

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 393 758**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

B01L 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07753229 .9**

96 Fecha de presentación: **15.03.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **2007905**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **31.12.2008**

54 Título: **Ensayos integrados de ácidos nucleicos**

30 Prioridad:

15.03.2006 US 782649 P

14.09.2006 US 844811 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

27.12.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

27.12.2012

73 Titular/es:

**MICRONICS, INC. (100.0%)
8463 154TH AVENUE NORTHEAST
REDMOND, WA 98052, US**

72 Inventor/es:

**BATTRELL, C. FREDERICK;
GERDES, JOHN;
WILLIFORD, JOHN R.;
HOEKSTRA, DENISE MAXINE;
BREIDFORD, WAYNE L.;
MORDUE, STEPHEN;
CLEMMENS, JOHN;
NABAVI, MELUD y
KOKORIS, MARK**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 393 758 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

Ensayos integrados de ácidos nucleicos

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a los campos generales de la biología molecular y de la ciencia médica y, más particularmente, a cartuchos microfluídicos integrados para la extracción, amplificación y detección de ácidos nucleicos en muestras clínicas.

Descripción de la técnica relacionada

- 10 Ha habido una transición considerable en los ensayos diagnósticos clínicos de laboratorio desde la macroescala a la microescala, en la que los requisitos de volumen de los especímenes ha disminuido desde mililitros a microlitros, y se ha podido recortar la duración de los ensayos, que ha pasado de horas a minutos.

Estas mejoras se deben, en parte, a los avances en los materiales y en la fabricación, a la rapidez de la transferencia de masa y calor a microescala, y al incremento de la sensibilidad de detección, pero también representan un esfuerzo continuo de innovación.

- 15 La ingeniería de los dispositivos microfluídicos continúa siendo el foco de investigaciones competitivas y no se ha atendido convenientemente la necesidad de una mejora en el manejo seguro de los líquidos. Para adaptar estos dispositivos al diagnóstico clínico, se necesitan unas características especiales que impidan y sirvan para detectar los positivos falsos, tal como de la contaminación de la muestra, y que protejan al operario de la exposición a los productos peligrosos para los humanos. En el caso ideal, se necesitan dispositivos con una única entrada que integren perfectamente la preparación, la extracción y el análisis de las muestras sin que el operario quede expuesto.

- 20 Se utiliza la PCR (patentes de los EE.UU. n.º 4 683 195, 4 683 202 y 4 965 188) para incrementar sin clonación la concentración de una secuencia diana de ácido nucleico en una muestra, y requiere disponer sólo de suficiente información de la secuencia diana para diseñar cebadores oligonucleotídicos inverso y directo adecuados, típicamente de 10 a 30 pares de bases de longitud. En la práctica se añade un exceso molar de la pareja de cebadores a la muestra que contiene la diana deseada o «plantilla». Los dos cebadores son complementarios a secuencias en 5' y en 3' de la plantilla, respectivamente. Primero se calienta la mezcla para desnaturalizar o «fundir» la diana bicatenaria y a continuación se deja enfriar para que se asocie o «hibride», y forme híbridos mixtos entre la diana y el cebador. Después de la hibridación se fijará una polimerasa adecuada a los híbridos diana/cebador y «extenderá» los cebadores a lo largo de la plantilla monocatenaria, con la adición de bases al extremo 3'-OH del cebador, de modo que se forma una hebra complementaria. En presencia de los cebadores inverso y directo se realiza una copia completa de la diana bicatenaria original. Se pueden repetir tantas veces como sean necesarias las etapas de desnaturalización, hibridación y extensión de la polimerasa para «amplificar» varios órdenes de magnitud el número de copias de la diana, lo que ayuda a su detección. El número final de copias está limitado sólo por la cantidad molar de los cebadores que —es importante reconocerlo— se incorporan en el producto.

