de inyección y se pueden emplear otros diversos sellos. Además, si se desea otra ubicación para el sello, por ejemplo en una primera superficie 194 del accesorio 190, el puerto 141 de inyección puede incluir un canal a esa ubicación en el accesorio 190. La Patente US 10/512,255, muestra diversas configuraciones en las que el sello está ubicado de manera remota con respecto al puerto de inyección, y el sello se conecta a la cámara a través de un canal. También, la Patente US 10/512,255 da a

conocer diversas configuraciones en las que los canales conectan un único sello a múltiples cámaras. Las variaciones en la ubicación del sello, así como la conexión de un único puerto de inyección a múltiples cámaras, están dentro del alcance de la presente invención. Opcionalmente, el sello 139 puede ser frangible y se puede romper tras la inserción de una cánula (no mostrada), para permitir que una muestra de fluido del interior de la cánula se introduzca o se fuerce a la cámara 192.

El émbolo 168 ilustrativo del conjunto 110 de la bolsa tiene forma cilíndrica y tiene un diámetro de aproximadamente 5 mm para encajar a presión en la cámara 192. El émbolo 168 incluye una primera porción 173 de extremo y una segunda porción 175 de extremo opuesta. Tal como se muestra en la figura 5a, se forma una muesca 169 del émbolo 168 en la segunda porción 175 de extremo. Durante la utilización, la segunda porción 175 de extremo se inserta parcialmente en la cámara 192, y la muesca 169 se puede alinear con el puerto 141 de inyección para permitir que se introduzca una muestra de fluido o se inyecte en la cámara 192, incluso cuando el émbolo 168 se inserta lo suficiente como para que el émbolo 168 bloquee por lo demás el puerto 141 de inyección.

De manera ilustrativa, se coloca un fluido en un recipiente (no mostrado) con una jeringa que tiene una punta canulada que se puede insertar en el puerto 141 de inyección para perforar el sello 139 en la misma. Al utilizar un conjunto 110 de la bolsa de evacuación de aire, cuando se perfora el sello 139, el fluido se extrae del recipiente debido a la presión negativa dentro de la cámara 192 en relación con la presión de aire ambiental. A continuación, el fluido pasa a través del puerto 141 para llenar la cámara 192. En este punto, el fluido no fluye, en general, hacia la porción 117 de película de plástico de la bolsa 110. Finalmente, el émbolo 168 se inserta en la cámara 192 de tal manera que la segunda porción 175 de extremo del émbolo 168 se acerca a la parte inferior 191 de la cámara 192, para empujar una cantidad medida del reactivo o la muestra a la porción 117 de película de plástico. Tal como se muestra, el émbolo 168 está configurado de tal manera que, tras la inserción completa, la segunda porción 175 de extremo no alcanza la parte inferior 191 de la cámara 192. El espacio restante es útil para atrapar burbujas, reduciendo de ese modo el número de burbujas que entran en la porción 117 de película de plástico. Sin embargo, en algunos ejemplos puede ser deseable que la segunda porción 175 de extremo se encuentre con la parte inferior 191 tras la inserción completa del émbolo 168. En el ejemplo mostrado en la figura 5, todos los canales 115a, 115b, 115d, 115e, 115g, 115h, 115j, 115k y 115l de entrada conducen a zonas de reacción o blísteres de depósito. Se entiende que la inserción completa del émbolo asociado con el canal 115a de entrada forzaría a una muestra en un blíster 122 de tres lóbulos, la inserción completa del émbolo asociado con el canal 115b de entrada forzaría a un reactivo al blíster 101 de depósito, la inserción completa del émbolo asociado con el canal 115d de entrada forzaría a un reactivo al blíster 102 de depósito, la inserción completa del émbolo asociado con el canal 115e de entrada forzaría a un reactivo al blíster 103 de depósito, la inserción completa del émbolo asociado con el canal 115g de entrada forzaría a un reactivo al blíster 104 de depósito, la inserción completa del émbolo asociado con el canal 115h de entrada forzaría a un reactivo al blíster 105 de depósito, la inserción completa del émbolo asociado con el canal 115j de entrada forzaría a un reactivo al blíster 106 de depósito, la inserción completa del émbolo asociado con el canal 115k de entrada forzaría a un reactivo al blíster 107 de depósito, y la inserción completa del émbolo asociado con el canal 115l de entrada forzaría a un reactivo al blíster 108 de depósito.

Si se utiliza un diseño de émbolo que incluye la muesca 169, tal como se ilustra en el ejemplo mostrado en la figura 5a, el émbolo 168 se puede hacer rotar antes de hacer que descienda, para desplazar la muesca 169 y cerrar el puerto 141 de inyección de la comunicación con la cámara 192, para sellar el contenido en la misma. Esto actúa para minimizar cualquier posible contraflujo de fluido a través del puerto 141 de inyección a la atmósfera circundante, lo cual es particularmente útil cuando se desea retrasar la inserción completa del émbolo. Aunque la muesca 169 se mostró y se describió anteriormente con respecto al émbolo 168, dentro del alcance de la presente invención se encuentra cerrar el puerto 141 de inyección poco después de dispensar la muestra de fluido en la cámara 192 por otros medios, tales como presionar el émbolo 168 hacia la parte inferior de la cámara 192, termosellado, válvulas unidireccionales o puertos de autosellado, por ejemplo. Si se utiliza el termosellado como procedimiento de sellado, se podría incluir una barra de sellado en el instrumento de tal manera que todas las cámaras se termosellen al insertar la bolsa en el instrumento.

En el procedimiento ilustrativo, el usuario inyecta la muestra en el puerto 141 de inyección asociado con el canal 115a de entrada, y agua en los otros diversos puertos de inyección. El agua rehidrata los reactivos que se han liofilizado previamente en las cámaras 192 asociadas con cada uno de los canales 115b, 115d, 115e, 115g, 115h, 115j, 115k y 115l de entrada. El agua se puede inyectar a través de un único sello y a continuación, distribuirse a través de un canal a cada una de las cámaras, tal como se muestra en la figura 6, a continuación, o el agua podría inyectarse en cada cámara de manera independiente. Alternativamente, en lugar de inyectar agua para rehidratar reactivos secados, se pueden inyectar reactivos húmedos tales como reactivos de lisis, reactivos de extracción de ácidos nucleicos y reactivos de PCR en las cámaras 192 apropiadas del accesorio 190.

Tras la activación del émbolo 168 asociado con el canal 115a de entrada, la muestra se fuerza directamente en el blíster 122 de tres lóbulos a través del canal 114. El usuario también presiona los émbolos 168 restantes, forzando el contenido fuera de cada una de las cámaras 192 en el accesorio 190 y en los blísteres 101 a 108 de depósito. En este punto, la bolsa 110 se carga en un instrumento para su procesamiento. Aunque el instrumento 800, que se muestra en la figura 8, está configurado para la bolsa 210 de la figura 6, se entiende que la modificación de la configuración de las vejigas del instrumento 800 haría que el instrumento 800 fuese adecuado para su utilización con

las bolsas 110 y 510, o con bolsas de otras configuraciones.

En un ejemplo ilustrativo, tras la depresión de los émbolos 168, el blíster 101 de depósito contiene ahora perlas magnéticas de unión a ADN en isopropanol, el blíster 102 de depósito contiene ahora una primera solución de lavado, el blíster 103 de depósito contiene ahora una segunda solución de lavado, el blíster 104 de depósito contiene ahora un tampón de elución de ácidos nucleicos, el blíster 105 de depósito contiene ahora reactivos de PCR de primera etapa, incluyendo cebadores de primera etapa multiplexados, el blíster 106 de depósito contiene ahora reactivos de PCR de segunda etapa sin cebadores, el blíster 107 de depósito contiene ahora reactivos de PCR de control negativo sin cebadores y sin molde, y el blíster 108 de depósito contiene ahora reactivos de PCR de control positivo con molde. Sin embargo, se entiende que estos reactivos son sólo ilustrativos, y que se pueden utilizar otros reactivos, dependiendo de las reacciones y las condiciones de optimización deseadas.

Una vez que la bolsa 110 se ha colocado en el instrumento 800 y la muestra se ha desplazado a un blíster 122 de tres lóbulos, la muestra se puede someter a disrupción agitando la muestra con partículas de lisis, tales como perlas de ZS o cerámica. Las partículas de lisis se pueden proporcionar en un blíster 122 de tres lóbulos, o se pueden inyectar en un blíster 122 de tres lóbulos junto con la muestra. El blíster 122 de tres lóbulos de la figura 5 funciona de la misma manera que el blíster 22 de tres lóbulos de la figura 1, con los dos lóbulos inferiores 124, 126 presurizados juntos, y la presión se alterna entre el lóbulo superior 128 y los dos lóbulos inferiores 124, 126. Sin embargo, tal como se ilustra, los lóbulos inferiores 124, 126 son mucho más redondeados que los lóbulos inferiores 24, 26, lo que permite un flujo suave de perlas al canal 130 y permite colisiones de alta velocidad, incluso sin el separador de flujo triangular en el nexo 32. De la misma manera que con el blíster 22 de tres lóbulos, el blíster 122 de tres lóbulos de la figura 5 permite una lisis o disrupción eficaz de microorganismos, células y partículas virales en la muestra. Se ha descubierto que un canal 130 que tiene una anchura de, aproximadamente 3-4 mm, y de manera ilustrativa aproximadamente 3,5 mm, permanece relativamente despejado de perlas durante la lisis y es eficaz para proporcionar colisiones a alta velocidad.

Después de la lisis, las perlas magnéticas de unión a ácido nucleico se inyectan en el lóbulo superior 128 a través del canal 138 presurizando una vejiga situada sobre el blíster 101 de depósito. Las perlas magnéticas se mezclan, de manera ilustrativa, más suavemente que durante la lisis, con el contenido del blíster 122 de tres lóbulos, y la solución se incuba, de manera ilustrativa, durante aproximadamente 1 minuto, para permitir que los ácidos nucleicos se unan a las perlas.

A continuación, la solución se bombea al blíster 144 de la "figura 8" a través del canal 143, en el que las perlas son capturadas por un imán retráctil alojado en el instrumento, que se acciona neumáticamente de manera ilustrativa. El proceso de captura de perlas comienza presurizando todos los lóbulos 124, 126 y 128 del aparato 122 de molienda de perlas. Esto fuerza gran parte del contenido líquido de 122 a través del canal 143 y dentro del blíster 144. Un imán se pone en contacto con la porción inferior 144b del blíster 144 y la muestra se incuba durante varios segundos para permitir que el imán capture las perlas de la solución, a continuación, las vejigas adyacentes al blíster 122 se despresurizan, las vejigas adyacentes a las porciones 144a y 144b de blíster se presurizan y el líquido se fuerza de vuelta al blíster 122. Dado que no todas las perlas se capturan en una única pasada, este proceso se puede repetir hasta 10 veces para capturar sustancialmente todas las perlas en el blíster 144. A continuación, el líquido se expulsa del blíster 144, dejando sólo las perlas magnéticas y los ácidos nucleicos capturados, y los reactivos de lavado se introducen en el blíster 144 en dos lavados sucesivos (desde los blísteres 102 y 103 de depósito a través de los canales 145 y 147, respectivamente). En cada lavado, la vejiga situada sobre el blíster de depósito que contiene el reactivo de lavado se presuriza, forzando el contenido al blíster 144. El imán se retira y el sedimento que contiene las perlas magnéticas se rompe al presurizar alternativamente cada una de las dos vejigas que cubren cada lóbulo 144a y 144b del blíster 144. Cuando el lóbulo superior 144a se comprime, se fuerza el contenido líquido al lóbulo inferior 144b, y cuando el lóbulo inferior 144b se comprime, se fuerza el contenido al lóbulo superior 144a. Al agitar la solución en el blíster 144 entre el lóbulo superior 144a y el lóbulo inferior 144b, las perlas magnéticas se lavan eficazmente de impurezas. Se mantiene un equilibrio entre la agitación inadecuada, que deja el sedimento de perlas sin romper, y la agitación excesiva, que lava potencialmente los ácidos nucleicos de la superficie de las perlas y los pierde con los reactivos de lavado. Después de cada ciclo de lavado, las perlas magnéticas se capturan a través del imán en el blíster 144 y los reactivos de lavado se fuerzan, de manera ilustrativa, a un blíster 122 de tres lóbulos, que sirve ahora como receptáculo de residuos. Sin embargo, se entiende que los blísteres de depósito utilizadas también pueden servir como receptáculos de desechos, u otros blísteres se pueden proporcionar específicamente como receptáculos de desechos.

El tampón de elución de ácidos nucleicos del blíster 104 de depósito se inyecta, a continuación a través del canal 149 en el blíster 144, la muestra se agita una vez más y las perlas magnéticas se vuelven a capturar mediante el empleo del imán. La mezcla fluida en el blíster 144 contiene ahora ácidos nucleicos de la muestra original. La presión sobre el blíster 144 desplaza la muestra de ácidos nucleicos al blíster 161 de PCR de primera etapa a través del canal 152, en el que la muestra se mezcla con la mezcla maestra de PCR de primera etapa que contiene múltiples conjuntos de cebadores, proporcionándose la mezcla maestra de PCR desde el blíster 105 de depósito a través del canal 162. Si se desea, la muestra y/o la mezcla maestra de PCR de primera etapa se pueden calentar antes de mezclarse, para proporcionar ventajitas de arranque en caliente. Opcionalmente, se pueden proporcionar componentes para la transcripción inversa de las dianas de ARN antes de la PCR de primera etapa.

Alternativamente, se puede proporcionar una enzima RT (reverse transcriptase, transcriptasa inversa, de manera ilustrativa, una enzima RT termoestable en la mezcla maestra de PCR de primera etapa para permitir la transcripción inversa simultánea de dianas de ARN. Se entiende que una enzima RT puede estar presente en la mezcla de PCR de primera etapa. Tal como se observará, a continuación, la bolsa 110 de la figura 5 está configurada para hasta 10 conjuntos de cebadores, pero se entiende que la configuración se puede alterar y se puede utilizar cualquier número de conjuntos de cebadores. Una vejiga situada sobre el blíster 161 se presuriza a baja presión, para forzar el contenido del blíster 161 a un contacto íntimo con un elemento de calentamiento/enfriamiento, de manera ilustrativa un elemento Peltier, en el otro lado del blíster 161. La presión sobre el blíster 161 debe ser suficiente para garantizar un buen contacto con el elemento de calentamiento/enfriamiento, pero debe ser lo suficientemente suave como para que el fluido no se vea forzado desde el blíster 161. El elemento de calentamiento/enfriamiento se somete a un ciclo de temperatura, de manera ilustrativa, entre aproximadamente 60 °C y aproximadamente 95 °C. De manera ilustrativa, el ciclo de temperatura se realiza durante aproximadamente 15-20 ciclos, dando como resultado la amplificación de una o varias dianas de ácido nucleico presentes. También de manera ilustrativa, el ciclo de temperatura cesa antes de la fase de meseta y puede cesar en la fase logarítmica o incluso antes de la fase logarítmica. En un ejemplo, puede ser deseable simplemente enriquecer la muestra con los amplicones deseados, sin alcanzar niveles mínimos de detección (véase la Patente US 6,605,451).

Opcionalmente, la muestra amplificada se diluye a continuación, forzando la mayor parte de la muestra de vuelta al blíster 144 a través del canal 152, dejando sólo una pequeña cantidad (de manera ilustrativa de aproximadamente el 1 al 5 %) de la muestra amplificada en el blíster 161, y se proporciona una mezcla maestra de PCR de segunda etapa desde el blíster 106 de depósito a través del canal 163. La muestra se mezcla meticulosamente de manera ilustrativa desplazándola hacia atrás y hacia adelante entre los blísteres 106 y 161 a través del canal 163. Si se desea, la mezcla de reacción se puede calentar a una temperatura de extensión superior, de manera ilustrativa como mínimo 60 °C, antes de la amplificación de segunda etapa. A continuación, la muestra es forzada a través del canal 165 a una red de blísteres 182 de bajo volumen en el centro de la zona 180 de amplificación de segunda etapa. Cada uno de los diez blísteres 182 de bajo volumen ilustrativos puede contener un par de cebadores diferente, ya sea esencialmente igual a uno de los pares de cebadores en la amplificación de primera etapa, o "anidarse" dentro del par de cebadores de primera etapa para amplificar un amplicón acortado. Los cebadores, hidratados ahora por la muestra, completan la mezcla de amplificación. También se introducen muestras de control positivo y negativo presurizando el contenido de los blísteres 107 y 108 de depósito, respectivamente, forzando la mezcla maestra de PCR o bien sin ADN diana desde el blíster 107 de depósito a través del canal 166, o bien con ADN de control desde el blíster 108 de depósito, a través del canal 167. Tal como se ilustra, existen cinco de los blísteres 183 de control positivo y los blísteres 181 de control negativo, que se pueden multiplexar 2 veces para proporcionar los controles necesarios para diez reacciones de amplificación de segunda etapa diferentes. Se entiende que esta configuración es sólo ilustrativa y que se puede proporcionar cualquier número de blísteres de segunda etapa.

De manera ilustrativa, la mezcla maestra de PCR utilizada para la amplificación de segunda etapa carece de cebadores, pero por lo demás está completa. Sin embargo, una mezcla maestra de PCR "incompleta" también puede carecer de otros componentes de PCR. En un ejemplo, la mezcla maestra de PCR de segunda etapa es sólo agua o tampón, que luego se mezcla con el producto de amplificación de PCR de primera etapa diluido opcionalmente. Esta mezcla se desplaza a los blísteres de reacción de PCR de pequeño volumen, en los que todos los componentes restantes se han proporcionado previamente. Si se desea, todos los componentes restantes se pueden mezclar y aplicar como una única mezcla en los blísteres de reacción de PCR de pequeño volumen. Alternativamente, tal como se ilustra en la figura 5b, cada uno de los componentes se puede aplicar en una región independiente del blíster 182 de reacción de PCR de pequeño volumen. Tal como se muestra en la figura 5b, están presentes cuatro regiones, de manera ilustrativa con dNTP aplicados en la región 182a, cebadores aplicados en 182b, polimerasa aplicada en 182c, y un compuesto de magnesio aplicado en 182d. Al aplicar los componentes por separado y calentar la mezcla de muestra antes de rehidratar los componentes, se pueden minimizar las reacciones inespecíficas. Se entiende que cualquier combinación de componentes se puede aplicar de esta manera, y que este procedimiento de aplicar componentes en una o varias regiones de los blísteres se puede utilizar con la presente invención.

Los canales 165, 166 y 167 que conducen a los blísteres 181, 182 y 183 de reacción de PCR de pequeño volumen se sellan, y una vejiga neumática presiona suavemente la red contra un elemento de calentamiento/enfriamiento, de manera ilustrativa, un elemento Peltier, para el ciclado térmico. Los parámetros de ciclado se pueden establecer independientemente para el ciclado térmico de segunda etapa. De manera ilustrativa, las reacciones se monitorizan enfocando una fuente de excitación, de manera ilustrativa, una luz azul (450 - 490 nm), sobre la red, y formando imágenes de las emisiones fluorescentes resultantes, de manera ilustrativa emisiones fluorescentes por encima de 510 nm.

En el ejemplo anterior, no se comentan las válvulas de pinza. Sin embargo, se entiende que cuando se desea contener una muestra en uno de los blísteres, los accionadores neumáticos situados sobre canales que conducen hacia y desde el blíster particular y desde el mismo se presurizan, creando válvulas de pinza y cerrando los canales. Por el contrario, cuando se desea desplazar una muestra desde uno de los blísteres, el accionador neumático apropiado se despresuriza, permitiendo que la muestra fluya a través del canal.

La bolsa descrita anteriormente en la figura 5 incluye los blísteres 101 a 108 de depósito de reactivo, en las que el usuario inyectó reactivos desde el accesorio 190 en los blísteres 101 a 108 de depósito de reactivo en la porción 117 de película de plástico de la bolsa 110, de manera ilustrativa antes de la inserción de bolsa 110 en el instrumento.

Aunque existen ventajas de la utilización de los blísteres de depósito de reactivo de la figura 5, entre las que se incluyen tener la capacidad de mantener el contenido de los diversos blísteres a diferentes temperaturas, también existen algunas desventajas. Debido a que el operario es responsable de desplazar los reactivos desde el accesorio 190 hasta los blísteres 101 a 108 de depósito, y debido a que esto se realiza a menudo fuera de la máquina y, por tanto, sin válvulas de pinza activadas, los reactivos se pueden fugar ocasionalmente de los blísteres de depósito a los blísteres de trabajo. Los reactivos en los blísteres de depósito quedan expuestos durante la preparación y la carga. Si se presionan, aprietan o incluso golpean ligeramente, los reactivos se pueden fugar a través de los canales disponibles. Si la pérdida de reactivos es sustancial, la reacción puede fallar por completo. Además, durante la operación puede haber cierta variabilidad en la cantidad de reactivo forzado desde los blísteres 101 a 108 de depósito, lo que conduce a resultados inconstantes. La automatización de la introducción de los reactivos en el accesorio 190 y el desplazamiento de los reactivos desde el accesorio 190 hasta los blísteres 101 a 108 de depósito de reactivo resolverá muchos de estos problemas, y está dentro del alcance de la presente invención.

La bolsa 210 de la figura 6 aborda muchos de estos problemas de una manera diferente, mediante la utilización de un enfoque de inyección directa en el que el propio instrumento desplaza los émbolos 268, de manera ilustrativa a través de pistones neumáticos, y fuerza los reactivos a los diversos blísteres de trabajo a medida que se necesitan los reactivos. En lugar de almacenar los reactivos en los blísteres 101 a 108 de depósito de la figura 5, en el ejemplo de la figura 6 los reactivos se introducen en diversas cámaras 292 del accesorio 290 y se mantienen allí hasta que se necesiten. El accionamiento neumático del pistón 268 en el momento apropiado introduce una cantidad medida del reactivo en el blíster de reacción apropiada. Además de abordar muchos de los problemas mencionados anteriormente, la bolsa 210 también tiene una forma mucho más compacta, lo que permite un diseño de instrumento más pequeño, y la bolsa 210 tiene canales más cortos, lo que permite un mejor flujo de fluido y minimiza la pérdida de reactivo en los canales.

En un ejemplo ilustrativo de la figura 6, se inyecta una mezcla de 300 μ l que comprende la muestra que se va a someter a prueba (100 μ l) y tampón de lisis (200 μ l) en el puerto 241a de inyección. También se inyecta agua en el accesorio 290 a través del sello 239b, hidratando hasta once reactivos diferentes, cada uno de los cuales se proporcionó previamente en forma secada en las cámaras 292b a 292i a través del canal 293 (mostrado en la sombra). Estos reactivos pueden incluir, de manera ilustrativa, reactivos de PCR liofilizados, reactivos de extracción de ADN, soluciones de lavado, reactivos de inmunoensayo u otras entidades químicas. Para el ejemplo de la figura 6, los reactivos son para extracción de ácidos nucleicos, PCR múltiplex de primera etapa, dilución de la reacción múltiplex y preparación de reactivos de PCR de segunda etapa y reacciones de control. En el ejemplo de la figura 6, todo lo que es necesario inyectar es la muestra en el puerto 241a y el agua en el puerto 241b.

Tal como se muestra en la figura 6, el agua inyectada a través del sello 293b se distribuye a diversas cámaras a través del canal 293. En este ejemplo, sólo es necesario inyectar la muestra, y agua en la bolsa 210. Sin embargo, se entiende que podría inyectarse agua en cada cámara 292, de manera independiente. Además, se entiende que, en lugar de proporcionar reactivos secados en las diversas cámaras 292 e hidratarlos tras la inyección del agua, podrían inyectarse reactivos húmedos específicos en cada cámara, según se desee. Adicionalmente, se entiende que se podría proporcionar sólo agua a una o varias de las cámaras 292, y los reactivos necesarios se pueden proporcionar secados en los blísteres de reacción apropiadas. Diversas combinaciones de lo anterior, según lo dictado por las necesidades de la reacción particular, están dentro del alcance de esta invención.

Tal como se observa en la figura 6, se proporcionan salientes 213 opcionales en la superficie inferior 297 del accesorio 290. Tal como se muestra, los salientes 213 están ubicados dentro de sus canales 215 de entrada respectivos. Sin embargo, son posibles otras configuraciones. Los salientes 213 ayudan a abrir el canal 215 de entrada e impiden que la superficie inferior 297 se enganche con otra superficie plana, de tal manera que se pincen los canales 215 de entrada cuando se presionan los émbolos 268, lo que ayuda a impedir el contraflujo tras la activación de los émbolos 268. Tales salientes pueden ser utilizados en cualquiera de las diversas bolsas según la presente invención.

Si se inyecta agua en la bolsa para hidratar múltiples reactivos secos en múltiples cámaras en el accesorio, se desea un medio para cerrar el canal entre el puerto de inyección y las diversas cámaras. Si el canal no está cerrado, la activación de cada émbolo puede forzar que parte del contenido de su cámara respectiva vuelva al canal, contaminando potencialmente las cámaras vecinas y alterando los volúmenes contenidos en la cámara y suministrados desde la misma. Se han utilizado varias formas de cerrar este canal, incluida la rotación de un émbolo 268 con muescas, tal como se comentó anteriormente, y el termosellado de la película de plástico a través del canal, cerrando de ese modo el canal permanentemente y aplicando presión al canal como una válvula de pinza. También se pueden utilizar otros cierres, tales como válvulas integradas en el accesorio, de manera ilustrativa válvulas unidireccionales.