- 25 Después del descubrimiento de la PCR se describieron otras estrategias diferentes para la amplificación. Véase, por ejemplo, la patente de los EE.UU. n.º 5 130 238 de Malek, titulada «*Nucleic Acid Sequence Based Amplification*» o NASBA [véase también van Gemen et al. 1993, *J. Virol. Methods* 43: 177-188]; patente de los EE.UU. n.º 5 354 668 de Auerbach, titulada «*Isothermal Methodology*»; patente de los EE.UU. n.º 5 427 930 de Burkenmeyer, titulada «*Ligase Chain Reaction*» o LCR [véase también la patente europea n.º 320 308; y Shachter et al. 1994, *J. Clin. Microbiol.*, 32: 2540-2543]; patente de los EE.UU. n.º 5 455 166 de Walker, titulada «*Strand Displacement Amplification*» o SDA [véase también Walker J et al. 1993, *PCR Methods and Applications* 3: 1-6; Lage J. M. et al. 2003, «*Hyperbranched strand displacement amplification*» *Genome Res.* 13: 294-307; Dean F. B. 2002, «*Multiple displacement amplification*». *Proc. NAS* 99: 5261-66; o Detter J. C. 2004, «*Isothermal strand displacement amplification*». *Genomics* 80: 691-698], amplificación mediada por la transcripción [véase Pfyffer et al. 1996, *J. Clin. Micro.* 34: 834-841].

- 45 Estos protocolos tienen varias ventajas en los ensayos diagnósticos, pero la PCR sigue siendo la herramienta fundamental para el laboratorio de biología molecular.

- 50 Los dispositivos semiautomáticos que se usan con las nuevas metodologías de amplificación aparecieron poco después de la introducción de la PCR. El primer termociclador comercial se fabricó según la patente de los EE.UU. n.º 5 038 852 de Cetus Corp.

En 1990, la Universidad de Utah (patente de los EE.UU. n.º 6 787 338) describió un método en el que las muestras y los reactivos se extraían en capilares de vidrio, los cuales se sellaban y se colocaban en un horno, y la temperatura se ciclaba abriendo y cerrando la puerta del horno.

Posteriormente, la Universidad de Pensilvania (patentes de los EE.UU. n.º 5 498 392; 5 587 128; 5 955 029; 6 953 675) describió dispositivos para realizar la PCR microfabricados a base de sílice. Se contemplaba, sin detalles, una familia de pequeños «chips» desechables, típicamente de un único uso y producidos en masa, para la amplificación rápida de los ácidos nucleicos celulares o microbianos presentes en una muestra. Los dispositivos incluían un orificio de entrada de la muestra, un sistema de flujo a «mesoescala» y un medio para controlar la temperatura en una o más cámaras de reacción. Los medios de calentamiento y enfriamiento descritos incluían resistores eléctricos, láseres y sumideros fríos. Se utilizaron bombas sin chip para controlar el flujo del líquido y suministrar los reactivos. Se sugirieron circuitos impresos, chips provistos de sensores y medios de fijación preanalíticos para atrapar y concentrar el analito. El canal común de líquidos, que también servía como canal analítico, se utilizó para transportar el residuo de la lisis celular (tal como el lisado de células sanguíneas o de bacterias) a una válvula de purga abierta o a un recinto fuera del chip.

Se describieron dispositivos analíticos que tenían cámaras y pasos de flujo con al menos una dimensión transversal del orden de 1 µm a 500 µm. Se previó que el volumen de reacción sería de 5 µl o menos.

La manera de detectar los amplicones incluía, inespecíficamente, hibridación ADN:ADN, bien visualmente con colorantes intercalantes fluorescentes o bien a través de la medición reológica, la unión del ADN a las sondas fluorescentes o perlas diamagnéticas (o paramagnéticas); y electroforesis en gel.

Aunque ya se anticiparon a los dispositivos actuales de muchas maneras, los dispositivos de la Universidad de Pensilvania se limitaron a chips de sílice, cuyos orificios para la muestra y para el reactivo estaban controlados por bombeo con jeringas externas. Los residuos de la lisis celular salían del chip a través de la cámara de PCR antes de la amplificación, y no se proporcionó ningún mecanismo demostrable que aislara al operario de un residuo o muestra peligroso para los humanos. El diseño y el método no permitían que se incorporaran previamente en el sistema analizador los reactivos deshidratados a modo de dispositivo o kit de ensayo con una sola entrada y, sin perjuicio de cualquier declaración de lo contrario, el compartir de los orificios de bombeo para la entrada y salida de la muestra a otra supone claramente un riesgo inaceptable de contaminación cruzada.