Después de que los fluidos se carguen en las cámaras 292 y la bolsa 210 se cargue en el instrumento, el émbolo

268a se presiona, de manera ilustrativa, mediante la activación de un pistón neumático, forzando el resto de la muestra a un blíster 220 de tres lóbulos a través del canal 214. Tal como con los ejemplos de las figuras 1 y 5, los lóbulos 224, 226 y 228 del blíster 220 de tres lóbulos se comprimen secuencialmente mediante vejigas 824, 826 y 828 de acción del conjunto 810 de vejigas, que se muestra en las figuras 7-9, forzando el líquido a través del estrecho nexo 232 entre los lóbulos, e impulsando colisiones a alta velocidad, cizallando la muestra y liberando ácidos nucleicos, incluyendo, de manera ilustrativa, ácidos nucleicos de esporas difíciles de abrir, bacterias y hongos. La lisis celular continúa durante un periodo de tiempo apropiado, de manera ilustrativa de 0,5 a 10 minutos.

Una vez que las células se han lisado adecuadamente, el émbolo 268b se activa y las perlas magnéticas de unión a ácido nucleico almacenadas en la cámara 292b se inyectan a través del canal 236 en el lóbulo superior 228 del blíster 220 de tres lóbulos. La muestra se mezcla con las perlas magnéticas y la mezcla se permite que incube durante un periodo de tiempo apropiado, de manera ilustrativa de aproximadamente 10 segundos a 10 minutos.

La mezcla de la muestra y las perlas se fuerzan a través del canal 238 hacia el blíster 244 mediante la acción de la vejiga 826, a continuación a través del canal 243 y hacia el blíster 246 mediante la acción de la vejiga 844, en la que un imán retráctil 850 ubicado en el instrumento 800 adyacente al blíster 245, que se muestra en la figura 8, captura las perlas magnéticas de la solución, formando un sedimento contra la superficie interior del blíster 246. Una vejiga neumática 846, situada sobre el blíster 246, fuerza el líquido fuera del blíster 246 y de vuelta a través del blíster 244 y al blíster 222, que se utiliza ahora como receptáculo de desechos. Sin embargo, tal como se comentó anteriormente con respecto a la figura 5, otros receptáculos de desechos están dentro del alcance de la presente invención. Uno de los émbolos 268c, 268d y 268e se puede activar para proporcionar una solución de lavado al blíster 244 a través del canal 245 y, a continuación, al blíster 246 a través del canal 243. Opcionalmente, el imán 850 se retrae y las perlas magnéticas se lavan desplazando las perlas hacia atrás y hacia delante desde los blísteres 244 y 246 a través del canal 243, presurizando alternativamente las vejigas 844 y 846. Una vez que se lavan las perlas magnéticas, las perlas magnéticas se vuelven a capturar en el blíster 246 mediante la activación del imán 850, y la solución de lavado se desplaza, a continuación, hasta el blíster 222. Este proceso se puede repetir según sea necesario para lavar el tampón de lisis y los restos de muestra de las perlas magnéticas de unión a ácido nucleico. De manera ilustrativa, se realizan tres lavados, uno con reactivos de lavado en las cámaras 292c, 292d y 292e. Sin embargo, se entiende que más o menos lavados están dentro del alcance de la presente invención. Si se desean más lavados, se pueden proporcionar más cámaras 292. Alternativamente, cada cámara 292 puede contener un mayor volumen de fluido y la activación de los émbolos puede forzar sólo una fracción del volumen de la cámara tras cada activación.

Después del lavado, el tampón de elución almacenado en la cámara 292f se desplaza a través del canal 247 hasta el blíster 248, y el imán se retrae. La solución se cicla entre los blísteres 246 y 248 a través del canal 252, rompiendo el sedimento de perlas magnéticas en el blíster 246 y permitiendo que los ácidos nucleicos capturados se disocien de las perlas y se pongan en solución. El imán 850 se activa una vez más, capturando las perlas magnéticas en el blíster 246, y la solución de ácidos nucleicos eluida se fuerza al blíster 248.

El émbolo 268h se presiona y la mezcla maestra de PCR de primera etapa de la cámara 292h se mezcla con la muestra de ácidos nucleicos en el blíster 248. Opcionalmente, la mezcla se mezcla mediante la activación alternativa de las vejigas 848 y 864, forzando la mezcla entre 248 y 264 a través del canal 253. Después de varios ciclos de mezcla, la solución está contenida en el blíster 264, en el que se realiza la PCR múltiplex de primera etapa. Si se desea, antes de mezclar, la muestra se puede retener en el blíster 246 mientras la mezcla maestra de PCR de primera etapa se precalienta, desplazando, de manera ilustrativa, la mezcla maestra de PCR de primera etapa hasta el blíster 264 o proporcionando un calentador adyacente al blíster 248. Tal como se comentó anteriormente, este precalentamiento puede proporcionar los beneficios de la PCR de arranque en caliente. El instrumento 800 ilustrado en la figura 8 presenta los termocicladores 886 y 888 basados en Peltier que calientan y enfrían la muestra. Sin embargo, se entiende que se pueden utilizar otros dispositivos calentadores/enfriadores, tal como se comentó anteriormente. Opcionalmente, la mezcla entre los blísteres 248 y 264 puede continuar durante el ciclo de temperatura, con el termociclador 886 situado para calentar y enfriar ambos blísteres 248 y 264. Se ha descubierto que tal mezcla puede mejorar la reacción de PCR de primera etapa. Además, el ciclado térmico se puede lograr variando las temperaturas en dos o más blísteres diferentes, lo que permite un gasto de energía mínimo y maximiza la velocidad del ciclado térmico. Por ejemplo, la temperatura se puede mantener a 95 °C en el blíster 248 y a 65 °C en el blíster 264, y al desplazar la muestra entre estos blísteres se transfiere eficazmente calor dentro y fuera de la muestra, lo que permite un ciclado térmico rápido y preciso. El ciclado de temperatura se realiza de manera ilustrativa durante 15-20 ciclos, aunque pueden ser deseables otros niveles de amplificación, dependiendo de la aplicación, tal como se comentó anteriormente. Tal como se observará a continuación, la zona 280 de amplificación de segunda etapa está configurada para detectar la amplificación en 18 reacciones de segunda etapa. Por consiguiente, se pueden incluir 18 pares de cebadores diferentes en la reacción de PCR en el blíster 264.

En un procedimiento de arranque en caliente alternativo, la bolsa 210 se fabrica con los cebadores proporcionados en uno de los blísteres, de manera ilustrativa, el blíster 264. En un ejemplo, los cebadores se liofilizan por separado y a continuación, se introducen durante la fabricación en el blíster 264 como un sedimento friable. Antes de la PCR de primera etapa, de manera ilustrativa, la muestra se eluye del blíster 246 y se empuja al blíster 264 para rehidratar el sedimento de cebador. El elemento 886 Peltier, que se sitúa junto a los blísteres 248 y 264, se calienta a 48 °C, y

la mezcla maestra de PCR se empuja al blíster 248. Después de un mantenimiento, de manera ilustrativa, durante 10 segundos, durante el cual los dos blísteres alcanzan los 48 °C, comienza la mezcla entre los blísteres 248 y 264. Por tanto, las enzimas y los dNTP permanecen en el blíster 248 y la mayor parte de la muestra y los cebadores permanecen en el blíster 264 hasta que los componentes por separado hayan alcanzado los 48 °C. Sin embargo, se entiende que la elección de 48 °C se hizo para su utilización con amplificación de primera etapa y RT simultáneas utilizando VMA, que está activo hasta los 50 °C. Si no se necesita RT o se utiliza una enzima RT más termoestable, entonces una o los dos blísteres 248 y 264 se pueden calentar hasta 58 °C, o incluso más, dependiendo de la temperatura de fusión del cebador u otros factores en un protocolo de amplificación de primera etapa en particular. Se entiende que este procedimiento de arranque en caliente se puede utilizar con cualquier ejemplo de la presente invención.

En un ejemplo alternativo, para reducir la complejidad de la reacción de PCR de primera etapa, el blíster 248 se puede dividir en dos o más blísteres. Se cree que el número de productos inespecíficos de una reacción múltiple aumenta a medida que lo hace el cuadrado (o posiblemente una potencia superior) del número de cebadores en la mezcla, mientras que la pérdida de sensibilidad de un ensayo es una función lineal de la cantidad de muestra introducida. Así, por ejemplo, dividir la PCR de primera etapa en dos reacciones, cada una de la mitad del volumen de la reacción individual, reduciría la sensibilidad a la mitad, pero la cantidad y la complejidad de las reacciones inespecíficas sería 1/4. Si el blíster 248 se divide en dos o más blísteres, el blíster 264 se puede dividir en un número de blísteres igual al número de blísteres 248. Cada blíster 248 respectivo se conectaría a su blíster 264 respectivo a través de un canal 253 respectivo. Cada blíster 264 estaría dotado de un sedimento que comprende un subconjunto de todos los cebadores. La muestra del blíster 246 se dividiría entre cada blíster 248, cada blíster 248 se sellaría de todas las demás, y el ciclado térmico continuaría con cada par de blísteres 248 y 264, tal como se describió anteriormente. Después del ciclado térmico, la muestra se recombinaría en un blíster 266 o se enviaría individualmente a conjuntos independientes de blísteres de segunda etapa.

Después de que la PCR de primera etapa haya continuado durante el número deseado de ciclos, la muestra se puede diluir, tal como se comentó anteriormente, con respecto al ejemplo de la figura 5, forzando la mayor parte de la muestra de vuelta al blíster 248, dejando sólo una pequeña cantidad y añadiendo mezcla maestra de PCR de segunda etapa de la cámara 292i. Alternativamente, un tampón de dilución de 292i se puede desplazar hasta el blíster 266 a través del canal 249 y, a continuación, mezclarse con la muestra amplificada en el blíster 264 desplazando los fluidos hacia atrás y hacia adelante entre los blísteres 264 y 266. Después de mezclar, una porción de la muestra diluida que queda en el blíster 264 es forzada a alejarse al blíster 222 de tres lóbulos, ahora el receptáculo de desechos. Si se desea, la dilución se puede repetir varias veces, utilizando el tampón de dilución de las cámaras 292j y 292k y, a continuación, añadiendo la mezcla maestra de PCR de segunda etapa de la cámara 292g a una parte o a toda la muestra amplificada diluida. Se entiende que el nivel de dilución se puede ajustar alterando el número de etapas de dilución o alterando el porcentaje de la muestra desechada antes de mezclar con el tampón de dilución o la mezcla maestra de PCR de segunda etapa. Si se desea, esta mezcla de la muestra y la mezcla maestra de PCR de segunda etapa se puede precalentar en el blíster 264 antes del desplazamiento a los blísteres 282 de segunda etapa para la amplificación de segunda etapa. Tal como se comentó anteriormente, tal precalentamiento puede obviar la necesidad de un componente de arranque en caliente (anticuerpo, producto químico u otro) en la mezcla de PCR de segunda etapa.

La mezcla maestra de PCR de segunda etapa ilustrativa es incompleta, careciendo de pares de cebadores, y cada uno de los 18 blísteres 282 de segunda etapa está precargada con un par de cebadores de PCR específicos. Si se desea, la mezcla maestra de PCR de segunda etapa puede carecer de otros componentes de reacción, y estos componentes se pueden precargar también en los blísteres 282 de segunda etapa. Tal como se comentó anteriormente con los ejemplos anteriores, cada par de cebadores puede ser idéntico a un par de cebadores de PCR de primera etapa o puede anidarse dentro del par de cebadores de primera etapa. El desplazamiento de la muestra desde el blíster 264 hasta los blísteres de segunda etapa completa la mezcla de reacción de PCR. Las muestras de control de la cámara 2921 también se desplazan hasta los blísteres 283 de control a través del canal 267. Las muestras de control pueden ser controles positivos o negativos, según se desee. De manera ilustrativa, cada bolsa contendría reacciones de control que validan el funcionamiento de cada etapa en el proceso y demuestran que los resultados positivos no son el resultado de autocontaminación con ácidos nucleicos amplificados previamente. Sin embargo, esto no es práctico en muchos protocolos, particularmente para una reacción altamente multiplexada. Una forma ilustrativa de proporcionar controles adecuados implica añadir a las muestras de manera conocida una especie como la levadura de panadería. Los ácidos nucleicos se extraen de la levadura, junto con otros ácidos nucleicos. Las reacciones de PCR de primera y segunda etapa amplifican las dianas de ADN y/o ARN del genoma de la levadura. De manera ilustrativa, una secuencia de ARNm derivada de un pre-ARNm sometido a corte y empalme se puede utilizar para generar una secuencia diana específica de ARN mediante la disposición de las secuencias de cebador para abarcar un intrón. Un análisis cuantitativo del número de copias de levadura frente a patrones de referencia permite una validación sustancial de que cada componente del sistema está funcionando. Las reacciones de control negativo para cada uno de los muchos ensayos de segunda etapa son más problemáticas. Puede ser deseable ejecutar reacciones de control en paralelo o en una ejecución independiente.

La activación de la vejiga 882 del conjunto 810 de vejigas sella las muestras en sus blísteres 282, 283 de segunda

etapa respectivos y la activación de la vejiga 880 proporciona una presión suave sobre los blísteres 282, 283 de segunda etapa para forzar el contacto de los blísteres 282, 283 de segunda etapa con un dispositivo calentador/enfriador. Una ventana 847 situada sobre la zona 280 de amplificación de segunda etapa permite la monitorización de fluorescencia de la red durante la PCR y durante un análisis de curvas de fusión de ADN de los productos de reacción.

Cabe destacar que la bolsa 210 de la figura 6 tiene varias áreas no selladas, tales como el área 255 no sellada y el área 256 no sellada. Estas áreas no selladas forman blísteres que no participan en ninguna de las reacciones en este ejemplo ilustrativo. Más bien, estas áreas no selladas se proporcionan en el espacio entre los blísteres y los canales de trabajo. En algunos procesos de fabricación, en comparación con las bolsas que están selladas en todo el espacio no utilizado, se ha descubierto que a veces obtienen como resultado menos fugas cuando se proporcionan áreas no selladas tales como 255 y 256, supuestamente al reducir las arrugas problemáticas en el material de la película. Tales áreas no selladas se pueden proporcionar, opcionalmente en cualquier bolsa, por ejemplo.

La figura 8 muestra un aparato 800 ilustrativo que podría utilizarse con la bolsa 210. El instrumento 800 incluye un elemento 802 de soporte que podría formar una pared de una carcasa o montarse dentro de una carcasa. El instrumento 800 también incluye un segundo elemento 804 de soporte que es opcionalmente móvil con respecto al elemento 802 de soporte, para permitir la inserción y extracción de la bolsa 210. El elemento 804 de soporte móvil se puede montar en una pista o se puede desplazar con respecto al elemento 802 de soporte de cualquiera de una variedad de modos. De manera ilustrativa, una tapa 805 se ajusta sobre la bolsa 210 una vez que la bolsa 210 ha sido insertada en el instrumento 800. Alternativamente, ambos elementos 802 y 804 de soporte se pueden fijar, con la bolsa 210 mantenida en su lugar mediante otros medios mecánicos o mediante presión neumática.

De manera ilustrativa, el conjunto 810 de vejigas y el conjunto 808 de válvulas neumáticas se montan en el elemento móvil 802, mientras que los calentadores 886 y 888 se montan en el elemento 802 de soporte. Sin embargo, se entiende que esta disposición es sólo ilustrativa y que otras disposiciones son posibles. Como el conjunto 810 de vejigas y el conjunto 808 de válvulas neumáticas se montan en el elemento 804 de soporte móvil, estos accionadores neumáticos se pueden desplazar hacia la bolsa 210, de modo que los accionadores neumáticos se ponen en contacto con la bolsa 210. Cuando la bolsa 210 se inserta en el instrumento 800 y el elemento 804 de soporte se desplaza hacia el elemento 802 de soporte, los diversos blísteres de la bolsa 210 están en una posición adyacente a las diversas vejigas neumáticas del conjunto 810 de vejigas y los diversos pistones neumáticos del conjunto 808 de válvulas neumáticas, de tal manera que la activación de los accionadores neumáticos puede forzar el líquido de uno o varios blísteres de la bolsa 210 o puede formar válvulas de pinza con uno o varios canales de la bolsa 210. A continuación, se comentan con más detalle la relación entre los blísteres y los canales de la bolsa 210 y los accionadores neumáticos del conjunto 810 de vejigas y el conjunto 808 de válvulas neumáticas con respecto a las figuras 9 y 10.

Cada accionador neumático tiene uno o varios conectores neumáticos. Por ejemplo, la vejiga 824 del conjunto 810 de vejigas tiene un conector neumático 824a y el pistón neumático 843 tiene su conector neumático 843a asociado. En este ejemplo, cada uno de los conectores neumáticos del conjunto 810 de vejigas se extiende a través de un pasaje 816 en el elemento 804 de soporte móvil, en el que una manguera 878 conecta cada conector neumático a la fuente 895 de aire comprimido a través de las válvulas 899. En este ejemplo, los pasajes 816 no sólo proporcionan acceso a la fuente 895 de aire comprimido, sino que los pasajes también ayudan a alinear los diversos componentes del conjunto 810 de vejigas, de modo que las vejigas se alineen correctamente con los blísteres de la bolsa 210.

De manera similar, el conjunto 808 de válvulas neumáticas también se monta en el elemento 804 de soporte móvil, aunque se entiende que son posibles otras configuraciones. En el ejemplo ilustrativo, los pasadores 858 en el conjunto 808 de válvulas neumáticas se montan en las aberturas 859 de montaje en el elemento 804 de soporte móvil, y los pistones neumáticos 843, 852, 853 y 862 se extienden a través de los pasajes 816 en el elemento 804 de soporte móvil, para entrar en contacto con la bolsa 210. Tal como se ilustra, el conjunto de vejigas se monta en un primer lado 811 del elemento 804 de soporte móvil mientras que el conjunto 808 de válvulas neumáticas se monta en un segundo lado 812 del elemento 804 de soporte móvil. Sin embargo, debido a que los pistones neumáticos 843, 852, 853 y 862 se extienden a través de pasajes 816, los pistones neumáticos del conjunto 808 de válvulas neumáticas y las vejigas neumáticas del conjunto 810 de vejigas actúan conjuntamente para proporcionar los accionadores neumáticos necesarios para la bolsa 210.

Tal como se comentó anteriormente, cada uno de los accionadores neumáticos del conjunto 810 de vejigas y el conjunto 808 de válvulas neumáticas tiene un conector neumático asociado. Aunque sólo se muestran varias mangueras 878 en la figura 8, se entiende que cada conector neumático se conecta a través de una manguera 878 a la fuente 895 de gas comprimido. La fuente 895 de gas comprimido puede ser un compresor, o, alternativamente, la fuente 895 de gas comprimido puede ser un cilindro de gas comprimido, como un cilindro de dióxido de carbono. Los cilindros de gas comprimido son particularmente útiles si se desea la portabilidad. Otras fuentes de gas comprimido están dentro del alcance de esta invención.

Otros diversos componentes del instrumento 810 también se conectan a la fuente 895 de gas comprimido. El imán

850, que se monta en un primer lado 813 del elemento 802 de soporte, se despliega y retrae utilizando, de manera ilustrativa, gas de la fuente 895 de gas comprimido a través de la manguera 878, aunque otros procedimientos de imán móvil 850 son conocidos en la técnica. El imán 850 descansa en el rebaje 851 en el elemento 802 de soporte. Se entiende que el rebaje 851 puede ser un pasaje a través del elemento 802 de soporte, de modo que el imán 850 puede entrar en contacto con el blíster 246 de la bolsa 210. Sin embargo, dependiendo del material del elemento 802 de soporte, se entiende que no es necesario que el rebaje 851 se extienda por completo a través del elemento 802 de soporte, siempre que cuando se despliegue el imán 850, el imán 850 esté lo suficientemente cerca como para proporcionar un campo magnético suficiente en el blíster 246, y cuando el imán 850 se retrae, el imán 850 no afecta significativamente a ninguna perla magnética presente en el blíster 246. Aunque se hace referencia al imán retráctil 850, se entiende que se puede utilizar un electroimán y el electroimán se puede activar e inactivar controlando el flujo de electricidad a través del electroimán. Por tanto, mientras la presente memoria descriptiva comenta cómo retirar o retraer el imán, se entiende que estos términos son lo suficientemente amplios como para incorporar otras formas de retirar el campo magnético. Se entiende que las conexiones neumáticas pueden ser mangueras neumáticas o colectores de aire neumáticos, reduciendo así el número de mangueras o válvulas requeridas.

Los diversos pistones neumáticos 868 de la red 869 de pistones neumáticos, que se monta en el soporte 802, también se conectan a la fuente 895 de gas comprimido a través de las mangueras 878. Aunque sólo se muestran dos mangueras 878 conectando los pistones neumáticos 868 a la fuente 895 de gas comprimido, se entiende que cada uno de los pistones neumáticos 868 se conecta a la fuente 895 de gas comprimido. Se muestran doce pistones neumáticos 868. Cuando la bolsa 210 se inserta en el instrumento 800, los doce pistones neumáticos 868 se sitúan para activar sus doce émbolos 268 respectivos de la bolsa 210. Cuando la tapa 805 se cierra sobre la bolsa 210, un reborde 806 en la tapa 805 proporciona un soporte para el accesorio 290, de modo que a medida que se activan los pistones neumáticos 868, la tapa 805 mantiene el accesorio 290 en su lugar. Se entiende que otros soportes para el accesorio 290 están dentro del alcance de la presente invención.

Un par de dispositivos de calentamiento/enfriamiento, de manera ilustrativa, calentadores Peltier, se montan en un segundo lado 814 del soporte 802. El calentador 886 de primera etapa se sitúa para calentar y enfriar el contenido del blíster 264 para la PCR de primera etapa. El calentador 888 de segunda etapa se sitúa para calentar y enfriar el contenido de los blísteres 282 y 283 de segunda etapa de la bolsa 210, para la PCR de segunda etapa. Sin embargo, se entiende que estos calentadores también podrían utilizarse para otros fines de calentamiento, y que se pueden incluir otros calentadores, según sea apropiado para la aplicación particular.

Si se desea, se puede incluir un mecanismo de retroalimentación (no mostrado) en el instrumento 800 para proporcionar retroalimentación con respecto a si la muestra se ha forzado realmente a un blíster particular. Entre los mecanismos de retroalimentación ilustrativos se incluyen sensores de temperatura o presión o detectores ópticos, particularmente si se incluye un colorante fluorescente o coloreado. Tales mecanismos de retroalimentación se pueden montar, de manera ilustrativa, en cualquiera de los elementos 802 u 804 de soporte. Por ejemplo, se puede montar un sensor de presión en el soporte 802 adyacente a la ubicación del blíster 264. Cuando la muestra se desplaza supuestamente hasta el blíster 264, si se presiona el sensor de presión, entonces se permite que continúe el procesamiento de la muestra. Sin embargo, si el sensor de presión no está presionado, entonces el procesamiento de la muestra se puede detener, o puede aparecer un mensaje de error en la pantalla 892. Cualquier combinación o todos los blísteres pueden tener mecanismos de retroalimentación para proporcionar retroalimentación con respecto al desplazamiento apropiado de la muestra a través de la bolsa.

Cuando se desea la detección de fluorescencia, se puede proporcionar una red óptica 890. Tal como se muestra en la figura 8, la red óptica 890 incluye una fuente luminosa 898, de manera ilustrativa, una fuente de luz LED filtrada, luz blanca filtrada o iluminación láser, y una cámara 896. Una ventana 847 a través del soporte móvil 804 proporciona a la red óptica 890 acceso a zona 280 de amplificación de segunda etapa de la bolsa 210. La cámara 896 tiene, de manera ilustrativa, una serie de fotodetectores que corresponden, cada uno, a un blíster 282, 283 de segunda etapa, en la bolsa 210. Alternativamente, la cámara 896 puede tomar imágenes que contienen todos los blísteres 282, 283 de segunda etapa y la imagen se puede dividir en campos independientes correspondientes a cada uno de los blísteres 282, 283 de segunda etapa. Dependiendo de la configuración, la red óptica 890 puede ser estacionaria, o la red óptica 890 se puede colocar en máquinas motrices conectadas a uno o varios motores y desplazarse para obtener señales de cada blíster de segunda etapa individual 282, 283. Se entiende que son posibles otras disposiciones.

Tal como se muestra, un ordenador 894 controla las válvulas 899 de la fuente 895 de aire comprimido y, por tanto, controla todos los elementos neumáticos del instrumento 800. El ordenador 894 también controla los calentadores 886 y 888 y la red óptica 890. Cada uno de estos componentes se conecta eléctricamente, de manera ilustrativa, a través de cables 891, aunque otras conexiones físicas o inalámbricas están dentro del alcance de la presente invención. Se entiende que el ordenador 894 puede estar alojado dentro del instrumento 890 o puede ser externo al instrumento 890. Además, el ordenador 894 puede incluir placas de circuito incorporadas que controlan algunos o todos los componentes, y también puede incluir un ordenador externo, tal como un ordenador de escritorio o portátil, para recibir y mostrar datos de la red óptica. Puede proporcionarse una interfaz 893, de manera ilustrativa, una interfaz de teclado, que incluye teclas para introducir información y variables tales como temperaturas, tiempos de

ciclo, etc. De manera ilustrativa, también se proporciona una pantalla 892. La pantalla 892 puede ser una pantalla LED, LCD u otra, por ejemplo.