En la patente de los EE.UU. n.º US 5 234 809 se describe un método de purificación de ácidos nucleicos que implica tratar una muestra biológica, tal como sangre o heces, con un caótopo en presencia de un sustrato sólido tal como dióxido de sílice u otro sólido catiónico hidrófilo. Las primeras publicaciones habían descrito el uso de caótopos y de sustratos sólidos para purificar los ácidos nucleicos a partir de bloques de agarosa. Según la naturaleza de la fase sólida, el ácido nucleico se podría eluir entonces con TE, o no. Si no, se podría realizar directamente la PCR sobre el sustrato sólido, igual que un ácido nucleico atrapado sobre una membrana de PVDF. La etapa de atrapamiento y elución se describió que tardaba unos 45 minutos. Sin embargo, el tiempo citado no incluía la detección de amplicones. No se describió ninguna combinación de atrapamiento de los ácidos nucleicos, amplificación y detección de los amplicones por PCR en un dispositivo de una única etapa. Es interesante señalar que no se reivindicó la realización de la PCR sobre los filtrados eluidos desde bloques de filtro de sílice. No se dio a conocer ningún canal de detección multiplexado en el sistema analizador.

En la patente de los EE.UU. n.º 5 989 813 se prepararon amplicones mediante la amplificación de secuencias diana de ácido nucleico en presencia de cebadores inversos y directos conjugados con biotina y digoxigenina, respectivamente, para el uso en ensayos de flujo lateral. Los amplicones están fijados a partículas con estreptavidina y se aglutinan en presencia de anticuerpos contra la digoxigenina. Mediante el flujo lateral, se detectan los complejos de amplicones bifuncionales como agregados atrapados excluidos de la matriz fibrosa. Otros sólidos son interferencias en el ensayo. En una segunda variante del formato de flujo lateral, los conjugados de avidina se fijan en una membrana y se migran hasta que se encuentran una tira de detección. Se detecta la acumulación de partículas coloreadas en la tira de detección. Los ensayos generalmente dependen de la velocidad de flujo en los materiales, del tamaño de las partículas y de las dimensiones de los poros, así como de las barreras laminares para la difusión. No se dio a conocer ninguna utilidad de detección multiplexada en el sistema analizador.

Desde entonces se han introducido y patentado otros diseños y métodos de termociclado por PCR. La patente de los EE.UU. n.º 6 210 882 de Clínica Mayo describía una manera de calentamiento y enfriamiento sin contacto para las reacciones de termociclado. La patente de los EE.UU. 5 965 410 de Caliper describía la manera de termociclar mediante el calentamiento de Joule, es decir, mediante el paso de la corriente eléctrica a través del tampón del recipiente de reacción. La solicitud de patente de los EE.UU. n.º 20040081997 de Caliper describía reacciones de PCR en las que los cebadores, los dNTP y la secuencia diana (plantilla) de ácido nucleico se mezclaron primero, se desnaturalizaron y se rehibridaron antes de añadir la polimerasa (la denominada reacción de la polimerasa de «comienzo en caliente»). En un principio se sugirió que la PCR de comienzo en caliente mejoraba el rendimiento del producto y la especificidad (D'Aquila et al. 1991, *Nucleic Acids Res.* 19: 37-49; Chou et al. 1992. *Nucleic Acids Res.* 20: 1717-1723; Kellogg et al. 1994. *Biotechniques* 16: 1134-1137).

En la patente de los EE.UU. n.º 6 541 274 se describe otro sistema para controlar la temperatura en un dispositivo microfluídico. Esta patente se refiere a un sistema reactor que tiene una serie de reservorios en un cuerpo. Para controlar la temperatura se conecta un intercambiador de calor y una bomba de recirculación con los reservorios. Otros ejemplos de dispositivos existentes para controlar la temperatura de un dispositivo microfluídico incluyen el calor radiante como el descrito en la patente de los EE.UU. n.º 6 018 616, un bloque con control de temperatura

como el descrito en la patente de los EE.UU. n.º 6 020 187 y otras mejoras acumulativas que se seguían registrando en la USPTO.

La patente de los EE.UU. n.º 5 716 842 de Biometra describía un reactor que tenía un microcanal de flujo lineal en serpentina, que entrelaza los elementos de calentamiento a diferentes temperaturas para la PCR. La patente de los EE.UU. n.º 2001/0046701 de Sentron describe el uso de cebadores unidos a reactivos particulados para la PCR en un canal en serpentina seguido de la filtración con filtros H mejorada con absorción para recuperar los amplicones. La patente de los EE.UU. 5 270 183 describe una cámara de reacción enrollada alrededor de distintos distribuidores de calentamiento.

En la solicitud de patente de los EE.UU. 2003008308, CalTech describió un «canal microfluídico rotatorio» con varias zonas de temperatura, de tal modo que se puede realizar el termociclado mediante la recirculación de la mezcla de reacción por un canal circular de la invención. La solicitud también enseña el uso de canales accesorios «formados dentro de un material elastomérico y separado del canal de flujo mediante una sección de una membrana elastomérica, deflectándose o retrayéndose sustancialmente la membrana del canal de flujo circular en respuesta a una fuerza de actuación aplicada al canal de control» (Para. 9. , figs. 3A, 3B). Estos elementos elastoméricos se denominaron «válvulas de aislamiento», pero también servían como bombas de desplazamiento positivo en los dispositivos, de nuevo incidiendo sobre el canal de líquido con presión neumática positiva, por lo que el elemento elastomérico se deformaba reversiblemente y se proyectaba en el canal del líquido en forma de una serie de elementos de bomba peristáltica de tipo émbolo. El calentamiento para el termociclado se llevó a cabo con dispositivo Peltier, calentador resistivo, intercambiador de calor o un elemento de óxido de estaño y de indio. Al inmovilizar la polimerasa en un segmento del canal circular que no entre en contacto con un elemento de calentamiento con calor, se sugirió el uso de polimerasas termosensibles.

El medio de detección propuesto incluía, inespecíficamente, etiquetar dianas con fluoróforos entonces conocidos (p. ej., como etiquetas de sondas fluoresceíbles o «FRET»), cromóforos, radioisótopos, marcadores de luminiscencia, marcadores de masa, marcadores oligoméricos conjugados con enzimas, o mediante electroforesis en gel. Se describió la detección midiendo la capacitancia de la solución de reacción.

La solicitud de patente de los EE.UU. n.º 20050019792 de Fluidigm describía otra válvula elastomérica. Se dan a conocer otros detalles en la solicitud de patente de los EE.UU. n.º 20020195152 de Fluidigm. Se modificaron válvulas neumáticas para incorporar una platina que comprime un canal de líquido en un cuerpo elastomérico, cerrando u obturando el canal. También se propusieron dispositivos que consistían en canales de flujo ciego, que servían de cámaras de reacción, y se cargaron previamente con los reactivos en el momento de la fabricación. Y la correspondiente patente internacional WO 2004/061085 A2.

La solicitud de patente de los EE.UU. n.º 20060073484 y la correspondiente patente internacional WO 2004/061085 A2 de Mathies describen un canal único o dispositivos microfluídicos de red densa con el control de un distribuidor neumático. El método implicaba el uso de la captura de los patógenos deseados por inmunoafinidad, seguido de la lisis y la detección mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con la electroforesis capilar (CE, por su nombre en inglés). Las válvulas de control conmutables neumáticamente, que consisten en una película elástica de PDMS emparedada entre una capa de distribuidor neumático y fluidica de vidrio (con la interposición optativa de una capa de vía), se utilizaron o bien para abrir los canales mediante la aplicación de vacío o bien para cerrar los canales mediante la aplicación de presión (véase la figura 1C de la solicitud de patente de los EE.UU. n.º 20060073484). También se utilizaron estructuras similares como bombas para dispensar los reactivos (véase la figura 5C de la solicitud de patente de los EE.UU. 20060073484) [véase también William H. Grovera et al. 2003, «*Monolithic membrane valves and diaphragm pumps for practical large-scale integration into glass microfluidic devices: Sensors and Actuators B*» 89(3): 315-323]. Se prefirieron en particular las películas de PDMS porque los elastómeros de silano se adhieren a las placas de vidrio de estos dispositivos.

La solicitud de patente de los EE.UU. n.º 20050129582 coasignada a Micronics enseña dispositivos microfluídicos que tienen canales, válvulas, bombas, sensores de flujo, cámaras de mezcla y detectores ópticos para la realización de ensayos químicos y bioquímicos. Se describen transiciones térmicas mejores, que permiten la realización de las PCR más de 4 veces más rápido que en los termocicladores convencionales. Se demostró que la velocidad de la rampa térmica llegaba a 17 °C/s mediante la selección de sustratos plásticos y dimensiones adecuados.