5 La figura 9 muestra la relación entre el conjunto 810 de vejigas y la bolsa 210 durante el funcionamiento del instrumento 800. El conjunto de vejigas comprende subconjuntos 815, 817, 818, 819 y 822. Debido a que la vejiga 809 del subconjunto 815 de vejigas es grande, el subconjunto 815 de vejigas tiene, de manera ilustrativa, dos conectores neumáticos 815a y 815b. La vejiga 809 se utiliza para cerrar las cámaras 292 (tal como se muestra en la figura 6) de la porción 217 de película de plástico de la bolsa 210. Cuando se presiona uno de los émbolos 268, uno o ambos conectores neumáticos 815a y 815b permiten que la vejiga 809 se desinflen. Después de que el fluido de una de las cámaras 292 pase, la vejiga 809 se vuelve a presurizar, sellando los canales 214, 236, 245, 247 y 249. Mientras que el subconjunto 815 de vejigas ilustrativo tiene sólo una vejiga 809, se entiende que son posibles otras configuraciones, de manera ilustrativa, en las que cada uno de los canales 214, 236, 245, 247 y 249 tiene su propia vejiga o pistón neumático asociado. El subconjunto 822 de vejigas comprende, de manera ilustrativa, tres vejigas 824, 826 y 828. Tal como se comentó anteriormente, las vejigas 824, 824 y 828 impulsan el blíster 222 de tres lóbulos para la lisis celular. Tal como se ilustra, las vejigas 824, 826 y 828 son ligeramente más grandes que sus blísteres 224, 226, 228 correspondientes. Se ha descubierto que, al inflarse, la superficie de las vejigas se puede volver de cierta forma de cúpula, y la utilización de vejigas sobredimensionadas ligeramente permite un buen contacto por toda la superficie del blíster correspondiente, permitiendo una presión más uniforme y una mejor evacuación del blíster. Sin embargo, en algunas circunstancias, se puede desear o no la evacuación completa de los blísteres individuales, y se pueden utilizar vejigas más grandes o más pequeñas para controlar el volumen del blíster evacuado. El subconjunto 817 de vejigas tiene cuatro vejigas. La vejiga 836 funciona como una válvula de pinza para el canal 236, mientras que las vejigas 844, 848 y 866 están configuradas para proporcionar presión sobre los blísteres 244, 248 y 266, respectivamente. El subconjunto 818 de vejigas tiene dos vejigas 846 y 864, que están configuradas para proporcionar presión sobre los blísteres 246 y 264, respectivamente. Finalmente, el subconjunto 819 de vejigas controla la zona 280 de amplificación de segunda etapa. La vejiga 865 actúa como una válvula de pinza para los canales 265 y 267, mientras que la vejiga 882 proporciona una presión suave sobre los blísteres 282 y 283 de segunda etapa, para forzar los blísteres de segunda etapa a un contacto cercano con el calentador 888. Aunque el conjunto 810 de vejigas está dotado de cinco subconjuntos, se entiende que esta configuración es sólo ilustrativa y que podría utilizarse cualquier número de subconjuntos o que el conjunto 810 de vejigas podría proporcionarse como un único conjunto integral.

La figura 10 muestra, de manera similar, la relación entre el conjunto 808 de válvulas neumáticas y la bolsa 210 durante el funcionamiento del instrumento 800. En lugar de vejigas, el conjunto 808 de válvulas neumáticas tiene cuatro pistones neumáticos 842, 852, 853 y 862. Estos pistones neumáticos 842, 852, 853 y 862, cada uno impulsado por aire comprimido, proporcionan presión dirigida sobre los canales 242, 252, 253 y 262. Debido a que los pistones son de diámetro bastante estrecho, pueden caber entre el subconjunto 817 de vejigas y el subconjunto 818 de vejigas para proporcionar válvulas de pinza para los canales 242, 252, 253 y 262, lo que permite que los canales 242, 252, 253 y 262 sean bastante cortos. Sin embargo, si se desea, los pistones neumáticos 842, 852, 853 y 862 podrían reemplazarse por vejigas, que se pueden incluir en el conjunto 810 de vejigas, obviando la necesidad del conjunto 808 de válvulas neumáticas. Se entiende que cualquier combinación de vejigas y pistones neumáticos están dentro del alcance de la presente invención. También se entiende que otros procedimientos para proporcionar presión sobre los canales y los blísteres de la bolsa 210, tal como se conocen en la técnica, están dentro del alcance de la presente invención.

45 La figura 15 muestra una bolsa 510 que es similar a la bolsa 210 de la figura 6. El accesorio 590, con los canales 515a a 515i de entrada, es similar al accesorio 290, con los canales 215a a 215i de entrada. Los blísteres 544, 546, 548, 564 y 566, con sus canales 538, 543, 552, 553, 562 y 565 respectivos son similares a los blísteres 244, 246, 248, 264 y 266, con sus canales 238, 243, 252, 253, 262 y 265 respectivos de la bolsa 210. Los canales 245, 247 y 249 de la bolsa 210 se han reconfigurado de cierta manera como canales 545a-c, 547a-b y 548a-c en la bolsa 510; los canales respectivos de 510 son algo más cortos que sus canales equivalentes en la bolsa 210. Sin embargo, se entiende que las configuraciones de canal son sólo ilustrativas, y que diversas configuraciones de canal están dentro del alcance de la presente invención.

55 Existen dos diferencias principales entre la bolsa 510 de la figura 15 y la bolsa 210 de la figura 6. En primer lugar, el blíster 222 de tres lóbulos se ha reemplazado por el blíster 522 de lisis. El blíster 522 de lisis está configurado para agitación en vórtex mediante impacto utilizando palas rotatorias o paletas 21 unidas al motor eléctrico 19, tal como se muestra en la figura 2b. Dado que este procedimiento de lisis no se basa en la presión alterna de los pistones neumáticos, sólo se muestra un blíster de un único lóbulo. Debido a que el blíster 522 de lisis sólo tiene un único lóbulo, ambos canales 514 y 536 conducen al único lóbulo del blíster 522 de lisis. Se entiende que el blíster 522 de lisis se puede utilizar en cualquiera de las realizaciones de bolsa descritas en el presente documento. Se entiende, además, que el conjunto 810 de lisis se puede modificar, de manera ilustrativa, para reemplazar las vejigas 824, 826 y 828 del subconjunto 822 de vejigas por una única vejiga configurada para el blíster 522. A la inversa, un blíster de tres lóbulos, tal como se describió anteriormente, puede ser utilizado en la bolsa 510. El blíster 522 de lisis puede estar dotado de un parche 523 de refuerzo opcional, unido de manera ilustrativa utilizando adhesivo o laminación a la superficie exterior del blíster 522 de lisis. El parche 523 de refuerzo ayuda a minimizar el desgarro de la bolsa 510 debido al contacto repetido por las paletas 21. La figura 15a muestra un motor eléctrico, de manera ilustrativa, un

motor de CC RC-280SA-2865 de Mabuchi (Chiba, Japón), montado en el segundo elemento 804 de soporte. En un ejemplo ilustrativo, el motor se hace girar a 5.000 a 25.000 rpm, de manera más ilustrativa 10.000 a 20.000 rpm, y de manera todavía más ilustrativa aproximadamente de 15.000 a 18.000 rpm. Para el motor de Mabuchi, se ha descubierto que 7,2 V proporciona suficientes rpm para la lisis. Sin embargo, se entiende que la velocidad real puede ser algo más lenta cuando las palas 21 están impactando contra la bolsa 510. Se pueden utilizar otras tensiones y velocidades para la lisis dependiendo del motor y las paletas utilizadas. Opcionalmente, se pueden proporcionar pequeños volúmenes controlados de aire en la vejiga adyacente al blíster 522 de lisis. Se ha descubierto que en algunos ejemplos, llenar parcialmente la vejiga adyacente con uno o varios pequeños volúmenes de aire ayuda a situar y soportar el blíster de lisis durante el proceso de lisis. Alternativamente, se puede utilizar otra estructura, de manera ilustrativa una junta de estanqueidad rígida o flexible u otra estructura de retención alrededor del blíster 522 de lisis, para restringir la bolsa 510 durante la lisis.

La segunda diferencia principal entre la bolsa 510 de la figura 15 y la bolsa 210 de la figura 6 es que los blísteres 281, 282 y 283 de la zona 280 de amplificación de segunda etapa se han reemplazado por la red 581 de alta densidad en la zona 580 de amplificación de segunda etapa. El conjunto 581 de alta densidad comprende una serie de pocillos 582 de segunda etapa, de manera ilustrativa 50 pocillos o más, e incluso de manera más ilustrativa 120 pocillos o más. Los ejemplos con más pocillos 582 de segunda etapa, de manera ilustrativa, aproximadamente 200, aproximadamente 400, o incluso aproximadamente 500 o más están dentro del alcance de la presente invención. Otras configuraciones también están dentro del alcance de la presente invención. Se pueden añadir pocillos 582 de segunda etapa adicionales haciendo más pequeños los pocillos 582, haciendo más grande la red 581 de alta densidad, o una combinación de los mismos. Para la PCR de segunda etapa, cada uno de los pocillos puede contener un par de cebadores. Se entiende que uno o varios pocillos se pueden utilizar para controles positivos o negativos.

La contaminación cruzada entre pocillos a medida que los pocillos se llenan con el producto de amplificación de primera etapa diluido en el blíster 566 puede ser un problema importante. La contaminación cruzada se controló en la bolsa 210 llenando cada blíster de segunda etapa a través de un ramal independiente del canal 265 y, a continuación, sellando con la vejiga 882, ilustrada en la figura 9. Con la red 581 de alta densidad, en la que el fluido puede llenar una parte o la totalidad del blíster 584, la contaminación cruzada entre pocillos también debe ser controlada. Los cebadores de PCR de segunda etapa se pueden unir de manera covalente o no covalente a la superficie interior de cada pocillo, por lo que funcionan de manera muy similar a un chip de PCR. Sin embargo, en muchos ejemplos es deseable controlar la contaminación cruzada entre pocillos sin anclar los cebadores de PCR a los pocillos. El control de la contaminación cruzada entre pocillos puede ser difícil en un ejemplo en el que el fluido procedente del blíster 566 se desplaza hasta los pocillos 582 fluyendo a través de una primera superficie 581a de la red 581 de alta densidad.

Existen diversas características deseables para la carga satisfactoria de la zona 580 de amplificación de segunda etapa. En primer lugar, es deseable que el fluido entrante desde el blíster 566 llene sustancialmente todos los pocillos 582 hasta sustancialmente el mismo nivel. Un pocillo sin llenar produciría una señal de falso negativo. En segundo lugar, es deseable que el proceso de llenado de los pocillos 582 no provoque la fuga de los cebadores fuera del pocillo. La pérdida de cebadores de un pocillo puede limitar la eficiencia de la reacción de PCR en ese pocillo y puede contaminar los pocillos vecinos. En tercer lugar, después de que los pocillos 582 se hayan llenado y se haya iniciado la PCR, es deseable que los pocillos estén sellados por completo entre sí. La fuga de amplicón fuera de un pocillo a otro pocillo puede disminuir la señal en el primer pocillo y aumentar la señal en el segundo pocillo, lo que puede generar un falso negativo en el primer pocillo y un falso positivo en el segundo pocillo. Además, para ciertos tipos de controles, es importante que el amplicón generado en un pocillo no entre en otro pocillo donde pueda amplificarse adicionalmente.

Las soluciones a este problema incluyen la utilización de una capa de barrera. En un ejemplo, la capa de barrera es una barrera física que se proporciona para permitir una carga rápida de los pocillos y un sellado rápido del fluido a granel. En otro ejemplo, se utilizan barreras químicas y físicas combinadas, en las que la barrera física se utiliza para sellar los pocillos y, a continuación, la barrera química libera de manera condicionada los cebadores de oligonucleótido en la solución del pocillo, por ejemplo mediante calentamiento, liberación lenta o digestión enzimática. La profundidad del pocillo o la longitud del canal hasta cada pocillo también se pueden utilizar para controlar la liberación de los reactivos desde los pocillos. Son posibles otros medios para cargar la red 581 de alta densidad.

Las figuras 15-17 muestran una realización ilustrativa de segunda etapa 580 que utiliza una barrera física. Intercalada entre la primera capa 518 y la segunda capa 519 de la bolsa 510 está la red 581 de alta densidad, con los pocillos 582. Tal como se observa de la mejor manera en la figura 16, la capa perforada 585, con perforaciones 586, se proporciona en un lado de la red 581 de alta densidad para actuar como la barrera física, y una segunda capa 587, se proporciona en el lado opuesto de la red 581 de alta densidad para formar la parte inferior de los pocillos 582. De manera ilustrativa, la capa perforada 585 y la segunda capa 587 son películas de plástico que se han sellado a una red 581 de alta densidad, de manera ilustrativa mediante termosellado, aunque se entiende que se pueden emplear otros procedimientos de sellado. También se entiende que el material utilizado para la red 581 de alta densidad y el material utilizado para la capa perforada 585 y la segunda capa 587 deben ser compatibles

entre sí, con el procedimiento de sellado y con la química que se utiliza. Cuando se utiliza para PCR, los ejemplos de plásticos compatibles que se pueden utilizar para la red 581 de alta densidad y se pueden termosellar son PE, PP, Monprene® y otros elastómeros de copolímero de bloque. Si se utilizan colorantes fluorescentes en la química de detección, puede ser deseable que la red 581 de alta densidad se forme a partir de materiales negros u otros materiales opacos de manera relativamente fluorescente, para minimizar la fuga de señal de un pocillo 582 a sus pocillos vecinos y, como mínimo, una de las capas 585 y 587 sea transparente de manera relativamente fluorescente. Para la capa perforada 585 y la segunda capa 587, se pueden utilizar materiales laminados de un plástico de ingeniería resistente tal como Mylar® o PET con capas de plástico termosellable tal como PE, PP y Surlyn® de Dupont. Para sistemas basados en adhesivos, se pueden utilizar plásticos de ingeniería rígidos tales como PET o policarbonato para formar una red 581 de alta densidad y, a continuación, se utilizan películas de plásticos compatibles con PCR como la capa perforada 585 y la segunda capa 587. En un ejemplo ilustrativo, la red 581 de alta densidad está formada por PE negro, se utiliza un material compuesto de polietileno/material laminado de PET (o material de bolsa de laminación en caliente Xerox® PN 104702) para la capa perforada 585 y la segunda capa 587 que se termosellan al conjunto 581 de alta densidad, y el polipropileno compuesto/PET es utilizado para las capas primera y segunda 518, 519 de la bolsa 510.

Se entiende que las perforaciones 586 se alinean con los pocillos 582. También se entiende que las perforaciones 586 son lo suficientemente pequeñas como para que, en ausencia de una fuerza de vacío, no fluya fluido fácilmente a través de las perforaciones 586. Las perforaciones ilustrativas pueden ser de 0,001-0,1 mm, de manera más ilustrativa 0,005-0,02 mm, y de manera más ilustrativa aproximadamente de 0,01 mm. La zona 580 de amplificación de segunda etapa se proporciona al vacío, de modo que cuando se recibe fluido desde el blíster 566, el vacío introduce el fluido a través de perforaciones 586 en cada pocillo 582. Una vez que se llenan los pocillos 582, ya no está presente una fuerza para forzar el fluido hacia dentro o hacia fuera de los pocillos 582. A continuación, una vejiga adyacente a la zona 580 de amplificación de segunda etapa (no mostrada, pero de posición similar a las vejigas 880/882) se puede activar para presionar la primera capa 518 contra la red 581 de alta densidad y sellar el fluido en los pocillos 582. Aunque la primera capa 518 de la bolsa 510 se utiliza para sellar los pocillos 582, se entiende que se puede proporcionar una capa de sellado opcional entre la capa perforada 585 y la primera capa 518.

En un ejemplo ilustrativo, la zona 580 de amplificación de segunda etapa se puede preparar tal como sigue. La red 581 de alta densidad se puede preparar, en primer lugar, mediante punzonado, moldeo o formando de otro modo una red de pocillos 582 en una lámina de plástico (de manera ilustrativa de 0,1 a 1 mm de grosor). Los pocillos pueden formar cualquier red regular o irregular que se desee, y pueden tener un volumen, de manera ilustrativa, de 0,05 µl a 20 µl, y de manera más ilustrativa de 0,1 µl a 4 µl. Una de las capas 585 o 587 se lamina, a continuación, a una primera superficie 581a del conjunto 581 de alta densidad, de manera ilustrativa, mediante calor o adhesivo. Tal como se muestra en la figura 17, la capa perforada 585 se aplica a la primera superficie 581a. Los reactivos 589, de manera ilustrativa elementos de la química de la red que son únicos, tales como los pares de cebadores de PCR, se aplican, a continuación, en los pocillos o bien de manera manual por pipeteo o bien de manera automática (utilizando de manera ilustrativa aplicadores posicionables x/y tales como aplicadores de pasador, impresoras de matriz de puntos, pipetas automáticas de pequeño volumen o aplicadores de microcontacto microfluídicos). Después de que los reactivos 589 se hayan secado en cada pocillo 582, la segunda de las capas 585 o 587 se aplica a la segunda superficie 581b de la red 581. La capa 585 se perfora utilizando una red de agujas de pequeño diámetro para formar perforaciones 586. Las perforaciones 586 pueden formarse antes o después de que la capa 585 se haya fijado a la red 581. Se entiende que la aplicación se puede realizar en cualquiera de las capas 585 antes o después de la perforación o en la capa 587. La aplicación de una red con agujeros perforados previamente no ha mostrado tener fugas sustanciales y ofrece la ventaja de que las agujas utilizadas para la perforación no se contaminan al tocar los reactivos aplicados. Alternativamente, para minimizar la posibilidad de fugas, y para situar los reactivos aplicados en la ubicación más distante de la red, puede ser deseable aplicar los reactivos 589 en la segunda capa 587, sellar la red 581 con la capa 585 y, a continuación, perforar la capa 585. En un ejemplo ilustrativo, los reactivos se aplican sobre la segunda capa 587 utilizando un Nano-Plotter 2.1/E A060-324 de GeSiM (Grosserkmannsdorf, Alemania). Utilizando un aplicador de este tipo, se pueden aplicar múltiples redes simultáneamente.

Una vez aplicada y perforada, la red 581 se coloca en el interior de las capas 518 y 519 de la bolsa 510 y se sella en su lugar, de manera ilustrativa mediante cualquiera de termosellado, utilizando un adhesivo, soldadura por ultrasonidos, cierre mecánico u otros medios para encerrar la red 581 en el interior de la bolsa 510 dentro del blíster 584. Se entiende que el blíster 584 está en conexión de fluido con el blíster 566 a través del canal 565, y que puede fluir líquido desde el canal 565 hasta el blíster 584 y sobre las perforaciones 586. En un ejemplo ilustrativo, cuando se forma el blíster 584, se tiene cuidado de permitir una trayectoria para que escape el aire. Esto se puede lograr "ondulando" la superficie interior de la primera capa 518 adyacente a la zona 580 de amplificación de segunda etapa para imprimir el material de la película con un patrón de textura ligeramente elevada. Esto permite que pasen aire y líquido a lo largo de la superficie de la capa perforada 585, y permite mejor que el líquido alcance y llene todos los pocillos 582. A continuación, la bolsa 510 se coloca en el interior de una cámara de vacío y se evacua. De manera ilustrativa, cuando la presión ha alcanzado aproximadamente 0,3 milibar, se acciona un cilindro neumático en el interior de la cámara de vacío, que impulsa hacia abajo un émbolo hacia el accesorio 590 para sellar el canal 567, cortando de ese modo la trayectoria de la red en el interior de la bolsa sellada, y la cámara de vacío. También se impulsa una serie de otros émbolos en el accesorio 590 para sellar los diversos canales 515 de entrada. La bolsa se

retira de la cámara de vacío y se puede envasar para almacenamiento a largo plazo en una bolsa de vacío.

La bolsa 510 se puede utilizar de manera similar a la bolsa 210. Debido a que la red 581 se envasa al vacío, cuando se desplaza líquido desde el blíster 566 hasta la zona 580 de amplificación de segunda etapa, la muestra de líquido se extrae a través de perforaciones 586 y dentro de los pocillos 582. Se fuerza lejos el líquido en exceso inflando una vejiga neumática sobre la red y el ciclado térmico se realiza tal como se describió anteriormente, de manera ilustrativa, calentando y enfriando un elemento Peltier presionado contra un lado de la red.

Tal como se mencionó anteriormente, la capa perforada 585 se puede reemplazar por una variedad de barreras físicas o químicas adecuadas. En un ejemplo ilustrativo que utiliza una barrera química, se omite la capa perforada 585, y los reactivos 589 se aplican en los pocillos 582 en un tampón que se disuelve de manera relativamente lenta. De manera ilustrativa, los reactivos 589 que contienen polímeros tales como PEG, Ficoll o polisorbato 20 o azúcares, tales como sacarosa, trehalosa o manitol en concentraciones apropiadas serán compatibles con la reacción de PCR de segunda etapa y se pueden disolver más lentamente que los cebadores aplicados únicamente en agua o Tris/EDTA. Los cebadores aplicados en uno de estos tampones se pueden secar al aire en los pocillos 582, tal como se describió anteriormente (se entiende que en tal ejemplo, la segunda capa 587 se fija al conjunto 581 de alta densidad para la aplicación). Estos mismos polímeros se pueden utilizar en la liofilización de reactivos enzimáticos (por ejemplo, las enzimas y los tampones utilizados en la PCR) para formar una matriz abierta que contiene las enzimas estabilizadas. Por tanto, los cebadores aplicados en estos tampones se pueden liofilizar en el lugar en los pocillos 582, lo que conduce a una rehidratación más lenta pero potencialmente más completa que con el secado al aire. Cuando se utiliza la bolsa 510, el fluido del blíster 566 se impulsa al pocillo por vacío o presión y comienza a disolver la mezcla de cebadores. Al seleccionar un tampón que se disuelve de manera adecuadamente lenta, cuando se activa la vejiga adyacente a la zona 580 de amplificación de segunda etapa, el contenido de cada pocillo 582 se sella en el mismo antes de cualquier contaminación cruzada sustancial.

Se puede utilizar una matriz que no se disuelva hasta que la zona 580 de amplificación de segunda etapa se caliente por encima de una temperatura predeterminada. Un ejemplo de una matriz de este tipo es la agarosa de bajo punto de fusión, tal como la agarosa de bajo punto de fusión GenePure (ISC Bioexpress). En un ejemplo, una solución al 1,5 % de esta agarosa se funde a 65 °C y gelifica a 24-28 °C. Antes de la aplicación, los reactivos 589 se pueden calentar de manera ilustrativa hasta 50 °C y mezclar con esta agarosa que ya se había fundido y, a continuación, aplicarse en los pocillos 582 en un pequeño volumen (de manera ilustrativa 100 a 500nl). Para mantener la mezcla líquida durante la aplicación, esto se debe realizar en una cabina calentada por encima de la temperatura de fusión de la agarosa. Alternativamente, puede ser posible pipetear soluciones diluidas de la agarosa sin fundir. Después de que la mezcla de agarosa/reactivo se aplica, la red 581 de alta densidad se seca. Esto puede ser un simple secado al aire o la mezcla de cebadores-agarosa puede contener los azúcares y polímeros enumerados anteriormente para que los reactivos puedan liofilizarse. Cuando se utiliza la bolsa 510 para PCR, la zona 580 de amplificación de segunda etapa se puede calentar, de manera ilustrativa hasta 55 °C, ya que el fluido del blíster 566 se desplaza hasta la red 581 de alta densidad. A esta temperatura, la agarosa no se funde, por lo que los cebadores no se liberan en la solución. Una vez que se llena la red 581 de alta densidad, se infla la vejiga correspondiente para sellar los pocillos. Cuando la temperatura se eleva por encima de 65 °C en la primera etapa de desnaturalización del primer ciclo de PCR, la agarosa que contiene los cebadores se funde, liberando los cebadores en la mezcla maestra. De manera ilustrativa, el ciclado térmico nunca baja de 60 °C (u otra temperatura de fusión para la agarosa) de modo que la agarosa no gelifica durante el ciclado térmico. Además, en el instrumento 800 ilustrativo de la figura 8, el ciclado de temperatura repetido se impulsa por el calentador 888, que está ubicado en un lado de la bolsa. Se espera que a menudo haya un gradiente de temperatura a través de la solución de PCR en los pocillos 582, lo que debe facilitar la mezcla de los cebadores por flujo de fluido por convección. También se puede utilizar cera.

Los cebadores se pueden unir de manera condicionada a los pocillos 581, con la posterior liberación de los cebadores en la solución después de que los pocillos 581 se hayan llenado. Dependiendo de cómo los cebadores están unidos al sustrato de plástico, los cebadores se pueden escindir utilizando calor (de manera ilustrativa durante el primer ciclo de la reacción de PCR), luz (irradiando, de manera ilustrativa, a través de la ventana 847), productos químicos (por ejemplo, ditiotretol junto con calor reducirán los enlaces disulfuro que se pueden utilizar para ligar cebadores a los pocillos), o enzimas (p. ej., proteasas específicas de sitio, tales como activador de plasminógeno tisular, se pueden utilizar para escindir el ligador peptídico apropiado que une cebadores al sustrato).