Las patentes y solicitudes de patente coasignadas relevantes para los métodos de desarrollo de los bioensayos de ácidos nucleicos y anticuerpos en un formato de ensayo microfluídico incluyen las patentes de los EE.UU. n.º 6 743 399 («*Pumpless microfluidics*»), 6 488 896 («*Microfluidic Analysis Cartridge*»), solicitudes de patente de los EE.UU. n.º 2005/0106066 («*Microfluidic Devices for Fluid Manipulation and Analysis*»), 2002/0160518 («*microfluidic Sedimentation*»), 2003/0124619 («*Microscale Diffusion Immunoassay*») 2003/0175990 («*Microfluidic Channel Network Device*»), 2005/0013732 («*Method and system for microfluidic Manipulation, Amplification and Analysis of Fluids For example, Bacteria Assays and Antiglobulin Testing*»), solicitud de patente de los EE.UU. n.º 2007/0042427, «*microfluidic Laminar Flow Detection Strip*» y los documentos sin publicar «*Microfluidic Cell Capture and Mixing Circuit*», «*Polymer Compositions and Hydrogels*», «*microfluidic Mixing and Analytical Apparatus*», «*System and method for diagnosis of infectious diseases*» y «*Microscale Diffusion Immunoassay Utilizing Multivalent Reactants*».

Otras ilustraciones de dispositivos microfluídicos y sus componentes se pueden encontrar en las patentes de los EE.UU. n.º 5 726 751; 5 724 404; 5 716 852; 5 747 349; 5 748 827; 5 922 210; 5 932 100; 5 974 867; 5 971 158; 5 972 710; 5 948 684; 6 007 775; 6 171 865 y 6 387 290.

5 La patente de los EE.UU. n.º 5 582 989 enseña el uso de PCR múltiplex para detectar errores genéticos en varios exones diana. Se preparó ADN_g purificado mediante los métodos estándares del momento, seguido de la PCR, y se detectó mediante electroforesis en gel de agarosa, o mediante transferencia Southern. No se anticipó ninguna estrategia microfluídica integrada simplificada para el análisis genético.

10 La patente de los EE.UU. n.º 5 582 989 enseña el uso de la PCR múltiplex para detectar agentes infecciosos en las muestras clínicas. La enseñanza clave del procedimiento es un tampón con una concentración elevada de sales utilizado para separar el ADN de las proteínas, que precipitan por salinización. A continuación se purificó adicionalmente el ADN mediante extracción con fenol:cloroformo antes de la PCR. Finalmente, se realizó la PCR con un termociclador 9600 de Perkin Elmer (Norwalk, Conn., EE.UU.). El protocolo se describió que tardaba en completarse alrededor de un día. No se dio a conocer ninguna utilidad de detección multiplexada del sistema analizador.

15 La patente de los EE.UU. n.º 7 087 414 de Applera describe un ensayo de dos etapas que incluye una etapa preparativa en la cual se utilizaba una mezcla de cebadores para las rondas preliminares de amplificación (no más de 1000 copias por diana), y luego la mezcla de reacción se dividió en micropocillos de reacción paralelos independientes para posteriores segundas etapas de amplificación, denominadas ciclos de «estimulación», en los cuales se utilizaba una única pareja de cebadores específicos de la diana. La amplificación se siguió mediante
20 detección en canales analíticos independientes. No se anticiparon los dispositivos microfluídicos con extracción, amplificación y detección integradas en una etapa. No se dio a conocer ninguna utilidad de detección multiplexada en el sistema analizador.

25 La patente internacional WO 2005/106024 A1 se refiere al método de aislamiento del ADN mediante la retirada de los constituyentes que interfieren con una PCR posterior. De acuerdo con dicho método, todas las sustancias y etapas del método se integran completamente en una unidad cerrada (cartucho) para un único uso, que permite la entrada de una muestra que contiene el ADN y la utilización de sustratos de fijación al ADN para aislar el ADN liberado. En particular, cuando se aplica dicho método al aislamiento del ADN de sangre completa mediante la ruptura de los glóbulos blancos, los reactivos necesarios para llevar a cabo la ruptura celular y otras reacciones se guardan en una forma que es estable a temperatura ambiente. Para romper los glóbulos blancos y aislar el ADN, un
30 reactivo de lisis guardado en seco se disuelve en una solución acuosa y se pone en contacto con los glóbulos blancos. El conjunto de componentes correspondiente comprende una unidad en la que albergar los contenedores biológicos que contienen ADN y/o reactivos, en donde se proporciona al menos un microcanal (5) para contener los reactivos, en donde el reactivo está presente en el microcanal (5) como una mezcla desecada con una presión de vapor insignificante, que forma una sustancia estable a temperatura ambiente.

35 La patente de los EE.UU. n.º 5 863 502 A describe un dispositivo de reacción en paralelo para llevar a cabo reacciones en éste que comprende una o más formas de flujo de reacción, comprendiendo cada una de estas formas de flujo de reacción una o más cámaras conectadas en serie mediante canales de intercambio de líquido, otros canales de intercambio de líquido que conectan tales canales de reacción en paralelo, el medio con válvulas que inicia e impide el flujo de líquidos a través de tales canales de intercambio de líquidos, y el medio que introduce
40 y saca el flujo de líquidos de tales cámaras. La bomba que mueve los líquidos comprende preferentemente una bomba de pie donde la contención está diseñada para empujar sobre la primera cámara de suministro para que abra la salida sellada y bombee el líquido en el primer canal conectado de intercambio de líquidos. Preferentemente, la primera cámara de suministro se puede colapsar durante la evacuación y se puede llenar a partir de un estado colapsado por vacío hasta un volumen definido.

45 Por consiguiente, existe todavía la necesidad insatisfecha de un dispositivo integrado de ensayo microfluídico en una etapa capaz de procesar muestras y capturar ácidos nucleicos, amplificar las secuencias diana y detectar los resultados positivos. Existe la necesidad de dispositivos que proporcionen resultados en tiempo real con el menor retraso posible. Esta necesidad es particularmente obvia en la lucha contra las enfermedades infecciosas, en las que los pacientes se deben evaluar y tratar sin la opción de una nueva visita, en donde se utiliza la identificación rápida de un agente etiológico para monitorizar en tiempo real y controlar la epidemia, en donde pueden no estar
50 disponibles instalaciones especializadas para manejar muestras peligrosas para los humanos, en donde la prueba tienen que realizarla microbiólogos expertos ausentes, y en donde el coste de los servicios diagnósticos más complejos es prohibitivo.

55 La facilidad de uso se mejoraría si se mostrasen en paralelo varios resultados, como por ejemplo los resultados de un panel de pruebas, en una cámara de detección visual amigable para el usuario.

BREVE RESUMEN DE LA INVENCION

Los médicos que se enfrentan a un paciente que tiene una enfermedad generalizada, o un síndrome no patognómico tal como gastroenteritis y diarrea, o el comienzo de un síndrome respiratorio que comienza con rinorrea

o linfadenitis, típicamente se basan en consideraciones epidemiológicas y estadísticas para decidir qué hay que recetar. Sin embargo, en un mundo en donde los viajeros pueden llegar del otro lado del mundo en tan solo una noche, estas consideraciones a menudo son inútiles.

5 Los agentes causantes de gastroenteritis, diarrea, disentería o síntomas de tipo cólera se pueden confundir en la práctica clínica, en particular cuando se presentan al comienzo de los síntomas, y pueden requerir pruebas analíticas de laboratorio. El diagnóstico diferencial del agente causal puede ser decisivo a la hora de recetar el tratamiento adecuado.

10 Por ejemplo, la diarrea provocada por *E. coli* enterohemorrágica, a menudo del serotipo O157H7 (que hace referencia a los marcadores antigénicos de la cápsula y el flagelo) podría no tratarse de forma idónea con antibióticos porque el bolo resultante de toxina liberada cuando se lisan las bacterias puede devastar al hospedador.

Los patógenos respiratorios tienen síntomas que pueden solaparse en el cuadro clínico. El diagnóstico diferencial del agente causal puede ser decisivo a la hora de recetar el tratamiento adecuado.

15 Por ejemplo, si no se consigue tratar agresivamente a *S. pyogenes* con antibióticos bactericidas, puede dar lugar a un daño permanente del miocardio. Los datos han mostrado de modo concluyente que la disminución de la vida útil y el incremento de la morbilidad relacionada con el corazón están relacionadas con un «dolor de garganta por estreptococos», en particular en la infancia. En muchos estudios de países del tercer mundo que carecen de acceso a antibióticos, la prevalencia de la enfermedad cardíaca en el lactante puede llegar a ser del 30% o incluso del 70% de la población.