Se puede inyectar una ADNasa en la zona 580 de amplificación de segunda etapa de manera posterior a la amplificación, para minimizar adicionalmente cualquier riesgo potencial de contaminación.

Se entiende que la zona 580 de amplificación de segunda etapa se ha descrito en el presente documento para su utilización con PCR. Sin embargo, otras utilidades para la bolsa 510 y la zona 580 de amplificación de segunda etapa están dentro del alcance de la presente invención. Además, se entiende que la zona 580 de amplificación de segunda etapa se puede utilizar con o sin extracción de ácidos nucleicos y una zona de amplificación de PCR de primera etapa. Finalmente, se entiende que la zona 580 de amplificación de segunda etapa se puede utilizar con cualquiera de las bolsas descritas en el presente documento.

EJEMPLO 1: PCR MÚLTIPLEX ANIDADA

5 Se ejecutó un conjunto de reacciones en una bolsa 110 de la figura 5, en un instrumento similar al instrumento 800 pero configurado para la bolsa 110. Para mostrar la lisis celular y la eficacia de la amplificación de ácidos nucleicos en dos etapas, 50 µl de cada cultivo vivo de *S. cerevisiae* y *S. pombe* en la fase logarítmica se mezcló con 100 µl de una muestra de aspirado nasofaríngeo de un donante sano para formar la muestra, luego se mezcló con 200 µl de tampón de lisis (guanidina-HCl 6 M, Triton[®] X 100, al 15 % acetato de sodio 3 M). A continuación, se inyectaron 300 µl de la muestra de 400 µl en tampón de lisis en la cámara 192a de la bolsa 110.

10 La bolsa 110 se fabricó con 0,25 g de perlas ZS selladas en un blíster 122 de tres lóbulos. Los cebadores de segunda etapa, tal como se comenta, a continuación, también se aplicaron en los blísteres 181 y 182 durante la fabricación de la bolsa 110. La bolsa 110 se cargó de la siguiente manera:

15 115a muestra y tampón de lisis, tal como se describió anteriormente,
115b bolas magnéticas en el tampón de lisis,
115d-e tampón de lavado (citrato de sodio 10 mM),
115g tampón de elución (Tris 10 mM, EDTA 0,1 mM)
115h tampón de PCR de primera etapa:

20 dNTP 0,2 mM
cada cebador 0,3 µM:

25 Sc1: cebadores configurados para amplificar una porción de la proteína nuclear YRA1 que se une a ARN y a MEX67p de *S. cerevisiae*. Los cebadores están configurados para amplificarse a través de un intrón de tal manera que la amplificación de ADNc (ARNm sometido a transcripción inversa a través de VLM-M) produce un amplicón de 180 pb.

Sc2: cebadores configurados para amplificar una región de 121 pb del ADNc del homólogo de la glucógeno sintasa cinasa 3 MRK1 (GSK-3) de *S. cerevisiae*.

30 Sc3: cebadores configurados para amplificar una región de 213 pb del ADNc de la proteína similar a ubiquitina RUB1 de *S. cerevisiae*.

Sp1: cebadores configurados para amplificar una región de 200 pb del ADNc de la subunidad reguladora de la proteína cinasa dependiente de suc1-ciclina de *S. pombe*.

35 Sp2: cebadores configurados para amplificar una región de 180 pb del ADNc de la familia del factor sec14-citosólico de *S. pombe*.

Tampón de PCR con MgCl₂ 3 mM (sin BSA)

50 unidades de VLM-M

4,5 unidades Taq:anticuerpo

100 unidades de RNaseOut

40 115j-k tampón de PCR de segunda etapa

dNTP 0,2 mM

IX LC Green[®] Plus (Idaho Technology)

45 Tampón de PCR con MgCl₂ 2 mM (con BSA),

4,5 unidades de Taq

115l tampón de PCR de segunda etapa con una muestra de los amplicones de primera etapa.

50 Durante la fabricación, a los blísteres 181 y 182 de segunda etapa se les aplicaron cebadores de segunda etapa anidados. A cada blíster se le aplicó un par de cebadores en una cantidad para dar como resultado una concentración final de aproximadamente 0,3 µM una vez rehidratada con el tampón de PCR de segunda etapa. Los cebadores anidados de segunda etapa son los siguientes:

55 Sc1: cebadores configurados para amplificar un fragmento de 80 pb del amplicón de primera etapa de ADNc de Sc1.

Sc2: cebadores configurados para amplificar un fragmento de 121 pb del amplicón de primera etapa de ADNc de Sc1.

Sc3: cebadores configurados para amplificar una porción de 93 pb del amplicón de primera etapa de ADNc de Sc1.

60 Sp1: cebadores configurados para amplificar una porción de 99 pb del amplicón de primera etapa de ADNc de Sc1.

Sp2: cebadores configurados para amplificar una porción de 96 pb del amplicón de primera etapa de ADNc de Sc1.

No existe solapamiento entre los pares de cebadores de primera y segunda etapa para ninguna de las dianas. Cada par de cebadores se aplicó en un blíster 181 de control negativo y dos blísteres 182 de segunda etapa, de modo que cada amplificación de segunda etapa se ejecutara por duplicado, cada duplicado con un control negativo.

65

Después de la carga, la activación del émbolo asociado con el canal 115a de entrada desplazó la muestra hasta el blíster 122 de tres lóbulos, la activación del émbolo asociado con el canal 115b de entrada desplazó las perlas magnéticas hasta el depósito 101, la activación de los émbolos asociados con los canales 115d-e de entrada desplazó el tampón de lavado hasta los depósitos 102 y 103, la activación del émbolo asociado con el canal 115g de entrada desplazó el tampón de elución hasta el depósito 104, la activación del émbolo asociado con el canal 115h de entrada desplazó el tampón de PCR de primera etapa hasta el depósito 105, la activación de los émbolos asociados con los canales 115j-k de entrada desplazó el tampón de PCR de segunda etapa hasta los depósitos 106 y 107, y la activación del émbolo asociado con el canal 115l de entrada desplazó el control positivo (tampón de PCR de segunda etapa con una muestra de amplicón de primera etapa preparada previamente) al depósito 108. En este presente ejemplo, los émbolos asociados con los canales 115a y 115b de entrada se presionaron antes de cargar la bolsa 110 en el instrumento. Todos los demás émbolos se presionaron secuencialmente en el instrumento durante la ejecución, y los fluidos se desplazaron hasta los depósitos 102 a 108 según fue necesario.

Una vez que la bolsa 110 se colocó en el instrumento, y el batido tuvo lugar durante diez minutos en presencia de perlas de ZS, tal como se describió anteriormente. Una vez que se completó la lisis celular, el depósito 101 se comprimió y las perlas magnéticas de unión a ácido nucleico del depósito 101 se forzaron a un blíster 122 de tres lóbulos, en el que las perlas se mezclaron suavemente y se permitió que incubasen durante 5 minutos.

A continuación, la mezcla de muestra-perlas se desplazó hasta el blíster 144, donde se capturaron las perlas magnéticas mediante la activación del imán. Una vez que se desplegó el imán, las vejigas adyacentes al blíster 144 se presurizaron para forzar los fluidos de vuelta al blíster 122 de tres lóbulos. A continuación, las perlas capturadas se lavaron tal como se describió anteriormente, utilizando la solución de lavado de los depósitos 102 y 103. Tras el lavado, las perlas se capturaron una vez más en el blíster 144 mediante la activación del imán, y el tampón de elución almacenado en el depósito 104 se desplaza hasta el blíster 144, en la que, después de una incubación de 2 minutos, los ácidos nucleicos eluidos de las perlas se desplazan hasta el blíster 161, tal como se comentó anteriormente.

En el blíster 161, la muestra de ácidos nucleicos se mezcla con la mezcla maestra de PCR de primera etapa del depósito 105. A continuación, la muestra se mantiene a 40 °C durante 10 minutos (tiempo durante el cual el VLM-M convierte ARNm en ADNc), luego 94 °C durante 2 minutos (para inactivar el VLM-M y retirar el anticuerpo de Taq). El ciclado térmico es entonces 20 ciclos de 94 °C durante 10 segundos y 65 °C durante 20 segundos.

De manera posterior a la amplificación de primera etapa, la muestra se diluye aproximadamente 100 veces utilizando la mezcla maestra de PCR de segunda etapa del depósito 106. A continuación, la muestra se desplaza hasta los blísteres 182, a las que se aplicaron previamente los cebadores de segunda etapa, tal como se comentó anteriormente. El tampón de PCR de segunda etapa se desplazó desde el depósito 181 hasta los blísteres 181 de control negativo, y la mezcla de control positivo se desplazó hasta los blísteres 183 del depósito 108. Las muestras se desnaturalizaron durante 30 segundos a 94 °C, a continuación, se amplificaron durante 45 ciclos de 94 °C durante 5 segundos y 69 °C durante 20 segundos.

Tal como se puede observar en la figura 13, todos los amplicones diana y el control positivo mostraron amplificación, mientras que ninguno de los controles negativos mostró amplificación. Cada muestra se ejecutó en réplicas. Las réplicas mostraron, cada una, una amplificación similar (datos no mostrados).

Se entiende que las dianas de *S. cerevisiae* y *S. pombe* son sólo ilustrativas y que otras dianas están dentro del alcance de la presente invención.

EJEMPLO 2: PCR de alta densidad

El ejemplo anterior utiliza la bolsa 110 de la figura 5. La bolsa 110 tiene cinco blísteres 181 de control negativo, cinco blísteres 183 de control positivo y diez blísteres 182 de muestra de bajo volumen. La bolsa 210 de la figura 6 aumentó a 18 el número de blísteres 282 de muestra de bajo volumen. Sin embargo, la red 581 de alta densidad de la bolsa 510, que se muestra en la figura 15, puede tener 120 pocillos 582 de segunda etapa o más. Este aumento del número de reacciones de segunda etapa permite un amplio conjunto de aplicaciones potenciales de diagnóstico e identificación humana sin necesidad de aumentar el tamaño de la bolsa y su instrumento. Diversos ejemplos se describen en el presente documento.

En un ejemplo, se sabe que los ensayos de inmunofluorescencia comerciales de manera convencional para los virus respiratorios habituales pueden detectar siete virus: adenovirus, VP1, VPI2, VPI3, VSR, *Influenza A* e *Influenza B* (virus de la gripe). Un panel más completo incluiría de manera ilustrativa, ensayos para cinco virus adicionales: coronavirus, *Metapneumovirus* humano, *BOCAvirus*, *Rhinovirus* y *Enterovirus* distinto de RVH. Para virus altamente variables, tales como adenovirus o RVH, es deseable utilizar múltiples cebadores para seleccionar como diana todas las ramas del linaje del virus (de manera ilustrativa 4 conjuntos de cebadores externos y 4 internos, respectivamente). Para otros virus tales como coronavirus, existen 4 linajes distintos (229E, NL63, OC43, HKU1) que no varían de una estación a otra, pero que han divergido lo suficiente como para requerir conjuntos de

cebadores independientes. El panel ilustrativo completo de virus respiratorios también seleccionaría como diana coronavirus de SARS (“severe acute respiratory syndrome”, síndrome respiratorio agudo grave), posiblemente los subtipos HA y N de la gripe aviar, y posiblemente otros. Finalmente, algunos de los virus respiratorios muestran una tasa de variación de secuencia tan alta que sería beneficioso crear más de un ensayo de PCR anidada para cada virus, minimizando de ese modo la posibilidad de resultados falsos negativos debido a la variación de secuencia bajo los cebadores. Cuando se incluyen todos los conjuntos de cebadores descritos en el presente documento, un panel de virus respiratorios de este tipo podría tener 80 amplicones específicos o más en la amplificación de segunda etapa. El conjunto 581 de alta densidad podría albergar fácilmente tal panel en una única bolsa 510.

Una segunda aplicación de la red 581 de alta densidad de la bolsa 510 sería determinar la identidad y el espectro de resistencia a antibióticos de las bacterias resistentes a múltiples fármacos aisladas de pacientes infectados. Los procedimientos actuales requieren de varios días para cultivar el organismo y someter a prueba empíricamente los perfiles de resistencia a fármacos individuales. Durante el tiempo que lleva recibir los resultados, los médicos administrarán a menudo antibióticos de amplio espectro, lo que conduce a un aumento de bacterias resistentes a múltiples fármacos. Se han desarrollado cebadores de PCR para detectar los determinantes genéticos de la resistencia a los antibióticos (los propios genes de resistencia a antibióticos). Sin embargo, debido al gran número de variantes de algunos de estos genes, se requiere un gran número de amplicones para una determinación completa del perfil de resistencia. Hujer *et al.* describen un panel de 62 ensayos de PCR para identificar los genes de resistencia presentes en aislados de *Acinetobacter*. De nuevo, la red 581 de alta densidad podría albergar fácilmente un panel en una única bolsa de este tipo.

Un tercer ejemplo de la utilidad de la red de alta densidad es en el sector de la identificación humana, de manera ilustrativa para la identificación forense de restos humanos y para pruebas de paternidad. La mayor parte del mercado en identificación humana está dominada por sistemas que analizan secuencias cortas de repetición en tándem (STR, short tandem repeat sequences). Este análisis, en general, ha requerido separar las repeticiones por tamaño, utilizando por ejemplo electroforesis capilar. El equipo de laboratorio especializado utilizado para este propósito, en general, no ha sido portátil en campo. Existe un creciente interés en la utilización de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP, single nucleotide polymorphism) para las pruebas de identidad, ya que existe un gran conjunto de técnicas para identificar SNP y algunas de ellas son susceptibles de utilización en el campo. Sánchez *et al.* han publicado un conjunto de 52 SNP bien caracterizados que proporcionan colectivamente una probabilidad muy baja de que coincidan dos individuos por casualidad (una probabilidad de coincidencia media, como mínimo, de $5,0 \times 10^{-19}$). En la práctica, se pueden necesitar dos amplicones para cada SNP para tipificar con precisión cada locus (véase, por ejemplo, Zhou *et al.*). Por tanto, una bolsa 510 con 104 pocillos 582 de segunda etapa podría tipificar completamente un individuo en todos los 52 loci de SNP.

Se entiende que se obtienen ventajas de coste y flujo de trabajo al combinar ensayos de diferentes aplicaciones de diagnóstico en una bolsa. Por ejemplo, el panel completo de virus respiratorios podría combinarse con el panel de identificación bacteriana. Estas combinaciones podrían simplificar la fabricación, ya que existen menos tipos de bolsas a ensamblar. También podrían simplificar el trabajo del usuario final, ya que existen menos tipos específicos de bolsas que deben almacenarse en una clínica, y también reducen la posibilidad de utilizar la bolsa incorrecta para una muestra clínica en particular. Para algunas aplicaciones, estas ventajas podrían compensar un mayor coste de fabricación de la bolsa que tiene un mayor número de pares de cebadores. Así, una bolsa 510 con 100 pocillos 582 de segunda etapa o más podría utilizarse para albergar múltiples paneles de ensayos.

EJEMPLO 3: CONTROLES DE PROCESO

Los controles para ensayos altamente multiplexados pueden ser problemáticos, especialmente en entornos de diagnóstico clínico en los que la calidad debe competir con el coste por prueba. La red 582 de alta densidad de la bolsa 510 aumenta potencialmente este problema debido al mayor número de dianas de diagnóstico que se pueden someter a ensayo en una única ejecución. Diversos tipos de controles se comentan en el presente documento.

Los controles de proceso ilustrativos incluyen mezclar un organismo intacto, por ejemplo, un organismo que contiene una diana de ARN, en la muestra del paciente antes de inyectar la muestra en la bolsa. Una diana de este tipo podría ser un bacteriófago de ARN intacto (MS2 o Q β) o un virus de ARN de planta intacto (virus del mosaico del tabaco) o un ARNm presente en una levadura intacta. Los cebadores externos específicos para la diana de ARN estarían presentes en la PCR de primera etapa y un pocillo 582 que contiene los cebadores internos estaría presente en la red de alta densidad. La detección del producto de amplificación en este pocillo 582 confirma que todas las etapas del proceso están funcionando correctamente. También se podría utilizar una curva de fusión de amplificación posterior a la segunda etapa para verificar que se produjo el producto específico correcto. El punto de cruce (“Cp”) determinado a partir de una curva de amplificación podría utilizarse para dar una medida cuantitativa de la integridad de los reactivos. Por ejemplo, el Cp se puede comparar con el de otras bolsas del mismo lote ejecutado en un momento diferente. Aunque se utiliza un organismo intacto, se entiende que se pueden utilizar ácidos nucleicos purificados o aislados si no es importante someter a prueba la lisis. En otras situaciones, puede ser conveniente utilizar el control para someter a prueba sólo las etapas posteriores del análisis. Por ejemplo, añadir en cantidades conocidas un molde de ácido nucleico natural o sintético en un pocillo en la red de alta densidad junto con los cebadores análogos podría utilizarse para someter a prueba la reacción de PCR de segunda etapa, y añadir

en cantidades conocidas un molde de ácido nucleico en la PCR de primera etapa con los cebadores apropiados en la mezcla de amplificación por PCR de primera etapa y en un pocillo 582 de la zona de amplificación de segunda etapa someterá a prueba las reacciones de PCR de primera y segunda etapa.

5 Los controles de proceso, tales como los descritos anteriormente, no someten a prueba la integridad de los
 cebadores específicos con respecto a los amplicones diana. Un ejemplo de un control positivo que somete a prueba
 la integridad de los cebadores específicos utiliza una mezcla de ácidos nucleicos, ARN sintéticos, de manera
 ilustrativa, ya que la estabilidad y la variabilidad a menudo se pueden controlar mejor y estas secuencias no pueden
 10 estar presentes debido a contaminación ambiental, en la que la mezcla contiene un ácido nucleico para cada uno de
 los cebadores presentes en la bolsa en particular. En un entorno de diagnóstico, este control positivo podría
 utilizarse al final de una serie de bolsas utilizadas para someter a prueba muestras de pacientes. La mezcla se
 inyecta en una bolsa, de manera ilustrativa, del mismo lote que las utilizadas para las muestras de pacientes, y el
 éxito se define por todos los amplicones diana que proporcionan un resultado positivo. Los controles negativos se
 15 pueden realizar de la misma manera; al final de una serie de bolsas utilizadas para someter a prueba muestras de
 pacientes, se puede inyectar agua o tampón en una bolsa y el éxito se define por todos los amplicones diana que
 proporcionan un resultado negativo.

El flujo de trabajo individual y los protocolos en un laboratorio de diagnóstico se pueden utilizar para determinar el
 número de bolsas de muestras de pacientes que se ejecutan antes de que se ejecuten las bolsas de control
 20 descritas anteriormente. De manera independiente a la frecuencia o la poca frecuencia con que se ejecuten las
 bolsas de control, estos controles aumentan el tiempo y el coste del sistema total. Por este motivo, sería útil hacer
 los controles internos a la bolsa. La estructura de la red 581 de alta densidad permite el siguiente enfoque novedoso
 para los controles negativos. En este ejemplo, un ácido nucleico, de manera ilustrativa un amplicón sintético, se
 25 añade en cantidades conocidas a uno de los pocillos 582a de la red 581 de alta densidad. Los cebadores para
 amplificar esta secuencia se añaden en cantidades conocidas a este pocillo 582a y en otros dos pocillos 582b y
 582c separados a través de la red. De manera ilustrativa, la secuencia de amplicón y los cebadores son artificiales y
 están diseñados para que ninguno de los cebadores utilizados amplifique otra diana por casualidad.

30 Cuando se ejecuta una bolsa 510 limpia y no contaminada en el instrumento 800, el pocillo 582a que contiene la
 diana sintética generará amplicón y, por tanto, se llamará positivo. Los otros dos pocillos 582a, 582b que contienen
 los cebadores correspondientes no deben amplificar nada en la muestra y, por tanto, deben llamarse negativos. La
 bolsa 510 se puede tratar adicionalmente, para controles adicionales. De manera ilustrativa, la vejiga 880/882 que
 mantiene la red de alta densidad contra el calentador 888 se despresuriza a continuación, y el contenido de los
 pocillos 582 se mezcla. En un procedimiento ilustrativo, el contenido de los pocillos 582 se mezcla de la siguiente
 35 manera: el calentador 888 se utiliza para realizar un ciclo de temperatura de la red de alta densidad por encima y por
 debajo del punto de ebullición del tampón durante un tiempo corto (por ejemplo, tres ciclos de 85 °C durante 10 s, a
 continuación 105 °C durante 20 s). Las burbujas de vapor de agua generadas en los pocillos 582 de la red 581 de
 alta densidad deben forzar el contenido de los pocillos 582 al blíster 580 de la zona de amplificación de segunda
 etapa. Opcionalmente, el contenido de la zona 580 de amplificación de segunda etapa se puede mezclar con el
 40 contenido de resto de la bolsa 510 utilizando las vejigas para desplazar el líquido desde un extremo de la bolsa 510
 hasta el otro. El propósito de estas etapas es mezclar el amplicón de control de contaminación específico, junto con
 cualquier amplicón diana específico en toda la bolsa.

45 Si el usuario abre accidentalmente una bolsa después de que se haya ejecutado de esta manera, entonces se
 liberarán tanto los amplicones diana específicos como el amplicón de control de contaminación. Si cantidades traza
 de estos ácidos nucleicos contaminan una ejecución posterior de la bolsa, el instrumento puede detectar el evento
 de contaminación, ya que los pocillos 582b, 582c que contenían sólo los cebadores específicos para el amplicón
 sintético obtendrán una puntuación positiva. El software en el instrumento alertará al usuario y los resultados de la
 50 ejecución se marcarán como sospechosos.

En otro procedimiento para controlar la contaminación, al final de una ejecución, se puede añadir una enzima o un
 producto químico de degradación de ADN para destruir sustancialmente todos los productos de ADN de las
 reacciones de PCR de primera y segunda etapa. De manera ilustrativa, esto se puede realizar de una manera similar
 al procedimiento de detección de contaminación descrito anteriormente, calentando el contenido de la red de
 55 segunda etapa por encima de la temperatura de ebullición local, extrayendo así la muestra amplificada de los
 pocillos 582 de la red 851, mezclando el líquido calentado con el contenido diluido de la reacción de 1ª etapa,
 añadiendo una alícuota de una sustancia de degradación de ADN, de manera ilustrativa, a través del canal 515k de
 entrada, con o sin enfriamiento de la mezcla, y permitiendo que la reacción de degradación de ADN se incuben hasta
 que se haya destruido sustancialmente todo el ADN producido en la reacción de PCR. Esto se puede lograr
 60 utilizando ADNasas, ácidos u oxidantes, tal como se conoce en la técnica.

Se entiende que cualquiera de los controles de contaminación descritos en el presente documento se puede utilizar
 independientemente o en cualquier combinación de los mismos.

EJEMPLO 4: iPCR

En otro ejemplo, las bolsas y los instrumentos de la presente invención se pueden utilizar para inmuno-PCR (iPCR). La iPCR combina la especificidad de anticuerpo de ELISA con la sensibilidad y las capacidades múltiple de la PCR. Aunque la iPCR se ha aplicado al diagnóstico y la detección de toxinas, la iPCR no ha disfrutado de una aplicación comercial generalizada, probablemente porque los problemas de contaminación de molde de PCR son graves en un formato de ELISA abierto. Debido a que el formato de bolsa de la presente invención proporciona un entorno sellado, las bolsas de la presente invención pueden ser muy adecuadas para iPCR.

Un esquema tradicional de detección mediante ELISA se muestra en la figura 11 (etiquetado como "ELISA"). En 1992, Cantor y colaboradores (Sano, T., *et al.*, Science, 1992. 258 (5079): págs. 120-2) describieron una modificación de la técnica de ELISA básica (figura 11, similar al esquema de "inmuno-PCR I" sin el anticuerpo de captura C-Ab, en el que la enzima utilizada para generar una señal específica se reemplaza por un fragmento de ADN único unido indirectamente al anticuerpo indicador R a través de un resto de unión bifuncional S, tal como una quimera de estreptavidina-proteína A. El fragmento de ADN se detecta posteriormente mediante PCR. Se sabe que la detección mediante PCR puede proporcionar aumentos espectaculares de la sensibilidad del ensayo de inmuno-PCR con respecto a los ensayos ELISA correspondientes, con mejoras en la sensibilidad habitualmente de 10^2 a 10^4 veces. Los avances en los procedimientos de PCR en tiempo real cuantitativa han mejorado la velocidad y la cuantificación de la inmuno-PCR. El acoplamiento directo del anticuerpo indicador (R-Ab) con las etiquetas de molde de ADN (figura 11, esquema de "inmuno-PCR II") ha aumentado adicionalmente la sensibilidad del ensayo de 10^2 a 10^3 veces e hizo posible el desarrollo de ensayos de inmuno-PCR múltiple, en los que cada anticuerpo diferente está marcado con un oligonucleótido diferente y, por tanto, cada antígeno está asociado con un producto de amplificación único.

A pesar de estas ventajas con respecto a los ELISA tradicionales, la iPCR no se ha adoptado ampliamente en productos comerciales en los 13 años desde que se describió por primera vez. Esto se debe en parte a los peligros de contaminación inherentes a cualquier procedimiento de análisis mediante PCR de tubo abierto. Los protocolos iPCR de la técnica anterior se derivan de ensayos ELISA y requieren numerosas etapas de lavado que aumentan la probabilidad de contaminar el área de trabajo con material amplificado. El riesgo significativo de falsos positivos debido a la contaminación del flujo de trabajo ha contribuido a evitar la iPCR en la evaluación de diagnóstico.

Los problemas de contaminación con amplicones retrasaron la adopción generalizada de la propia PCR en el diagnóstico de afecciones genéticas humanas o de enfermedades infecciosas hasta que se desarrollaron ensayos de PCR homogéneos (es decir, de "tubo cerrado"). Al hacer posible la lectura del ensayo en un sistema de tubo cerrado, la diseminación del amplicón se reduce severamente. De manera similar, la iPCR se podría adoptar más ampliamente si un formato de sistema cerrado estuviera disponible. En el presente sistema, la muestra se inyectaría en una bolsa que se proporcionaría con todos los reactivos necesarios. Las etapas de captura de antígeno, lavado, unión de indicador-anticuerpo, lavado y detección mediante PCR posterior podrían realizarse completamente dentro de la bolsa. De manera ilustrativa, los ácidos nucleicos nunca abandonarían la bolsa y se eliminarían junto con la bolsa.

Cualquiera de las bolsas de la presente invención se puede adaptar para iPCR. Por ejemplo, la bolsa 210 de la figura 6 se puede adaptar, de manera ilustrativa, de la siguiente manera. Las cámaras 292a a 292i se llenarían con los siguientes componentes. La muestra que comprende, de manera ilustrativa, un antígeno no purificado y/o no modificado (por ejemplo, una toxina) se inyecta a través del puerto 241a de inyección a la cámara 292a. Se proporciona un anticuerpo de captura conjugado con perlas magnéticas (C-Ab) en la cámara 292b. Si se van a someter a prueba múltiples dianas, se entiende que se pueden utilizar múltiples anticuerpos de captura que tienen especificidad por múltiples antígenos. Se proporciona un tampón de prelavado opcional en la cámara 292c. Se proporciona un anticuerpo indicador conjugado con un molde de oligonucleótido (R-Ab-ADN) en la cámara 292d. Se entiende que los anticuerpos de captura e indicadores pueden ser monoclonales o policlonales. Cuando se van a detectar múltiples antígenos, los anticuerpos de captura e indicadores pueden contener sólo anticuerpos policlonales, sólo anticuerpos monoclonales o cualquier combinación de anticuerpos policlonales específicos para un antígeno y monoclonales específicos para otro antígeno. Cuando un anticuerpo indicador es policlonal, se entiende que todos los anticuerpos indicadores que tienen especificidad para un antígeno en particular se acoplarán con moldes de oligonucleótido que tienen una secuencia específica, aunque varíe la especificidad entre diversos anticuerpos en ese conjunto. El oligonucleótido puede ser bicatenario o monocatenario. Se pueden proporcionar múltiples R-Ab-ADN para detectar múltiples antígenos, estando cada anticuerpo diferente conjugado con un oligonucleótido único. Se proporcionan tampones de lavado en las cámaras 292e a 292h. Se proporciona una mezcla maestra de PCR de primera etapa, tal como se describió anteriormente, en la cámara 292i. Se proporciona un tampón de dilución en la cámara 292j. Se proporciona una mezcla maestra de PCR de segunda etapa, tal como se describió anteriormente, en la cámara 292k. Tal como se comentó anteriormente, los reactivos se pueden proporcionar secados en las cámaras 292b a 292i, y se pueden rehidratar antes de su utilización mediante inyección de agua a través del sello 239, o cada reactivo se puede proporcionar húmedo mediante inyección en cada cámara 292 individual. Se contemplan combinaciones de los mismos.

Una vez que se cargan la muestra y los reactivos, la bolsa 220 se inserta en el instrumento 800. A continuación, se

presiona el émbolo 268a y la muestra se desplaza hasta el blíster 222 de tres lóbulos. También se presiona el émbolo 268b y los anticuerpos de captura conjugados con perlas magnéticas (se muestra como C en la figura 11) también se desplazan hasta un blíster 222 de tres lóbulos. La muestra y el C-Ab se mezclan mediante la presión de la vejiga 828 alternando con la presión de las vejigas 824, 826. Debido a que se desea mezclar, la presión de las vejigas 824, 826, 828 puede ser considerablemente menor que la presión utilizada, tal como se comentó anteriormente, para la lisis. De manera ilustrativa, se obtiene una mezcla suave. Se permite que incuben la muestra y el C-Ab durante el tiempo suficiente para que los anticuerpos de captura se unan a los antígenos T en la muestra (formando complejos C-Ab-T), de manera ilustrativa, durante aproximadamente 5 minutos, aunque pueden ser deseables otros tiempos de incubación. Para la iPCR, puede ser conveniente incluir un calentador adicional en el instrumento 800 para mantener las incubaciones a aproximadamente 37 °C.

Una vez que los antígenos presentes en la muestra se han incubado suficientemente para la captura, la muestra se desplaza hasta el blíster 246 y el imán 850 se despliega, capturando los anticuerpos de captura en el blíster 246. A continuación, las porciones no unidas de la muestra se desplazan de vuelta al blíster 222 de tres lóbulos, que funciona ahora como depósito de residuos. Aunque se utilizan perlas magnéticas para restringir los anticuerpos de captura en los ejemplos descritos en el presente documento, se entiende que se pueden utilizar otros mecanismos de captura, incluidos soportes sólidos, posiblemente incluso reticular los anticuerpos de captura a una superficie interior de un blíster.

Si se desea, los complejos C-Ab-T se pueden lavar utilizando el tampón de prelavado de la cámara 292c. El tampón de prelavado se desplaza hasta el blíster 244 a través del canal 245, el imán se retira, liberando los complejos C-Ab-T, y las perlas se desplazan suavemente entre los blísteres 244 y 246. A continuación, las perlas se vuelven a capturar en el blíster 246 a través de la activación del imán 850, y el fluido restante se desplaza hasta un blíster 222 de tres lóbulos. Se espera que este prelavado pueda mejorar la discriminación de una señal positiva con respecto a la señal negativa de fondo, pero tales diferencias pueden resultar insignificantes. Se pueden realizar prelavados adicionales, si se desea.

El émbolo 268d se presiona y la mezcla que contiene uno o varios anticuerpos indicadores R-Ab conjugados con moldes de oligonucleótido (R-Ab-ADN, que se muestra en la figura 11, esquema de inmuno-PCR II, como R con ácido nucleico unido) se desplaza hasta el blíster. 246. El imán se retrae y la mezcla se mezcla suavemente desplazándose entre los blísteres 244 y 246. La incubación, de manera ilustrativa, durante aproximadamente 5 minutos, aunque pueden ser deseables otros tiempos de incubación, permite la formación de los complejos ternarios C-Ab-T-R-Ab-ADN, tal como se ilustra en la figura 11, inmuno-PCR II. La activación del imán 850 permite la captura de los complejos ternarios en el blíster 246, y el fluido restante se desplaza hasta el blíster 222 de tres lóbulos.

El émbolo 268e se presiona y el tampón de lavado se desplaza desde la cámara 292e hasta el blíster 246. El complejo ternario-perlas magnéticas se lava como en el prelavado descrito anteriormente, el complejo ternario-perlas magnéticas se vuelve a capturar en el blíster 246 y el fluido restante se desplaza hasta el blíster 222 de tres lóbulos. El lavado se repite varias veces utilizando los tampones de lavado de las cámaras 292f, 292g y 292h, excepto en que la mezcla se realiza entre los blísteres 246 y 248 para evitar la reintroducción de complejos R-Ab-ADN no unidos que pueden residir en el blíster 244 o el canal 243. Aunque se describen cuatro lavados en este ejemplo ilustrativo, se entiende que se puede utilizar cualquier número de lavados, alterando, de manera ilustrativa, el número de cámaras en el accesorio 290 o aumentando el volumen de las cámaras y utilizando sólo una porción del tampón de lavado en una cámara para cada lavado. También se entiende que la retirada de todos los complejos R-Ab-ADN no unidos es extremadamente difícil, incluso con un gran número de lavados. Además, para un antígeno que no está presente en la muestra, la presencia de sólo unas pocas moléculas de R-Ab-ADN no unido o complejos R-Ab-ADN unidos de manera inespecífica para ese antígeno puede dar como resultado una señal de amplificación. Por tanto, aunque el objetivo ideal de la etapa de lavado es retirar todos los complejos R-Ab-ADN específicos para antígenos que no están presentes en la muestra, un objetivo ilustrativo es retirar un número suficiente de tales complejos R-Ab-ADN de tal manera que la curva de amplificación para ese oligonucleótido se retrasa y se puede distinguir de la curva de amplificación de una muestra positiva. De manera ilustrativa, más lavados deben retirar más R-Ab-ADN no unido y proporcionar un límite de detección más bajo, pero más lavados corren el riesgo de perder los complejos ternarios deseados a través de la disociación o pérdida de perlas magnéticas no capturadas por el imán. Después de completarse el lavado, si se desea, el complejo ternario capturado se puede calentar o tratarse enzimáticamente (de manera ilustrativa con papaína, proteinasa K u otra enzima adecuada proporcionada a través de una cámara adicional) para liberar el ADN antes de la PCR. Tal tratamiento puede mejorar la eficacia de la PCR de primera etapa. Se entiende que tal tratamiento se puede utilizar con cualquiera de los ejemplos de iPCR comentados en el presente documento.

Una vez que se completa el lavado, se presiona el émbolo 268i y la mezcla maestra de PCR de primera etapa, tal como se describió anteriormente, se desplaza hasta el blíster 246. La mezcla maestra de PCR de primera etapa contiene pares de cebadores para todas las dianas deseadas. Se libera el imán 850, y se puede utilizar mezcla opcional entre los blísteres 246 y 248 para resuspender los complejos ternarios. La mezcla se desplaza hasta el blíster 264, en el que tiene lugar el ciclado térmico de primera etapa, tal como se describió anteriormente. Una vez que los oligonucleótidos conjugados se han amplificado hasta niveles suficientes, tal como se comentó anteriormente, la mezcla amplificada se diluye opcionalmente utilizando el tampón de dilución proporcionado en la

cámara 292j. Parte o la totalidad de la mezcla amplificada de primera etapa se puede mezclar con la mezcla maestra de PCR de segunda etapa proporcionada desde la cámara 292k, y, a continuación, esta mezcla se desplaza hasta los 18 blísteres 282 de segunda etapa, en los que se proporcionan los cebadores de segunda etapa, tal como se comentó anteriormente. Si se desea, se puede utilizar uno de los blísteres 282 de segunda etapa para un control negativo, en el que se sabe que no existe antígeno presente en la muestra, pero se proporcionó R-Ab-ADN de la cámara 292d y se proporcionan los cebadores adecuados en el blíster 282 de segunda etapa de control negativo. Se espera que, a pesar de diversos lavados, pequeñas cantidades de este R-Ab-ADN en particular puedan estar presentes en la PCR de primera etapa y, por consiguiente, que pequeñas cantidades de producto amplificado de primera etapa se pueden proporcionar a este blíster 282 de segunda etapa. Sin embargo, las cantidades deben ser bastante pequeñas, y el punto de cruce debe retrasarse mucho más allá del de las muestras positivas. Además, si se desea, se puede utilizar uno de los blísteres de segunda etapa para un control positivo, en el que a la muestra se le añaden cantidades conocidas de un antígeno que no esté sometiéndose a prueba por lo demás (tal vez incluido con las perlas de C-Ab), que se une supuestamente a su R-Ab-ADN correspondiente, que luego se amplifica en la PCR de primera etapa. Finalmente, no se utilizan blísteres 283 de control en este ejemplo ilustrativo. Sin embargo, con una reconfiguración menor, los blísteres 283 se pueden conectar con el blíster 266 y pueden proporcionar seis reacciones de segunda etapa adicionales. Alternativamente, los blísteres 283 se pueden utilizar para otros controles, según se desee por la aplicación particular.

Tal como se comentó anteriormente, debido a la dificultad de retirar todos los complejos R-Ab-ADN no unidos o unidos de manera inespecífica, incluso las muestras negativas pueden mostrar cierta amplificación. Se espera que el análisis de amplificación en tiempo real permita distinguir los positivos de los negativos mediante una diferencia en el número de ciclos de un punto de cruce de umbral (o una medición de umbral de ciclo equivalente, tal como el número de ciclos cuando se alcanza el 50 % de amplificación).

Se entiende que la amplificación múltiple de primera etapa puede no ser necesaria para la detección con iPCR, incluso cuando se someten a prueba múltiples antígenos. Sin embargo, la amplificación múltiple de primera etapa puede proporcionar más sensibilidad.

EJEMPLO 5: iPCR CON BOLSA ESPECÍFICA DE iPCR

El ejemplo anterior ilustra un procedimiento que adapta la bolsa 210 de la figura 6 para iPCR. Sin embargo, la figura 12 muestra una bolsa 310 que está configurada de manera ilustrativa para iPCR. El accesorio 390 es similar a los accesorios 190 y 290, excepto en que tiene 15 cámaras 392 y émbolos 368. Cada cámara 392 (de manera ilustrativa la cámara 392a, en la que se inyecta la muestra) puede tener su propio puerto de inyección, o varias cámaras pueden tener un canal de conexión y pueden compartir un puerto de inyección (de manera ilustrativa 392e a 392k, conteniendo cada uno tampón de lavado). Al igual que con los accesorios descritos anteriormente, cualquier combinación de puertos de inyección y canales está dentro del alcance de la presente invención. La bolsa 310 difiere de la bolsa 210 de la figura 6 en una manera primaria. Como la lisis celular, en general, no es necesaria en la iPCR, el blíster 222 de tres lóbulos se puede reemplazar por un único depósito 322 de desechos grande. Debido a que es deseable tener múltiples lavados en la iPCR, el depósito 322 de desechos está dotado de un volumen suficientemente grande como para retener los múltiples tampones utilizados, por ejemplo 2-5 ml, dependiendo de la aplicación y el volumen de las reacciones. Se entiende que puede ser necesario reconfigurar el instrumento 800 de alguna manera para albergar la bolsa 390.

Antes de la inserción en el instrumento, la bolsa 390 de la figura 12 tendría de manera ilustrativa los siguientes componentes en las cámaras 392. La muestra que se va a someter a prueba se inyectaría en la cámara 392a. Se proporcionan anticuerpos de captura (C-Ab) conjugados con perlas magnéticas en la cámara 392b. Se proporciona un tampón de prelavado opcional en la cámara 392c. Se proporcionan anticuerpos indicadores conjugados con sus moldes de oligonucleótido (R-Ab-ADN) respectivos en la cámara 392d. Tal como se comentó anteriormente, se pueden proporcionar múltiples R-Ab-ADN para detectar múltiples antígenos, estando cada anticuerpo diferente conjugado con un oligonucleótido único. Se proporcionan tampones de lavado en las cámaras 392e a 392k. Se proporciona una mezcla maestra de PCR de primera etapa en la cámara 392l. Se proporciona un tampón de dilución en las cámaras 392m y 392n. Se proporciona una mezcla maestra de PCR de segunda etapa en la cámara 392o.

Para comenzar, los émbolos 368a y 368b se presionan, forzando la muestra y los anticuerpos de captura C-Ab a través del canal 343 al blíster 344. La muestra y el C-Ab se mezclan suavemente, desplazándose de manera ilustrativa entre los blísteres 344 y 346 a través del canal 345, y se incuban, tal como se describió anteriormente. Después de un periodo de tiempo suficiente para la formación del complejo C-Ab-T, la mezcla se desplaza hasta el blíster 346 a través del canal 338, en el que se despliega un imán 350 alojado en el instrumento, capturando las perlas complejadas en el mismo. El fluido restante se desplaza hasta el depósito 322 de desechos, a través del canal 339. Opcionalmente, el tampón de prelavado de la cámara 392c se desplaza hasta el blíster 346 a través del canal 345, el imán 350 se retira y las perlas magnéticas se lavan suavemente desplazando el fluido entre blísteres 344 y 346. El imán 350 se despliega de nuevo y las perlas se capturan de nuevo en el blíster 346.

A continuación, el émbolo 368d se presiona desplazando los anticuerpos indicadores conjugados con el molde de

ácido nucleico (R-Ab-ADN) hasta el blíster 346, se retira el imán 350 y se mezclan suavemente el C-Ab-T y el R-Ab-ADN desplazándose de manera ilustrativa entre los blísteres 344 y 346 a través del canal 345 y se incuban tal como se describió anteriormente. Después de la formación del complejo ternario (C-Ab-T-R-Ab-ADN), el imán 350 se despliega una vez más, capturando el complejo ternario en el blíster 346, y el fluido restante se desplaza hasta el blíster 322 de desechos.

El complejo ternario se lava entonces utilizando el tampón de lavado de la cámara 392e, tal como se describió anteriormente para el prelavado. El imán 350 se despliega de nuevo, capturando el complejo ternario en el blíster 346, y el fluido restante se desplaza hasta el blíster 322 de desechos. El lavado se repite diversas veces, utilizando el tampón de lavado de las cámaras 392f a 392k. Así, en el ejemplo ilustrativo de la figura 12, se completan siete lavados. Sin embargo, tal como se comentó anteriormente, más o menos lavados pueden ser deseables, dependiendo de la aplicación en particular.

Tal como se ilustra en el esquema de inmuno-PCR II que se muestra en la figura 11, el anticuerpo indicador se conjuga directamente con el molde de ácido nucleico. Se entiende que el anticuerpo indicador en cualquiera de los ejemplos comentados en el presente documento podría unirse al molde de ácido nucleico mediante cualquiera de una variedad de maneras, entre las que se incluyen enlaces covalentes y no covalentes directos e indirectos. Además, el anticuerpo indicador podría unirse al ácido nucleico a través de una variedad de mecanismos entre los que se incluyen, por ejemplo, la utilización de anticuerpos secundarios, tal como se ilustra en el esquema de inmuno-PCR I de la figura 11. Si se utilizan anticuerpos secundarios u otros mecanismos de acoplamiento, puede ser conveniente añadir puertos adicionales y etapas de lavado adicionales.

La mezcla maestra de PCR de primera etapa, tal como se describió anteriormente, se despliega, a continuación, en el blíster 346 mediante la activación del émbolo 368k, y el imán 350 se retira una vez más. Si se desea una mezcla suave, el fluido se puede desplazar entre los blísteres 346 y 364 a través del canal 347. Aunque la mezcla puede tener lugar entre los blísteres 346 y 344 como anteriormente, en el ejemplo ilustrativo, la mezcla se realiza entre los blísteres 346 y 364. Esto ayuda a reducir la reintroducción de complejos de anticuerpos indicadores no unidos que pueden residir en el blíster 344. A continuación, la muestra se desplaza hasta el blíster 364. Una vejiga situada por encima 364 se presuriza suavemente para desplazar el blíster 364 en contacto con un dispositivo de calentamiento/enfriamiento, tal como un dispositivo Peltier, y la muestra se someterá a termociclado, tal como se comentó anteriormente para la PCR de primera etapa. Tal como se comentó anteriormente en el ejemplo anterior, la PCR de primera etapa puede ser innecesaria con la iPCR descrita actualmente, el blíster 364 y su calentador asociado se pueden omitir, y todos los lavados podrían tener lugar de manera ilustrativa mediante mezcla entre los blísteres 344 y 346. Si la PCR de primera etapa se omite, la dilución, tal como se comenta a continuación, también se puede omitir.

La mayor parte de la muestra amplificada se desplaza hasta el blíster 322 de desechos, dejando parte de la muestra amplificada en el blíster 364 para que se diluya. Se entiende que si restricciones de espacio u otras consideraciones limitan el tamaño del blíster 322, los blísteres 344 y 346 se pueden utilizar para contener los desechos restantes. La pequeña cantidad de muestra amplificada restante se mezcla con el tampón de dilución de la cámara 392m, que se ha desplazado hasta el blíster 366 a través del canal 349. La muestra y el tampón de dilución se pueden mezclar suavemente entre los blísteres 364 y 366, a través del canal 355. Si se desea una dilución adicional, la dilución se puede repetir utilizando el tampón de dilución de la cámara 392n. Finalmente, parte de la muestra diluida se desplaza hasta el depósito 322 de desechos y la muestra diluida restante se mezcla con la mezcla maestra de PCR de segunda etapa de la cámara 392o. Después de mezclar, la muestra se desplaza hasta los diversos blísteres 382 de segunda etapa de bajo volumen, en las que se proporcionan cebadores de segunda etapa, tal como se comentó anteriormente. En la presente configuración, el blíster 383 se puede utilizar para un control negativo y el blíster 384 se puede utilizar para un control positivo, tal como se comentó anteriormente en el ejemplo anterior de iPCR. La PCR de segunda etapa y el análisis tienen lugar tal como se describió anteriormente en el ejemplo anterior de iPCR.

EJEMPLO 6 PCR E iPCR COMBINADAS

En algunas circunstancias, puede ser deseable someter a prueba antígenos y ácidos nucleicos en un conjunto de reacción. Por ejemplo, un ataque terrorista puede emplear diversos agentes para matar a muchas personas. Al responder al ataque, se puede desconocer si el agente causante es un virus, una bacteria u otro organismo, o si el agente causante es una toxina. El sistema de entorno cerrado de las bolsas de la presente invención es muy adecuado para tal utilización. Tanto la PCR como la iPCR pueden tener lugar dentro de una única bolsa, lo que permite la detección simultánea de diversos agentes biológicos y antigénicos.

La figura 13 muestra una bolsa 410 que es similar a la bolsa 210 de la figura 6. La bolsa 410 ilustrativa tiene todas los blísteres de la bolsa 210, pero también incluye los blísteres 430, 431, 432 y 433. La bolsa 410 también tiene un accesorio 490 más grande, que tiene veinte cámaras 492 con veinte émbolos 468 correspondientes. Tal como anteriormente, el accesorio podría incluir puertos de inyección independientes para cada cámara, o diversas cámaras podrían tener canales de conexión. Diversas combinaciones de los mismos están dentro del alcance de la presente invención. El instrumento para la bolsa 410 será similar al instrumento 800, excepto en que se necesitarán accionadores neumáticos adicionales para los blísteres 430, 431, 432 y 433 y los canales 436, 457, 473, 486, 487 y

488, así como dos imanes retráctiles 451 y 454 adicionales adyacentes a los blísteres 433 y 431, respectivamente.

En este ejemplo, las cámaras se cargarían de la siguiente manera. El tampón de lavado de iPCR se proporcionaría en las cámaras 492a a 492e y 492j. La muestra que se fuese a someter a prueba se inyectaría en la cámara 492f. Los anticuerpos de captura (C-Ab) conjugados con perlas magnéticas se proporcionan en la cámara 492g. Se proporciona un tampón de prelavado opcional en la cámara 492h. Se proporcionan anticuerpos indicadores conjugados con su molde de oligonucleótido (R-Ab-ADN) respectivo en la cámara 492i. Se proporciona un tampón de lisis celular en la cámara 492k. Se proporcionan perlas magnéticas de unión a ácido nucleico en la cámara 492l. Se proporcionan tampones de lavado de ácidos nucleicos en las cámaras 492m y 492n. Se proporciona un tampón de elución de ácidos nucleicos en la cámara 492o. Se proporciona una mezcla maestra de PCR de primera etapa en la cámara 492p. Se proporciona un tampón de dilución en las cámaras 492q y 492r. Se proporciona una mezcla maestra de PCR de segunda etapa en la cámara 492s. Se proporcionan controles, tal como se comentó anteriormente con respecto a la figura 6, en la cámara 492t. Se entiende que esta disposición es ilustrativa y que son posibles otras configuraciones. Además, como con los otros ejemplos comentados anteriormente, uno o varios de estos componentes se pueden proporcionar secados en una o varias de los blísteres de la bolsa 410.

Una vez que la muestra se carga en la cámara 492f y la bolsa 410 se carga en el instrumento, se presionan los émbolos 468f y 468g, desplazando la muestra y el C-Ab a través del canal 436 hasta el blíster 430. La muestra y los anticuerpos de captura se pueden mezclar desplazándolos suavemente entre los blísteres 430 y 431 y, a continuación, se incubaron tal como se describió anteriormente, para fomentar la formación de complejos C-Ab-T. La muestra se desplaza hasta el blíster 431 y se activa el imán 454, capturando los complejos C-Ab-T en la misma. Por tanto, las toxinas u otros antígenos seleccionados como diana se capturan ahora en el blíster 431. Cabe destacar que, en la realización ilustrativa, la superficie de la porción de perla magnética de las perlas magnéticas acopladas con los anticuerpos de captura es diferente de la superficie de las perlas magnéticas de unión a ácido nucleico, y las perlas magnéticas acopladas con los anticuerpos de captura están configuradas de manera ilustrativa para no unirse a ácidos nucleicos. El fluido restante se desplaza, a continuación, hasta el blíster 422 de tres lóbulos a través del canal 473. A continuación, este fluido se puede procesar y someter a ensayo para detectar la presencia de ácidos nucleicos diana. Esta división de la muestra puede ser problemática si un antígeno seleccionado como diana es un antígeno de superficie de un organismo seleccionado como diana en la detección mediante PCR. En tal situación, puede ser deseable elegir entre la detección de antígeno y la detección de ácidos nucleicos para ese organismo, o utilizar bolsas independientes para PCR e iPCR. Alternativamente, la muestra se puede lisar antes de la captura de anticuerpos. Si la lisis interfiere con la captura de anticuerpos, por ejemplo al cambiar la conformación del antígeno, entonces la muestra se puede dividir y sólo una porción de la muestra se puede lisar antes de la captura de anticuerpos. Si se desea un prelavado del C-Ab-T, se activa el émbolo 468h y el tampón de prelavado de la cámara 492h se desplaza hasta el blíster 431. Se retira el imán 454, el fluido se mezcla entre los blísteres 430 y 431, y el imán 454 se despliega una vez más, capturando el complejo C-Ab-T en el blíster 431. El tampón de lavado, que contiene ahora posiblemente células que habían quedado después de la captura, se desplaza hasta el blíster 422 de tres lóbulos, junto con el resto del material no capturado.

Se entiende que la muestra se divide ahora en dos partes para un procesamiento por separado. Los antígenos presentes en la muestra se capturan ahora en los complejos C-Ab-T en el blíster 431, mientras que las células, los virus y los ácidos nucleicos libres presentes en la muestra se encuentran ahora en el blíster 422 de tres lóbulos en espera de lisis. Las dos porciones de la muestra se procesan por separado hasta que ambas estén listas para la PCR de primera etapa. Estos procesos pueden tener lugar en cualquier orden o simultáneamente. Sin embargo, en el presente ejemplo, la lisis celular debe tener lugar antes del procesamiento sustancial de los complejos C-Ab-T, de modo que el blíster de tres lóbulos pueda funcionar entonces como depósito de desechos. Si se utiliza un depósito de desechos independiente, la lisis celular se puede retrasar hasta después de que se hayan procesado los complejos C-Ab-T, si se desea.

El tampón de lisis de la cámara 492k se desplaza hasta un blíster 422 de tres lóbulos a través del canal 436. Las vejigas adyacentes a los blísteres del blíster 422 de tres lóbulos se presurizan tal como se describió anteriormente con respecto a la figura 6, impulsando colisiones de alta velocidad, cizallando la muestra y liberando ácidos nucleicos. Una vez que las células se han lisado adecuadamente, el émbolo 468i se activa y las perlas magnéticas de unión a ácido nucleico almacenadas en la cámara 492l se inyectan a través del canal 436 en un blíster 220 de tres lóbulos. La muestra se mezcla con las perlas magnéticas y se permite que se incube la mezcla. A continuación, el procesamiento continúa tal como se describió anteriormente con respecto a la bolsa de la figura 6. La mezcla de muestra y perlas se fuerza a través del canal 438 al blíster 444, a continuación, a través del canal 443 y al blíster 446, en el que un imán retráctil 450 captura las perlas magnéticas de la solución. A continuación, el líquido no capturado se expulsa del blíster 446 y regresa a través del blíster 444 y al blíster 422, que se utiliza ahora como un receptáculo de desechos. El émbolo 468m se puede activar para proporcionar una solución de lavado al blíster 444 a través del canal 445, y luego al blíster 446 a través del canal 447. El imán 450 se retrae y las perlas magnéticas se lavan desplazando las perlas hacia atrás y hacia adelante desde los blísteres 444 y 446. Una vez las perlas magnéticas se lavan, las perlas magnéticas se vuelven a capturar en el blíster 446 mediante la activación del imán 450, y la solución de lavado se desplaza, a continuación, hasta el blíster 422. Este proceso se puede repetir utilizando reactivos de lavado en las cámaras 492n. Sin embargo, se entiende que más o menos lavados están dentro del alcance de la presente invención. Después del lavado, el tampón de elución almacenado en la cámara

492o se desplaza a través del canal 447 hasta el blíster 448, y el imán 450 se retrae. La solución se cicla entre los blísteres 446 y 448 a través del canal 452, rompiendo el sedimento de perlas magnéticas en el blíster 446 y permitiendo que los ácidos nucleicos capturados entren en solución. El imán 450 se activa una vez más, capturando las perlas magnéticas en el blíster 246, y la solución de ácidos nucleicos eluida se desplaza hasta el blíster 448.

Volviendo al blíster 431, los complejos C-Ab-T son capturados allí. El émbolo 468i se presiona y los anticuerpos indicadores conjugados con el molde de ácido nucleico (R-Ab-ADN) se introducen en el blíster 430, el imán 454 se retira y el C-Ab-T y el R-Ab-ADN se mezclan suavemente, desplazándose de manera ilustrativa entre los blísteres 430 y 431 a través del canal 457, y se incuban tal como se describió anteriormente. Después de la formación del complejo ternario (C-Ab-T-R-Ab-ADN), el imán 454 se despliega una vez más, capturando el complejo ternario en el blíster 431, y el fluido restante se desplaza hasta el blíster 422, que se utiliza ahora como depósito de desechos.

A continuación, el complejo ternario se lava utilizando el tampón de lavado de la cámara 492j, tal como se describió anteriormente, para el prelavado. El imán 454 se despliega de nuevo, capturando el complejo ternario en el blíster 446, y el fluido restante se desplaza hasta el blíster 422. El tampón de lavado adicional de la cámara 492a se inyecta en el blíster 432 a través del canal 486, el imán 454 se retira y el complejo ternario se resuspende mezclando los blísteres 431 y 432 de fluidos. A continuación, los fluidos se desplazan hasta el blíster 433 a través del canal 487 y el complejo ternario se captura a través de la activación del imán 451. Los fluidos de desecho se desplazan de vuelta a través de los blísteres 433 y 432 hasta el blíster 422. A continuación, se introduce tampón de lavado adicional en el blíster 432 desde la cámara 492b y se repite el lavado mezclando entre los blísteres 432 y 433. El lavado se repite diversas veces utilizando el tampón de lavado de las cámaras 492c a 492e. Así, en el ejemplo ilustrativo de la figura 13, se completan seis lavados. Sin embargo, tal como se comentó anteriormente, pueden ser deseables más o menos lavados, dependiendo de la aplicación en particular. Se entiende que los blísteres 432 y 433 se utilizan para minimizar la contaminación de lavados anteriores. Si se desea, los blísteres 432 y 433 se pueden omitir y los tampones de lavado contenidos en las cámaras 492a a 492e se pueden proporcionar directamente al blíster 430 o 431, con mezcla entre los blísteres 430 y 431.

El complejo ternario de anticuerpo lavado se captura ahora en el blíster 433 y los ácidos nucleicos eluidos se encuentran ahora en el blíster 448. Cabe destacar que el complejo ternario de anticuerpo y los ácidos nucleicos eluidos se pueden procesar mediante PCR en reacciones independientes, a través de conjuntos separados de PCR de segunda etapa. Sin embargo, en el presente ejemplo, el complejo ternario de anticuerpo y los ácidos nucleicos eluidos se combinan para el análisis por PCR. La mezcla maestra de PCR de primera etapa, que contiene todos los cebadores de primera etapa, se inyecta desde la cámara 492p en el blíster 448. A continuación, la muestra de ácido nucleico se mezcla entre los blísteres 448 y 464 a través del canal 453. Si se desea la PCR de primera etapa para los componentes de iPCR, la muestra de ácido nucleico se desplaza, a continuación, hasta el blíster 433, se retira el imán 451, y la muestra reunificada se mezcla de manera ilustrativa entre los blísteres 433 y 464. A continuación, la muestra se desplaza hasta el blíster 464, en el que la muestra se somete a termociclado, tal como se comentó anteriormente. A continuación, la muestra amplificada se puede diluir una o varias veces, utilizando los tampones de dilución de las cámaras 492q y 492r. Antes de cada dilución, una porción grande de la muestra amplificada se retira del blíster 464 a través del canal 447 o del canal 488. Con cada adición de tampón de dilución, la muestra se mezcla entre los blísteres 464 y 466 a través del canal 462. Después de la dilución, la totalidad o una porción de la muestra se mezcla con la mezcla maestra de PCR de segunda etapa de la cámara 492s, tal como se describió en los ejemplos anteriores.

A continuación, la muestra se desplaza desde el blíster 466 a través del canal 465 hasta los blísteres 482 en la zona 480 de amplificación de segunda etapa. Los blísteres 482 habían recibido cada una previamente un par de cebadores, algunos de los pares de cebadores específicos para ácidos nucleicos diana, mientras que otros pares de cebadores específicos para un oligonucleótido conjugado con un anticuerpo indicador. Si se desea, se pueden dedicar dos blísteres 482 a los controles de iPCR, tal como se comentó anteriormente. Los blísteres 483 se pueden utilizar para controles de PCR, tal como se comentó anteriormente, con respecto a los blísteres 283 de la figura 6. Aunque se muestran 18 blísteres 482, se entiende que se puede utilizar cualquier número de blísteres 482. La amplificación por PCR de segunda etapa avanza, tal como se comentó anteriormente, con respecto a la figura 6. Se entiende que el análisis mediante PCR puede utilizar curvas de amplificación, curvas de fusión o una combinación de las mismas, mientras que el análisis mediante iPCR puede utilizar umbrales cruzados, tal como se comentó anteriormente. Otros procedimientos de análisis están dentro del alcance de la presente invención.

Bibliografía

1. Wittwer CT, Fillmore GC, Garling DJ. Minimizing the time required for DNA amplification by efficient heat transfer to small samples. *Anal Biochem.* 1990 1 de Mayo de 1990; 186(2):328-31.
2. Wittwer CT, Garling DJ. Rapid cycle DNA amplification: time and temperature optimization. *Biotechniques.* Enero de 1991;10(1):76-83.
3. Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques.* Enero de 1997;22(1):130-1, 134-8.
4. Wittwer CT, Ririe KM, Andrew RV, David DA, Gundry RA, Balis UJ. The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *Biotechniques.* Enero de 1997;22(1):176-81

5. Gundry CN, Vandersteen JG, Reed GH, Pryor RJ, Chen J, Wittwer CT. Amplicon melting analysis with labeled primers: a closed-tube method for differentiating homozygotes and heterozygotes. *Clin Chem*. Marzo de 2003;49(3):396-406.
6. Wittwer CT, Reed GH, Gundry CN, Vandersteen JG, Pryor RJ., High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clin Chem*. Junio de 2003;49(6 Pt 1):853-60.
7. McKinney JT, Longo N, Hahn S, Matern D, Rinaldo P, Dobrowolski SF. Comprehensive analysis of the human medium chain acyl-CoA dehydrogenase gene. *Mol Gen Metab*. In press
8. Dobrowolski SF, Amat di San Filippo C, McKinney JT, Wilcken B, Longo N Identification of novel mutations in the *SLC22A5* gene in primary carnitine deficiency with dye-binding/high-resolution thermal denaturation, Human Mutation, submitted
9. McKinney JT, Saunders C, Dobrowolski SF, High-resolution melting analysis of the human galactose-1-phosphate uridyl transferase gene, en preparación
10. <http://www.defenselink.mil/contracts/2003/ct20030925.html>
11. Poritz MA, Abbott R, Gerber T, Thatcher S, Bird A, Tuck A, Newswander AM, Belisle S, Ririe K, A Hand-held, Battery-operated Real-time PCR Machine, American Society for Microbiology Annual Meeting, Baltimore MD, Marzo 9-12, 2003
12. Elnifro EM, Ashshi AM, Cooper RJ, Klapper PE. Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. *Clin Microbiol Rev*. Octubre de 2000;13(4):559-70. Review.
13. Elnifro EM, Cooper RJ, Klapper PE, Yeo AC, Tullo AB. Multiplex polymerase chain reaction for diagnosis of viral and chlamydial keratoconjunctivitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000 Jun;41(7):1818-22.
14. Giaever, G., *et al*. Genomic profiling of drug sensitivities via induced haploinsufficiency. *Nature Genetics*. 1999, 21, 278-283
15. Winzeler, E., *et al* Functional Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* Genome by Gene Deletion and Parallel Analysis. *Science*. 1999. 285, 901-906.
16. Sano, T., C.L. Smith, and C.R. Cantor, Immuno-PCR: very sensitive antigen detection by means of specific antibody-DNA conjugates. *Science*, 1992. 258(5079): pág. 120-2.
17. Niemeyer, C.M., M. Adler, and R. Wacker, Immuno-PCR: high sensitivity detection of proteins by nucleic acid amplification. *Trends Biotechnol*, 2005. 23(4): pág. 208-16.
18. Adler, M., Immuno-PCR as a clinical laboratory tool. *Adv Clin Chem*, 2005. 39: pág. 239-92.
19. Barletta, J.M., *et al*, Detection of ultra-low levels of pathologic prion protein in scrapie infected hamster brain homogenates using real-time immuno-PCR. *J Virol Methods*, 2005. 127(2): pág. 154-64.
20. Adler, M., *et al*, Detection of Rotavirus from stool samples using a standardized immuno-PCR ("Imperacer") method with end-point and real-time detection. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. 333(4): pág. 1289-94.
21. Lind, K. and M. Kubista, Development and evaluation of three real-time immuno-PCR assemblages for quantification of PSA. *J Immunol Methods*, 2005. 304(1-2): pág. 107-16.
22. Schiavo, S., *et al*, Comparison of fluorometric detection methods for quantitative polymerase chain reaction (PCR). *J Immunoassay Immunochem*, 2005. 26(1): pág. 1-12.
23. Barletta, J.M., D.C. Edelman, and N.T. Constantine, Lowering the detection limits of HIV-1 viral load using real-time immuno-PCR for HIV-1 p24 antigen. *Am J Clin Pathol*, 2004.122(1): pág. 20-7.
24. McKie, A., *et al*, A quantitative immuno-PCR assay for the detection of mumps-specific IgG. *J Immunol Methods*, 2002. 270(1): pág. 135-41.
25. Chao, H.Y., *et al*, A highly sensitive immunopolymerase chain reaction assay for *Clostridium botulinum* neurotoxin type A. *Toxicon*, 2004. 43(1): pág. 27-34.
26. Wu, H.C., *et al*, Detection of *Clostridium botulinum* neurotoxin type A using immuno-PCR. *Lett Appl Microbiol*, 2001. 32(5): pág. 321-5.
27. Liang, H., *et al*, A highly sensitive immuno-PCR assay for detecting Group A *Streptococcus*. *J Immunol Methods*, 2003. 279(1-2): pág. 101-10.
28. Adler, M., R. Wacker, and C.M. Niemeyer, A real-time immuno-PCR assay for routine ultrasensitive quantification of proteins. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003. 308(2): pág. 240-50.
29. Allen, R.C., *et al*, An immuno-PCR method for detecting *Bacillus thuringiensis* CryIAC toxin. *J Immunol Methods*, 2006. 308(1-2): pág. 109-15.
30. Hendrickson, E.R., *et al*, High sensitivity multianalyte immunoassay using covalent DNA-labeled antibodies and polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res*, 1995. 23(3): pág. 522-9.
31. Joerger, R.D., *et al*, Analyte detection with DNA-labeled antibodies and polymerase chain reaction. *Clin Chem*, 1995. 41(9): pág. 1371-7.
32. Hujer, *et al*, Multi-drug Resistant *Acinetobacter* spp. Isolates from Military and Civilian Patients Treated at the Walter Reed Army Medical Center: Analysis of Antibiotic Resistance Genes. *Antimicrob Agents Chemother*. 25 de Septiembre de 2006.
33. Sanchez *et al*, A multiplex assay with 52 single nucleotide polymorphisms for human identification. *Electrophoresis*. 2006 v27 pág.1713-24.
34. Zhou *et al*, Closed-tube genotyping with unlabeled oligonucleotide probes and a saturating DNA dye. *Clin Chem*. 2004 50 pág.1328-35.

Aunque en el presente documento se hace referencia a PCR e iPCR, se entiende que los dispositivos y procedimientos descritos en el presente documento pueden ser adecuados para su utilización con otra amplificación de ácidos nucleicos u otros procedimientos de procesamiento biológico, tal como se conoce en la técnica,

- 5 particularmente procedimientos que se benefician de una reacción múltiplex de primera etapa y una reacción individual de segunda etapa. Entre las reacciones de segunda etapa no limitantes ilustrativas se incluyen la extensión de cebadores, que incluye la extensión de cebadores específica de alelo; terminaciones de extensión, que incluye la terminación por incorporación de uno o varios nucleótidos didesoxi; la incorporación de marcadores fluorescentes o no fluorescentes; y otras reacciones enzimáticas que requieren un cambio en los componentes de la mezcla de reacción o en las proporciones de los componentes, tales como PCR asimétrica, PCR específica de alelo, ensayos de invasores y otras químicas de detección o amplificación isotérmica.

REIVINDICACIONES

1. Recipiente para realizar reacciones de amplificación en un sistema cerrado que comprende una porción flexible que tiene una serie de blísteres en conexión de fluido a través de una serie de canales, y una serie de depósitos, conteniendo cada depósito un componente de reacción, y estando cada depósito en conexión de fluido, como mínimo, con una de la serie de blísteres, y un puerto sellable (12) configurado para recibir una muestra, estando el puerto sellable en conexión de fluido con una de la serie de blísteres, en el que el recipiente comprende: una zona (580) de reacción de alta densidad que comprende:
- 5 un canal (565),
- 10 una red (581) de alta densidad, que comprende, como mínimo, 50 pocillos (582) de reacción de alta densidad en conexión de fluido con el canal (565), en el que cada pocillo (582) de reacción de alta densidad comprende uno o varios reactivos,
- 15 una capa (587) sellada en un lado de la red de alta densidad y,
- una capa (585) de barrera sellada en el lado opuesto de la red, que minimiza la contaminación cruzada entre pocillos (582) de reacción de alta densidad tras la introducción de la muestra en la zona (580) de reacción de alta densidad, en el que la capa de barrera es una capa perforada (585) con una serie de perforaciones (586), en el que las perforaciones (586) se alinean con los pocillos (582) de reacción de alta densidad, minimizando el flujo a través de las perforaciones (586) en ausencia de una fuerza de vacío para forzar un fluido dentro o fuera de los pocillos (582) de reacción de alta densidad.
- 20 de reacción de alta densidad.
2. Recipiente, según la reivindicación 1, en el que el recipiente comprende una capa flexible (518) que se puede presionar contra los pocillos (582) de reacción de alta densidad para sellar una porción de la muestra en cada uno de la serie de pocillos (582) de reacción de alta densidad.
- 25 3. Recipiente, según la reivindicación 1, en el que la serie de pocillos (582) de reacción de alta densidad comprende, como mínimo, 120 pocillos (582) de reacción.
- 30 4. Recipiente, según la reivindicación 1, en el que los reactivos comprenden un par de cebadores de PCR.
5. Recipiente, según la reivindicación 4, en el que un pocillo contiene un ácido nucleico de control y un par de cebadores configurados para amplificar el ácido nucleico de control y, como mínimo, otro pocillo contiene los mismos cebadores pero no contiene el ácido nucleico de control.
- 35 6. Recipiente, según la reivindicación 5, en el que el ácido nucleico de control es un ácido nucleico sintético.
7. Recipiente, según la reivindicación 1, en el que los componentes de reacción se proporcionan secados.
- 40 8. Recipiente, según la reivindicación 1, en el que cada uno de un conjunto de pocillos (582) de reacción de alta densidad contiene un par diferente de cebadores de PCR.
9. Recipiente, según la reivindicación 8, que comprende, además:
- 45 una zona (20) de lisis celular configurada para lisar células o esporas ubicadas en la muestra, estando la zona (20) de lisis celular en conexión de fluido con el puerto sellable (12),
- una zona (40) de preparación de ácidos nucleicos en conexión de fluido con la zona (20) de lisis celular, estando la zona (40) de preparación de ácidos nucleicos configurada para purificar ácidos nucleicos y una zona (60) de reacción de primera etapa en conexión de fluido mediante una serie de canales con la zona (40) de preparación de ácidos nucleicos y mediante el canal (565) con la zona (580) de reacción de alta densidad, comprendiendo la zona de reacción de primera etapa (60) un blíster (161) de reacción de primera etapa configurada para la amplificación de primera etapa de la muestra.
- 50 10. Procedimiento para amplificar ácidos nucleicos en una muestra en el recipiente, según la reivindicación 1, que comprende las etapas de:
- 55 inyectar la muestra en la zona (580) de reacción de alta densidad a través del canal (565),
- introducir una porción de la muestra en cada uno de los pocillos (582) de reacción de alta densidad,
- 60 sellar las porciones de la muestra en los pocillos (582) de reacción de alta densidad, y
- someter a ciclado térmico la zona (580) de reacción de alta densidad, en el que se proporciona vacío en cada pocillo (582) de reacción, y las porciones de la muestra se introducen en cada uno de los pocillos (582) de reacción de alta densidad a través de las perforaciones.
- 65 11. Procedimiento, según la reivindicación 10, en el que el recipiente comprende, además:

una serie de cámaras de reacción en conexión de fluido que incluyen un blíster (161) de amplificación flexible de primera etapa, y uno o varios puertos sellables (515) en conexión de fluido con las cámaras de reacción, proporcionando los puertos sellables (515) el único acceso desde el exterior del recipiente a los blísteres de reacción, y

5 en el que antes de inyectar la muestra en la zona (580) de reacción de alta densidad, el procedimiento comprende, además:

inyectar la muestra en el recipiente a través de uno de los primeros puertos sellables (515) y sellar el primer puerto (515) después de inyectar la muestra,

10 mezclar los ácidos nucleicos en la muestra con componentes de reacción de PCR que incluyen una serie de pares de cebadores configurados para amplificar las dianas,

someter a ciclado térmico los ácidos nucleicos en la muestra en el blíster (161) de amplificación de primera etapa, y de manera posterior al ciclado térmico de la zona de reacción de alta densidad, y

15 detectar cuáles de los pocillos (582) de reacción de alta densidad contienen productos de amplificación de segunda etapa.

12. Procedimiento, según la reivindicación 10, en el que los componentes de reacción se proporcionan secados.

20 13. Procedimiento, según la reivindicación 10, en el que la red (581) de alta densidad se forma a partir de una lámina de plástico y la serie de pocillos (582) de reacción de alta densidad se forman en la lámina de plástico.

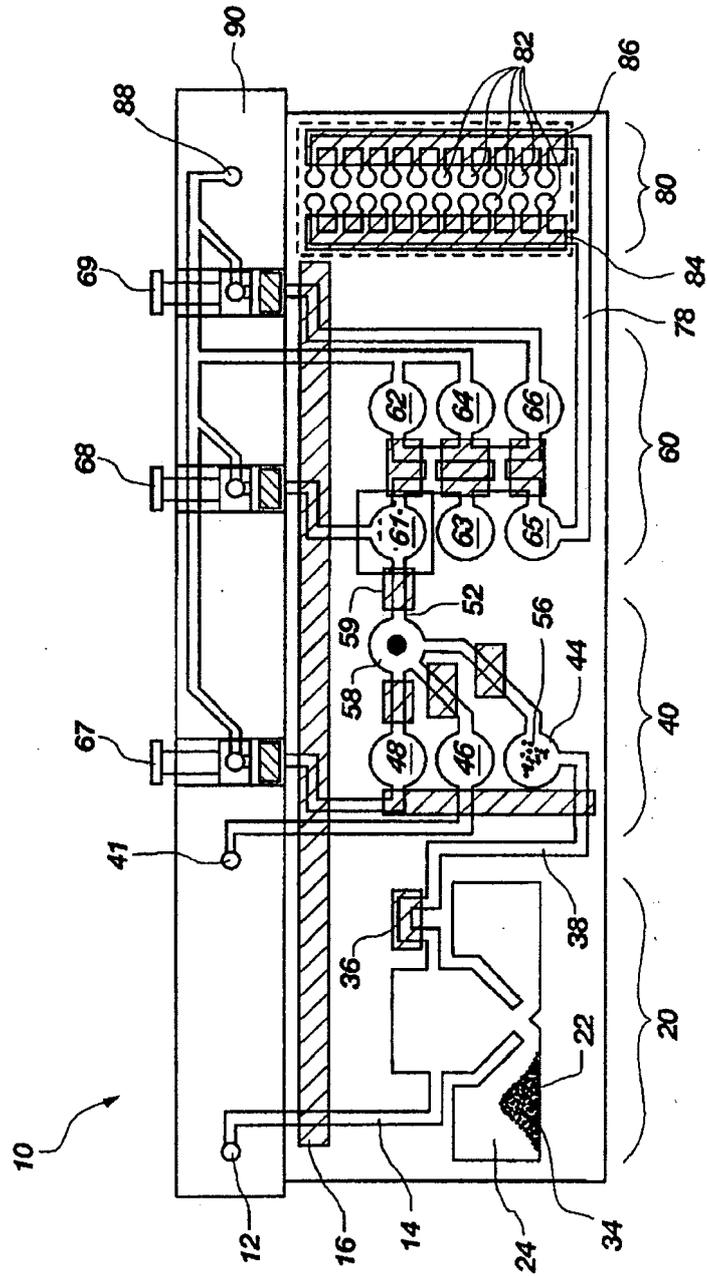


FIG. 1

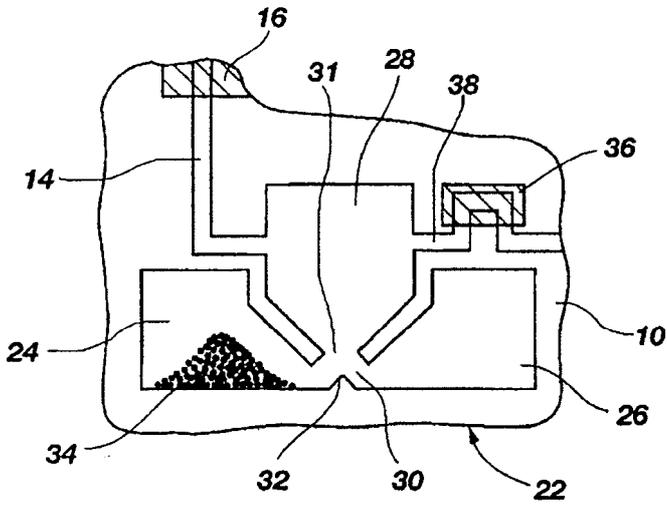


FIG. 2

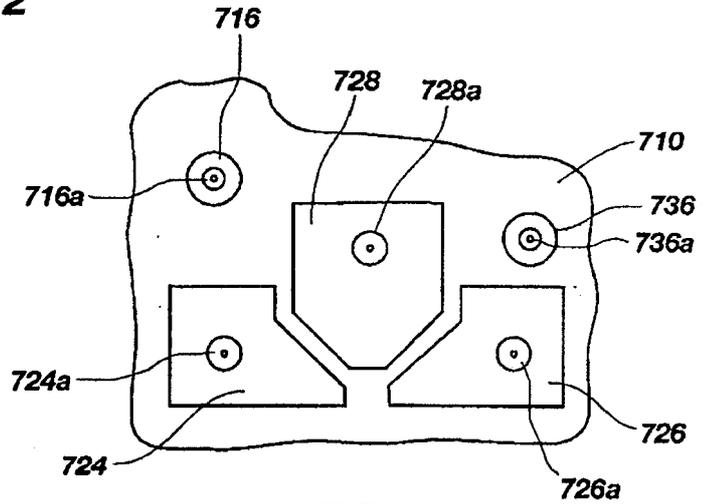


FIG. 2a

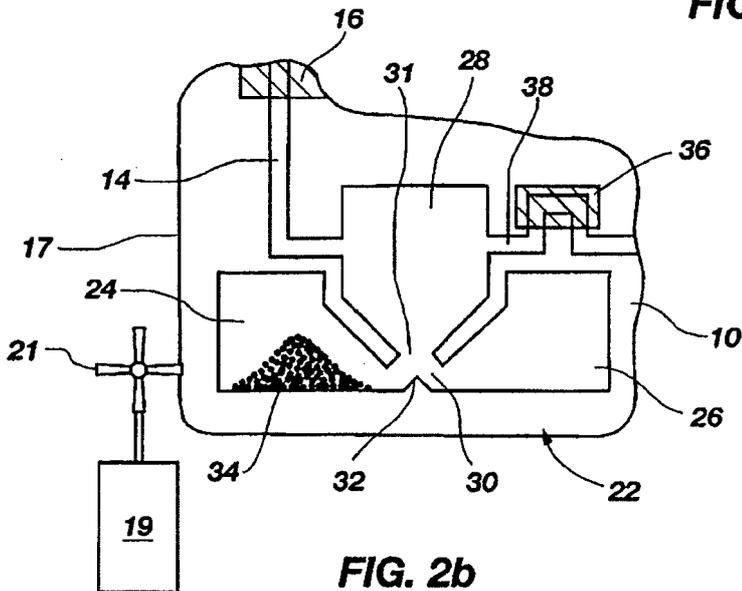


FIG. 2b

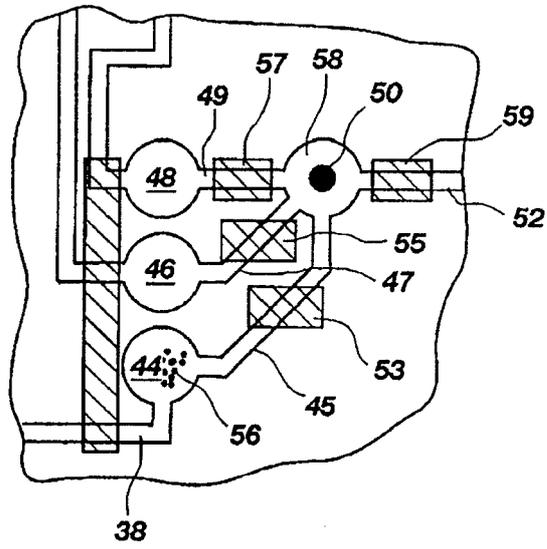


FIG. 3

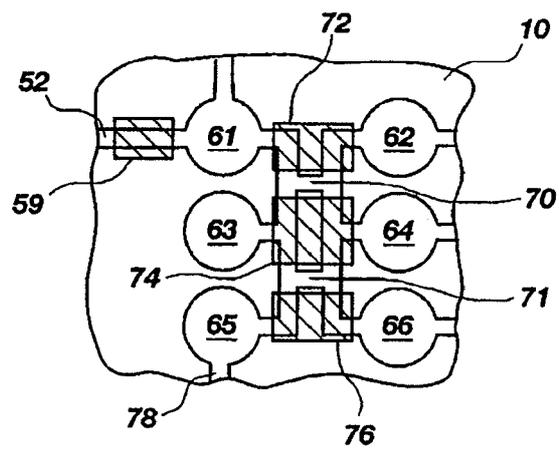


FIG. 4

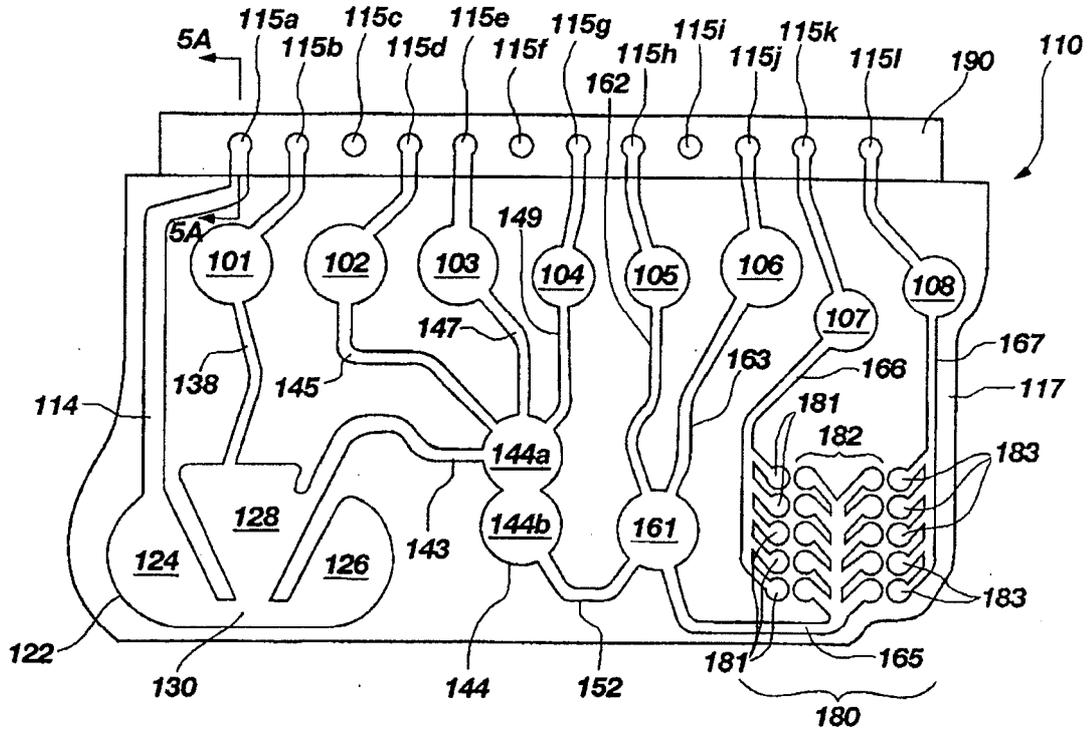


FIG. 5

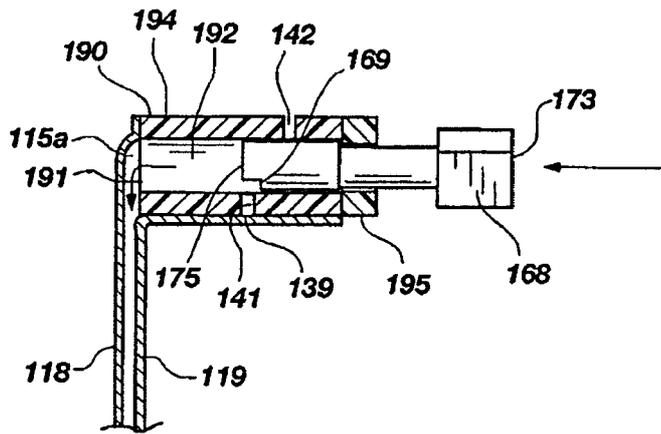


FIG. 5a

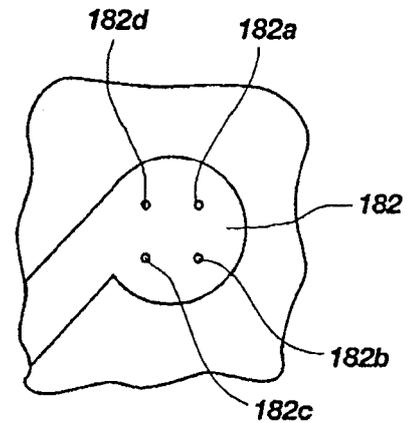


FIG. 5b

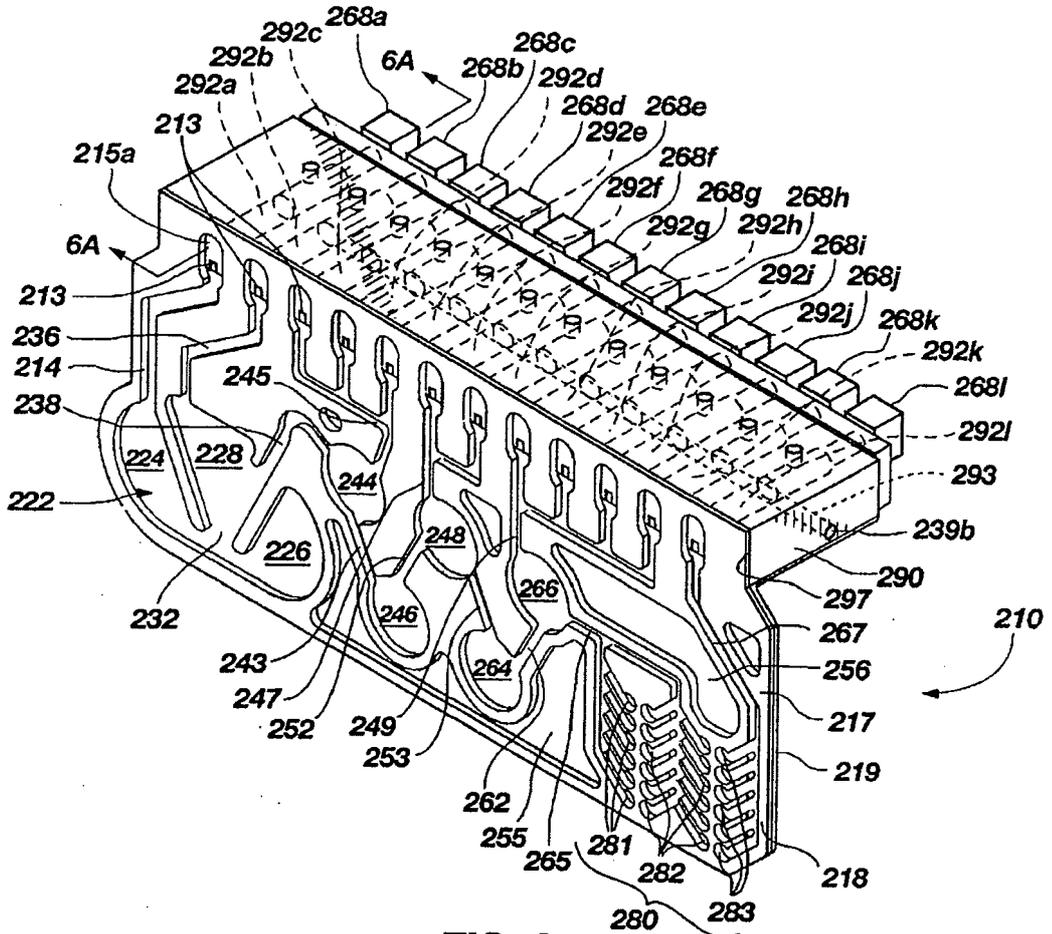


FIG. 6

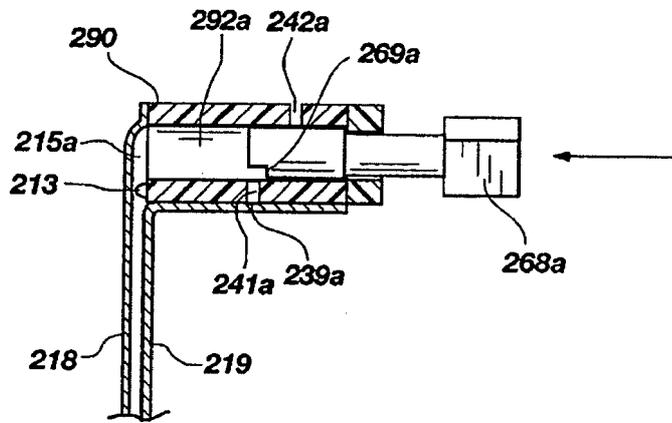


FIG. 6a

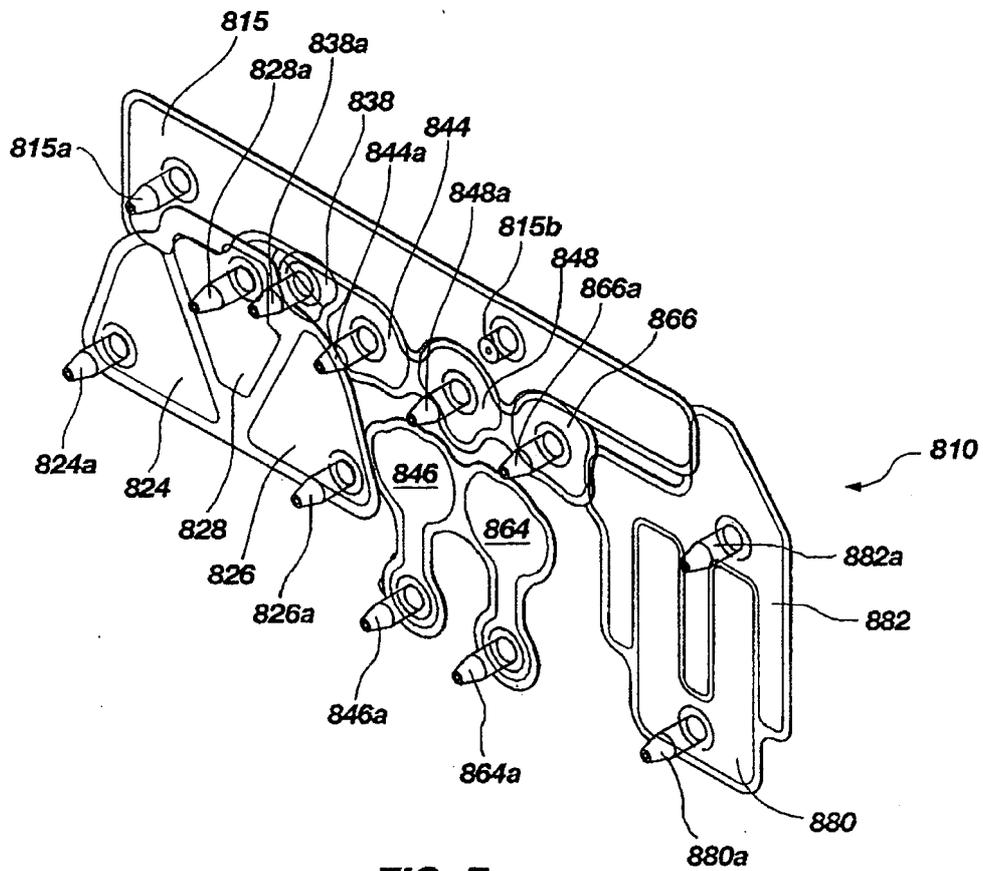


FIG. 7

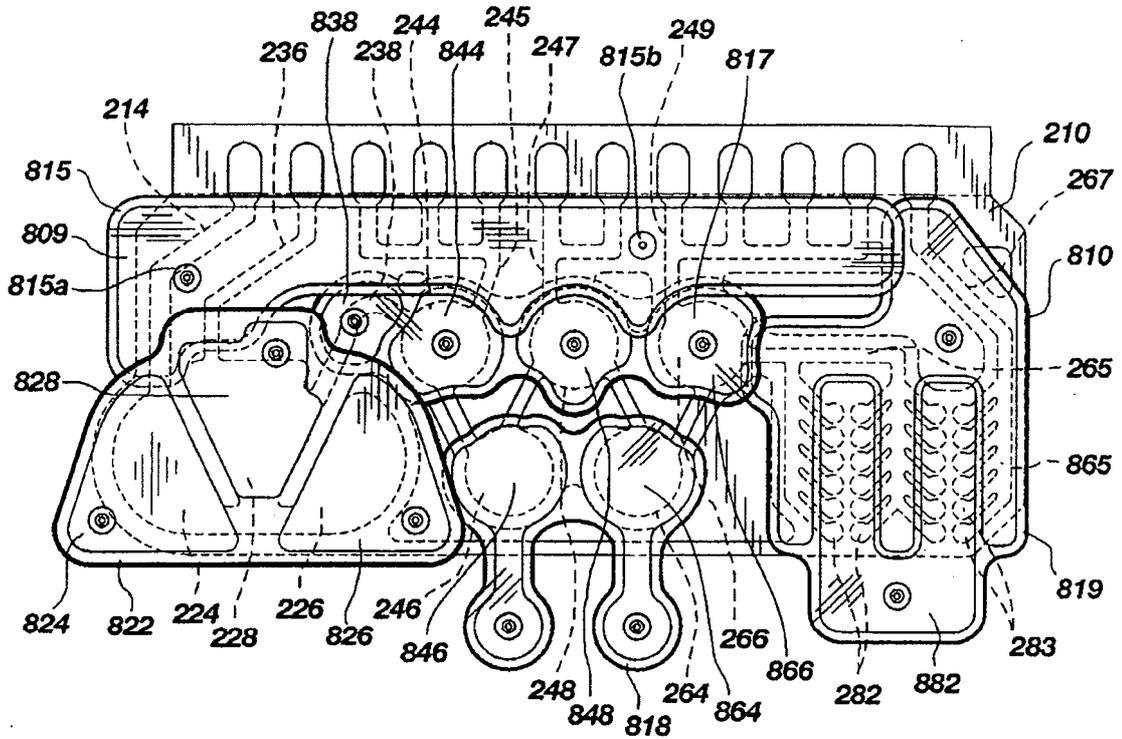


FIG. 9

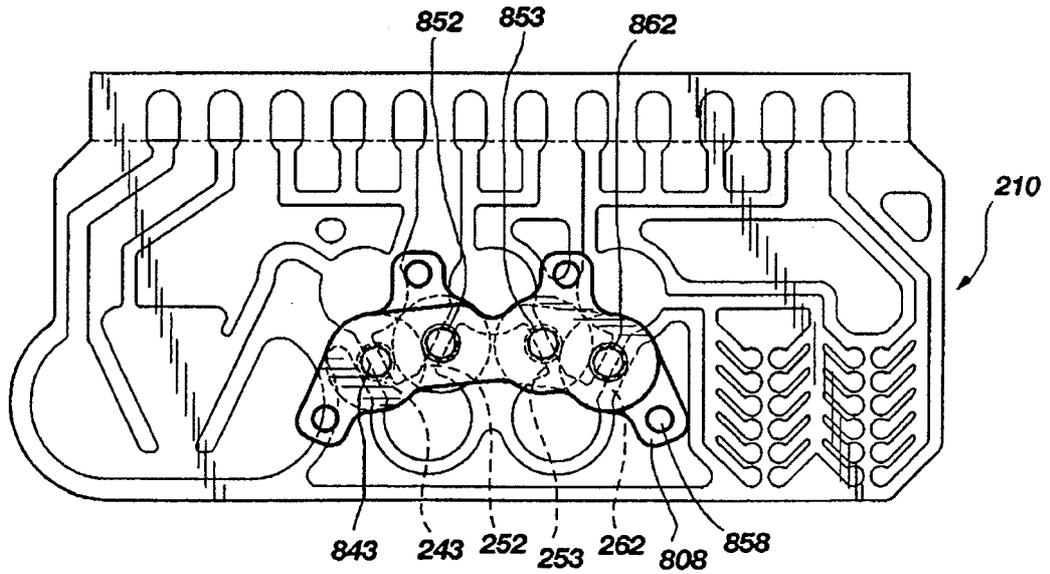


FIG. 10

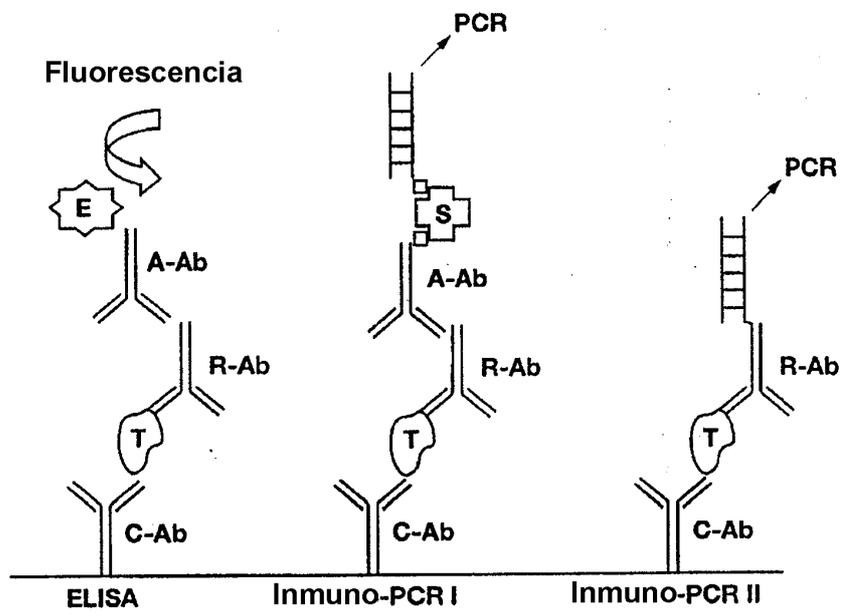


FIG. 11

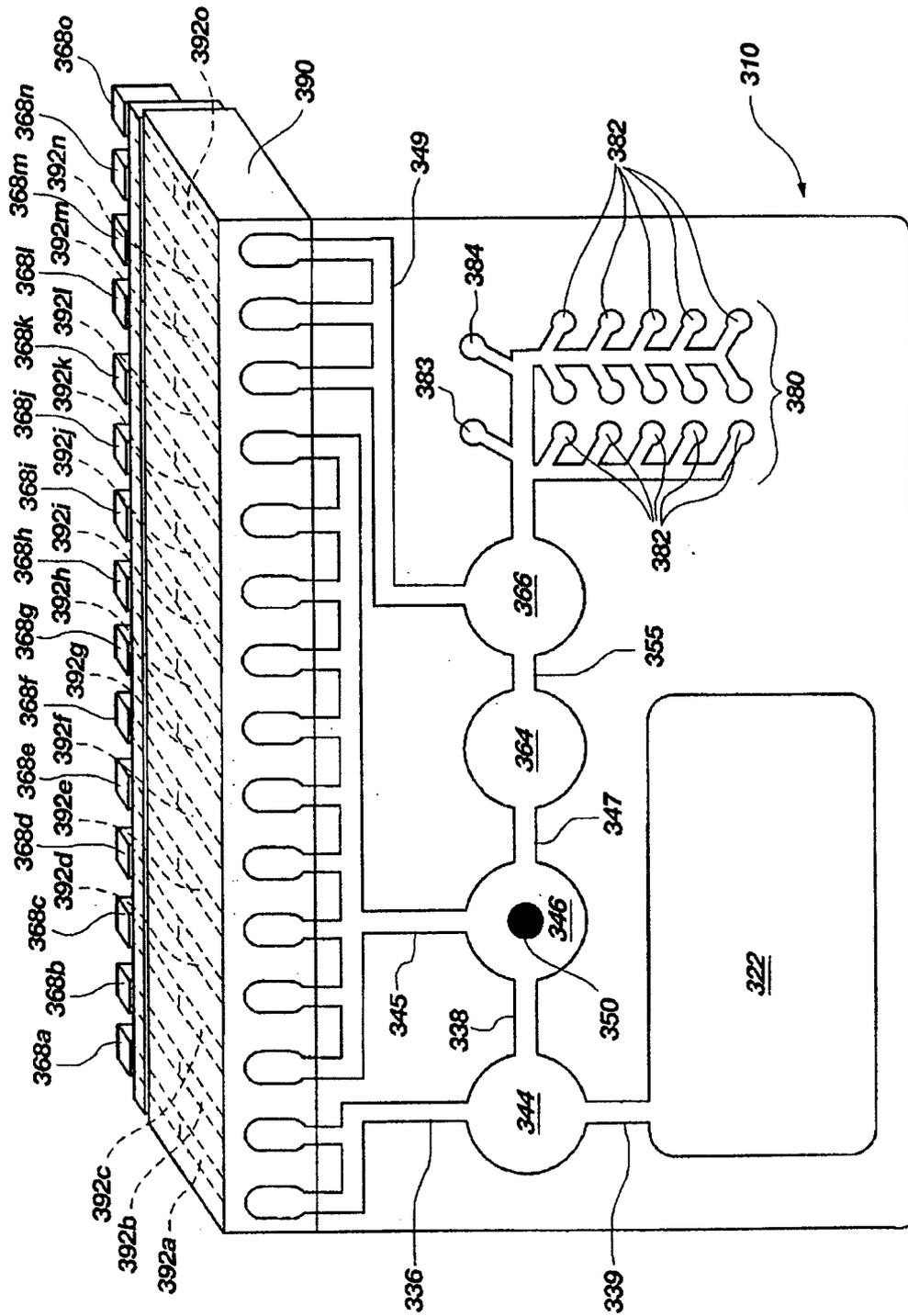


FIG. 12

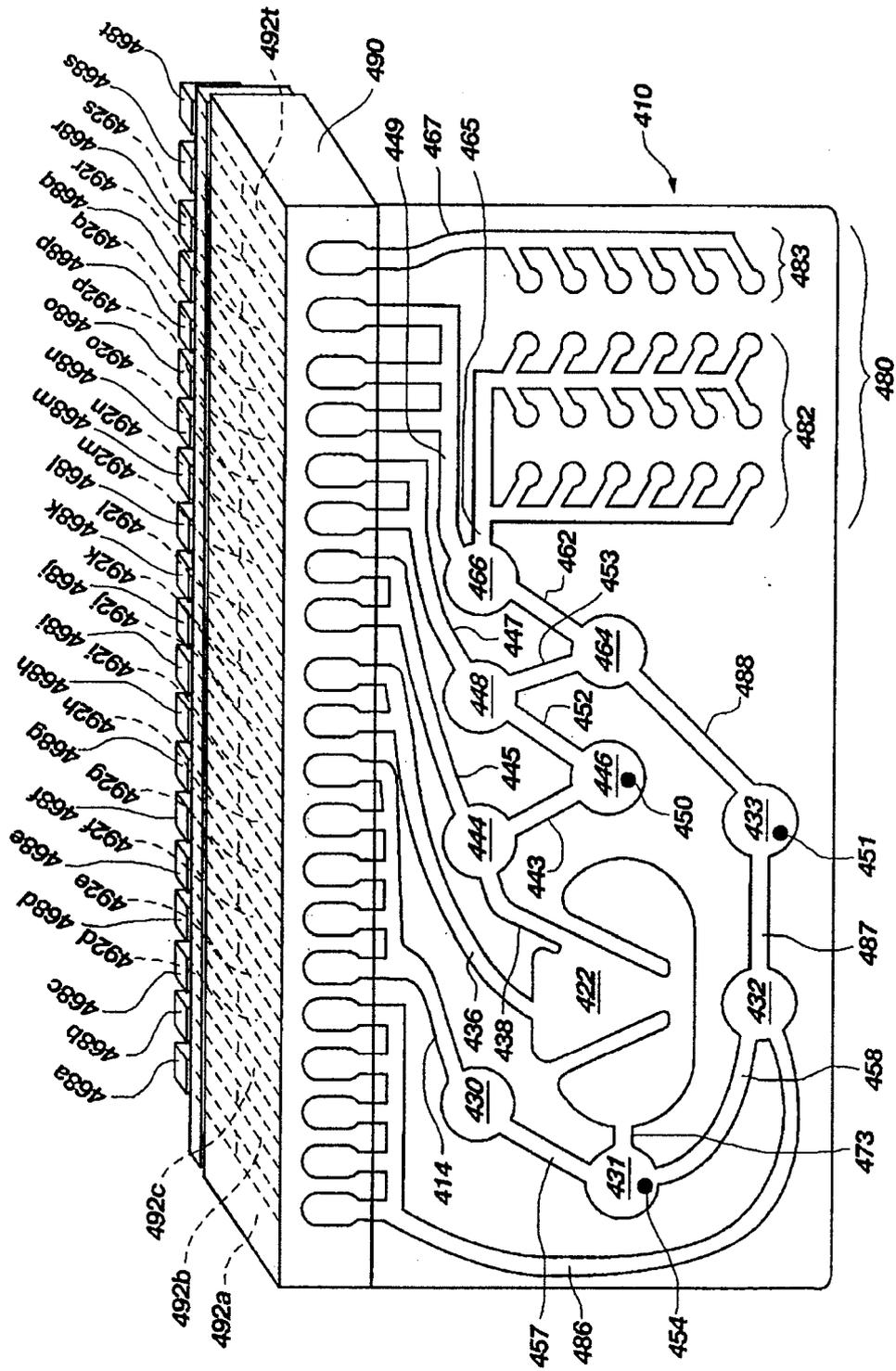


FIG. 13

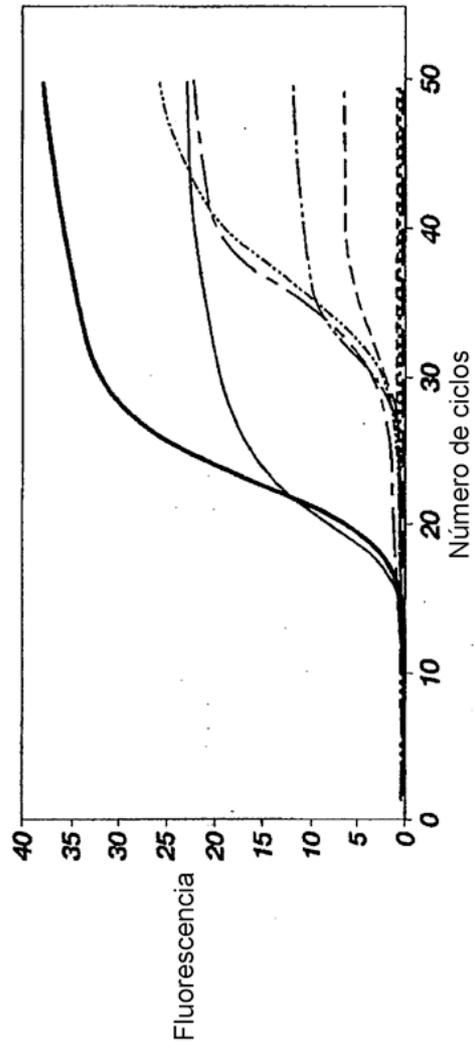


FIG. 14

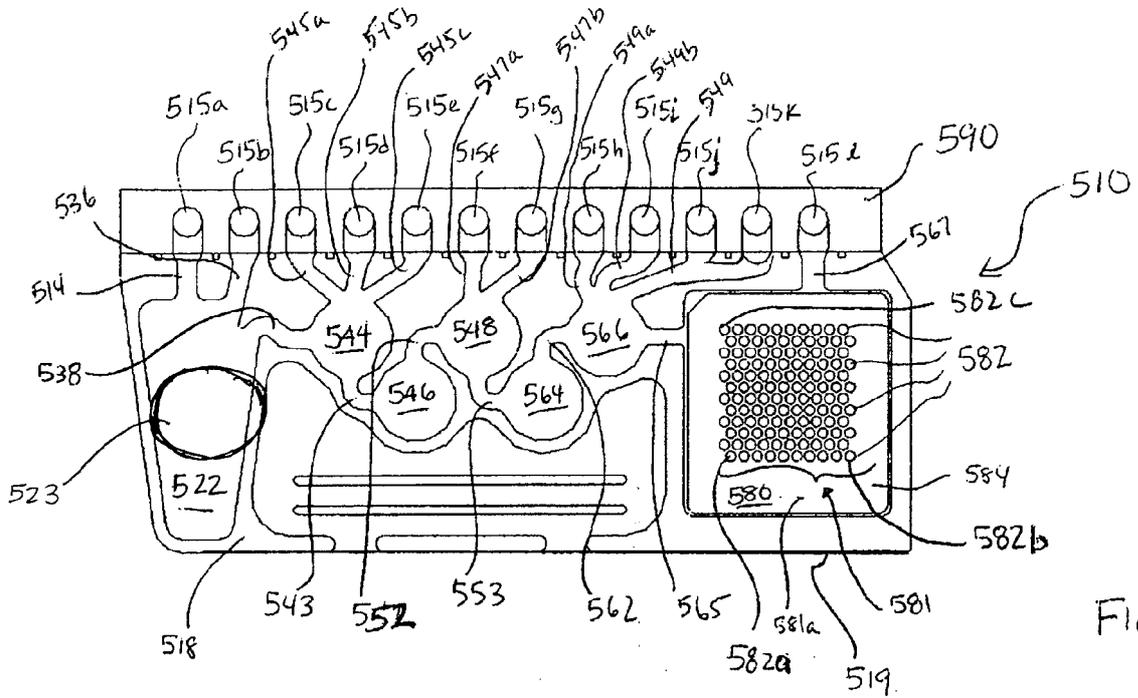


FIG. 15

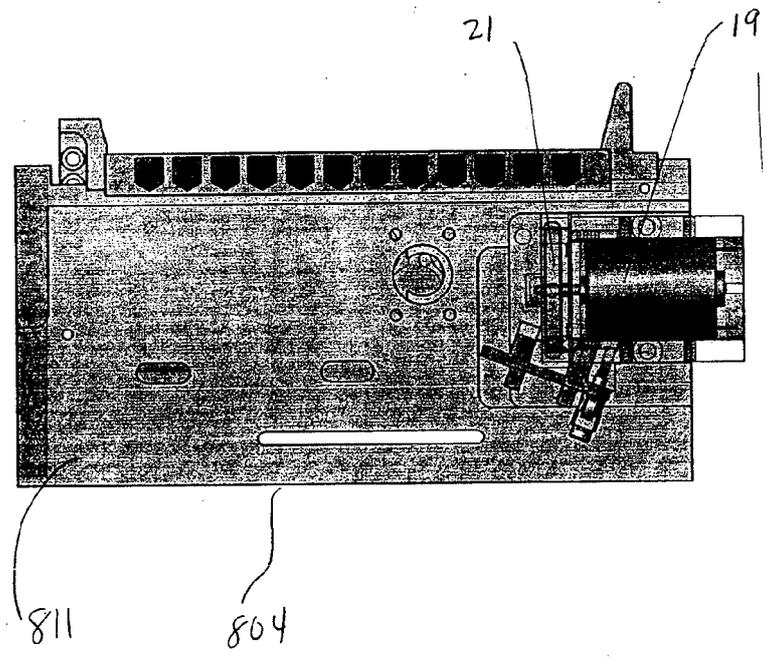


Fig. 15a

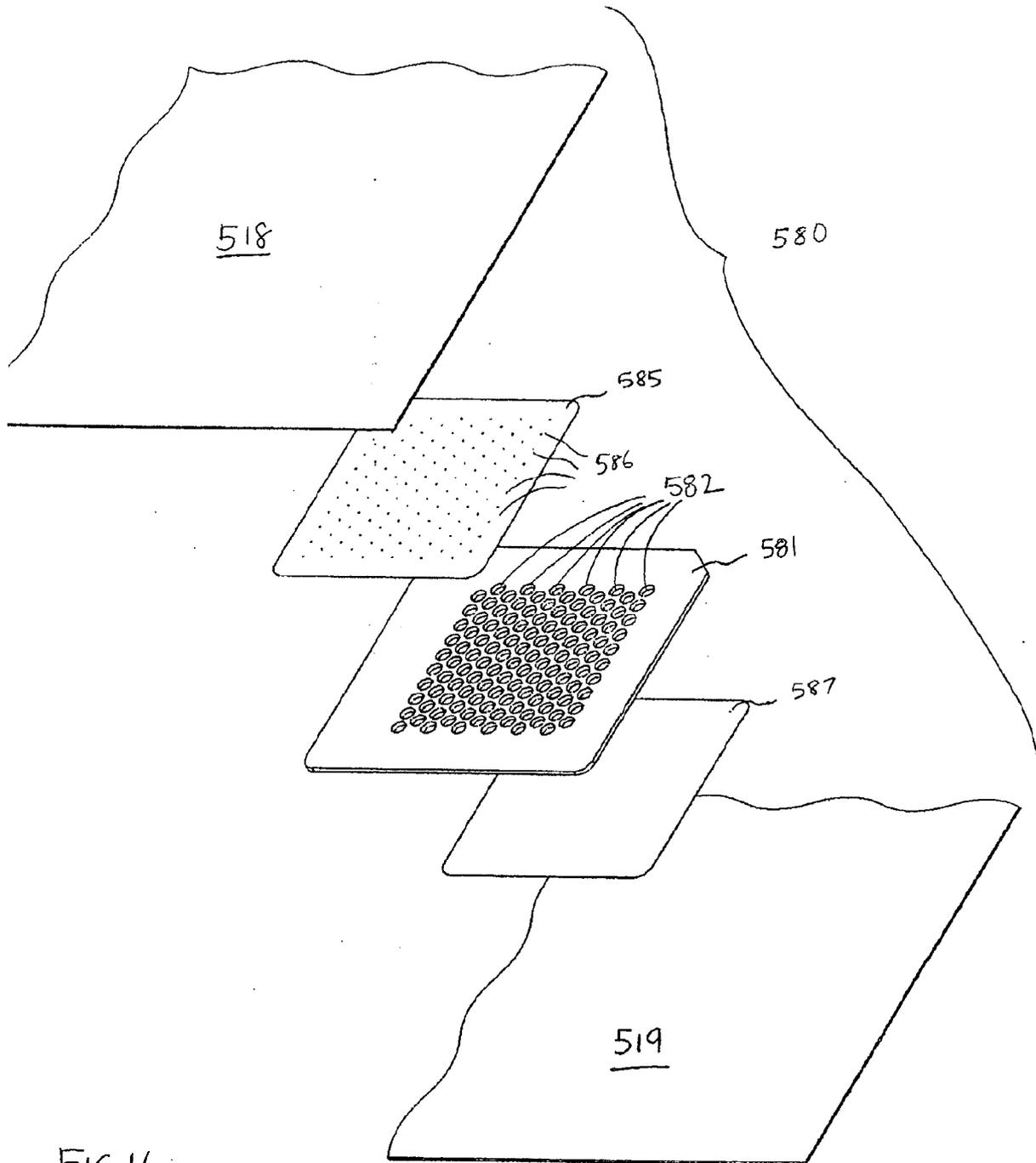


FIG 16

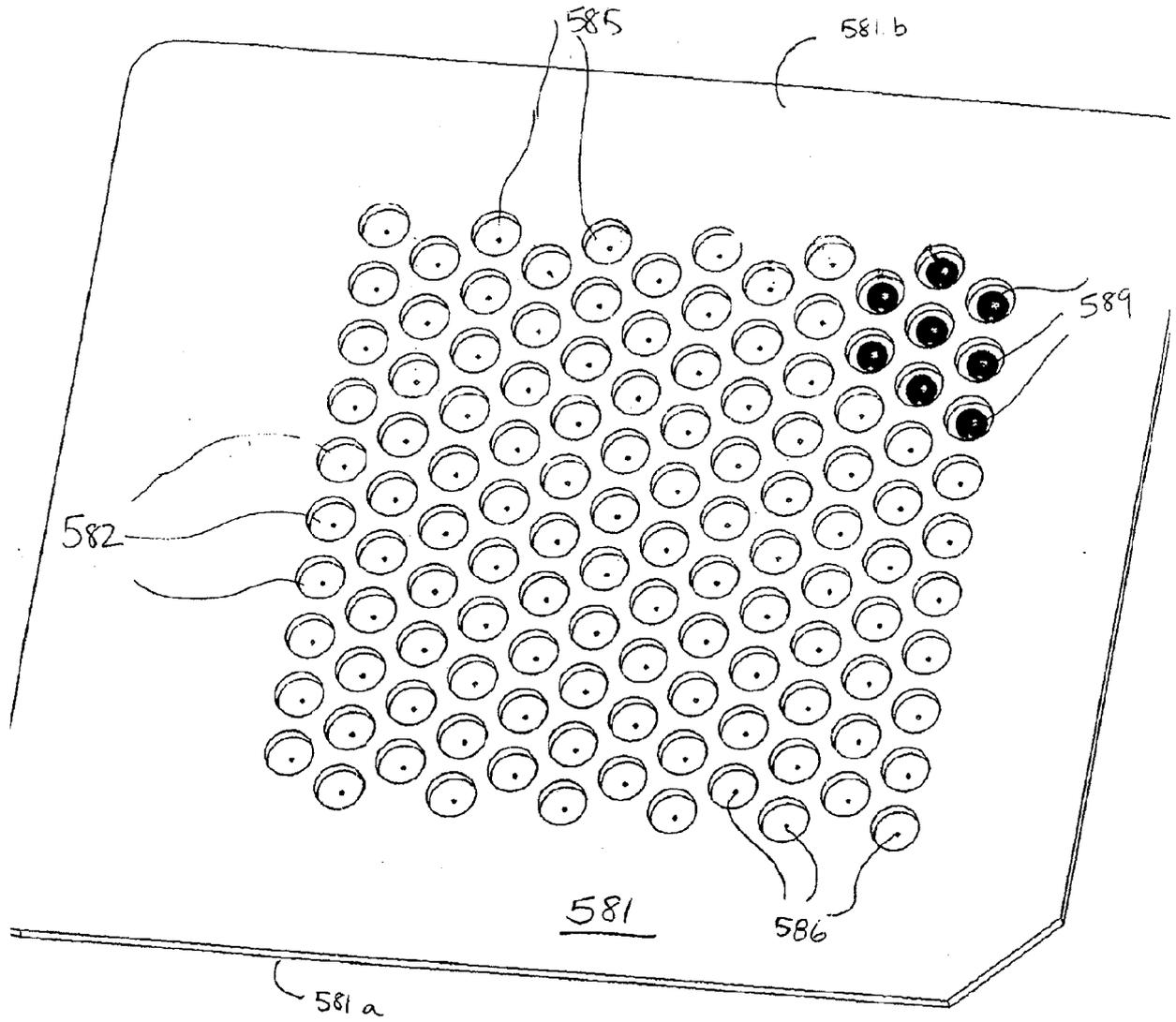


Fig 17

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citada por el solicitante es únicamente para mayor comodidad del lector. No forman parte del documento de la Patente Europea. Incluso teniendo en cuenta que la compilación de las referencias se ha efectuado con gran cuidado, los errores u omisiones no pueden descartarse; la EPO se exime de toda responsabilidad al respecto.

Documentos de patentes citados en la descripción

- US 2005250199 A1
- EP 0572057 A1
- US 6143496 A
- US 6645758 B
- US 6780617 B
- US 478453
- US 512255
- US 6605451 B
- US 6730501 B

Literatura no patente citada en la descripción

- **SANO, T. et al.** *Science*, 1992, vol. 258 (5079), 120-2
- **WITTWER CT ; FILLMORE GC ; GARLING DJ.** Minimizing the time required for DNA amplification by efficient heat transfer to small samples. *Anal Biochem*, 01 May 1990, vol. 186 (2), 328-31
- **WITTWER CT ; GARLING DJ.** Rapid cycle DNA amplification: time and temperature optimization. *Biotechniques*, January 1991, vol. 10 (1), 76-83
- **WITTWER CT ; HERRMANN MG ; MOSS AA ; RASMUSSEN RP.** Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques*, January 1997, vol. 22 (1), 130-1, 134-8 [0164]
- **WITTWER CT ; RIRIE KM ; ANDREW RV ; DAVID DA ; GUNDRY RA ; BALIS UJ.** The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *Biotechniques*, January 1997, vol. 22 (1), 176-81
- **GUNDRY CN ; VANDERSTEEN JG ; REED GH ; PRYOR RJ ; CHEN J ; WITTWER CT.** Amplicon melting analysis with labeled primers: a closed-tube method for differentiating homozygotes and heterozygotes. *Clin Chem.*, March 2003, vol. 49 (3), 396-406
- **WITTWER CT ; REED GH ; GUNDRY CN ; VANDERSTEEN JG ; PRYOR RJ.** resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clin Chem.*, June 2003, vol. 49, 853-60
- **MCKINNEY JT ; LONGO N ; HAHN S ; MATERN D ; RINALDO P ; DOBROWOLSKI SF.** Comprehensive analysis of the human medium chain acyl-CoA dehydrogenase gene. *Mol Gen Metab*
- **PORITZ MA ; ABBOTT R ; GERBER T ; THATCHER S ; BIRD A ; TUCK A ; NEWSWANDER AM ; BELISLE S ; RIRIE K ; A HAND-HELD.** Battery-operated Real-time PCR Machine. *American Society for Microbiology Annual Meeting*, 09 March 2003
- **ELNIFRO EM ; ASHSHI AM ; COOPER RJ ; KLAPPER PE.** Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. *Clin Microbiol Rev.*, October 2000, vol. 13, 559-70
- **ELNIFRO EM ; COOPER RJ ; KLAPPER PE ; YEO AC.** Tullo AB. Multiplex polymerase chain reaction for diagnosis of viral and chlamydial keratoconjunctivitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, June 2000, vol. 41 (7), 1818-22
- **GIAEVER, G. et al.** Genomic profiling of drug sensitivities via induced haploinsufficiency. *Nature Genetics*, 1999, vol. 21, 278-283
- **WINZELER, E. et al.** Functional Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* Genome by Gene Deletion and Parallel Analysis. *Science*, 1999, vol. 285, 901-906
- **SANO, T ; C.L. SMITH ; C.R. CANTOR.** Immuno-PCR: very sensitive antigen detection by means of specific antibody-DNA conjugates. *Science*, 1992, vol. 258 (5079), 120-2
- **NIEMEYER, C.M. ; ADLER ; R. WACKER.** Immuno-PCR: high sensitivity detection of proteins by nucleic acid amplification. *Trends Biotechnol*, 2005, vol. 23 (4), 208-16
- **ADLER, M.** Immuno-PCR as a clinical laboratory tool. *Adv Clin Chem*, 2005, vol. 39, 239-92
- **BARLETTA, J.M. et al.** Detection of ultra-low levels of pathologic prion protein in scrapie infected hamster brain homogenates using real-time immuno-PCR. *J Virol Methods*, 2005, vol. 127 (2), 154-64
- **ADLER, M. et al.** Detection of Rotavirus from stool samples using a standardized immuno-PCR ("Imperacer") method with end-point and real-time detection. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, vol. 333 (4), 1289-94
- **LIND, K. ; M. KUBISTA.** Development and evaluation of three real-time immuno-PCR assemblages for quantification of PSA. *J Immunol Methods*, 2005, vol. 304 (1-2), 107-16

- **SCHIAVO, S. et al.** Comparison of fluorometric detection methods for quantitative polymerase chain reaction (PCR). *J Immunoassay Immunochem*, 2005, vol. 26 (1), 1-12
- **BARLETTA, J.M. ; D.C. EDELMAN ; N.T. CONSTANTINE.** Lowering the detection limits of HIV-1 viral load using real-time immuno-PCR for HIV-1 p24 antigen. *Am J Clin Pathol*, 2004, vol. 122 (1), 20-7
- **MCKIE, A. et al.** A quantitative immuno-PCR assay for the detection of mumps-specific IgG. *J Immunol Methods*, 2002, vol. 270 (1), 135-41
- **CHAO, H.Y. et al.** A highly sensitive immuno-polymerase chain reaction assay for Clostridium botulinum neurotoxin type A. *Toxicon*, 2004, vol. 43 (1), 27-34
- **WU, H.C. et al.** Detection of Clostridium botulinum neurotoxin type A using immuno-PCR. *Lett Appl Microbiol*, 2001, vol. 32 (5), 321-5
- **LIANG, H. et al.** A highly sensitive immuno-PCR assay for detecting Group A Streptococcus. *J Immunol Methods*, 2003, vol. 279 (1-2), 101-10
- **ADLER, M. ; R. WACKER ; C.M. NIEMEYER.** A real-time immuno-PCR assay for routine ultrasensitive quantification of proteins. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, vol. 308 (2), 240-50
- **ALLEN, R.C. et al.** An immuno-PCR method for detecting Bacillus thuringiensis CryIAc toxin. *J Immunol Methods*, 2006, vol. 308 (1-2), 109-15
- **HENDRICKSON, E.R. et al.** High sensitivity multianalyte immunoassay using covalent DNA-labeled antibodies and polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res*, 1995, vol. 23 (3), 522-9
- **JOERGER, R.D. et al.** Analyte detection with DNA-labeled antibodies and polymerase chain reaction. *Clin Chem*, 1995, vol. 41 (9), 1371-7
- **HUJER.** Multi-drug Resistant Acinetobacter spp. *Isolates from Military and Civilian Patients Treated at the Walter Reed Army Medical Center*
- **Analysis of Antibiotic Resistance Genes.** *Antimicrob Agents Chemother*, 25 September 2006
- **SANCHEZ et al.** A multiplex assay with 52 single nucleotide polymorphisms for human identification. *Electrophoresis*, 2006, vol. 27, 1713-24
- **ZHOU et al.** Closed-tube genotyping with unlabeled oligonucleotide probes and a saturating DNA dye. *Clin Chem.*, 2004, vol. 50, 1328-35