20 Por consiguiente, para intentar reducir los peligros omnipresentes de la diseminación de las enfermedades infecciosas nos hemos dejado guiar por un remedio de la biología molecular, «extraer, amplificar, detectar», para diseñar dispositivos microfluídicos que son higiénicos, compactos, fáciles de usar, que requieren un volumen de muestra pequeño y ofrecen un diagnóstico diferencial de laboratorio de muchos microorganismos o virus en tiempo real en el laboratorio móvil.

25 Un objetivo de este proyecto ha sido el desarrollo de una superficie continua entre la preparación de la muestra, la amplificación y la detección de la diana en un dispositivo microfluídico. Sorprendentemente, todas las etapas en el protocolo de ensayo, desde la extracción del ácido nucleico a la amplificación y a la detección, se pueden realizar en unos 4 minutos en un cartucho autónomo con una única entrada que se parece a una tarjeta.

La presente invención se refiere a

- 30 1. Un cartucho microfluídico integrado que comprende:
- a. un medio para extraer ácidos nucleicos de una muestra biológica;
 - b. un medio para sintetizar amplicones;
 - c. un medio para detectar amplicones; y,

una cámara para aislar los residuos,

35 en donde dicho medio para extraer ácidos nucleicos de una muestra biológica comprende un subcircuito fluídico para extraer ácidos nucleicos de una muestra biológica con fase sólida; dicho medio para sintetizar amplicones comprende un subcircuito fluídico para sintetizar amplicones sin un elemento de mezcla mecánica; y dicho medio para detectar amplicones comprende un subcircuito fluídico con una cámara de detección múltiple y una ventana óptica en un miembro desechable único integrado, y los componentes fluídicos del miembro único integrado se controlan mediante una serie de elementos de control neumático internos que comprenden válvulas accionadas mediante diafragmas y cámaras de fuelle, en donde dicha serie de elementos de control neumático internos están provistos con un circuito de interconexión neumática para conectarlos a un distribuidor controlable y externo de impulsión neumática.

45 2. Un cartucho microfluídico de acuerdo con el punto 1, en el que dicho medio para sintetizar amplicones comprende además:

- a. Una primera cámara de fuelle interconectada mediante fluídica con una segunda cámara de fuelle;
- b. Una interfase térmica, por medio de la cual la primera y segunda cámaras de fuelle se mantienen a temperaturas fijas diferentes; y

50 comprendiendo además cada cámara de fuelle un diafragma para el bombeo recíproco de líquido entre la primera y la segunda cámaras de fuelle.

3. Un cartucho microfluídico de acuerdo con el punto 1, en el que dicho medio para sintetizar amplicones

comprende un conjunto de componentes fluidicos y de interfase térmica sellado por la parte inferior del dispositivo con una película de plástico que tiene una conductividad térmica de más de aproximadamente 1 W/m·°K.

4. Un método para realizar la PCR en un cartucho microfluídico de acuerdo con el punto 2, que comprende:

5 a. Formar una mezcla de reacción que comprende una plantilla de ADN, cebadores, polimerasa, dNTP, tampón y una sal de magnesio en una primera cámara de fuelle interconectada por fluidica a una segunda cámara de fuelle, manteniéndose dicha primera cámara de fuelle a una temperatura fija a, o por encima de, la temperatura de desnaturalización del ADN bicatenario y manteniéndose dicha segunda cámara de fuelle a una temperatura fija a, o por debajo de, la temperatura de hibridación de la plantilla y los cebadores;

b. Introducir una secuencia diana de ácido nucleico dentro de dicha primera cámara de fuelle;

10 c. Aplicar presión neumática a un diafragma para que se efectúe la transferencia de la mezcla de reacción de dicha primera cámara de fuelle a dicha segunda cámara de fuelle e incubar;

d. Aplicar presión neumática a un diafragma para que se efectúe la transferencia de la mezcla de reacción desde dicha segunda cámara de fuelle a dicha primera cámara de fuelle;

e. Repetir las etapas b y c durante un determinado número de termociclos;

15 f. Retirar los productos de amplificación.

5. Un aparato para realizar una prueba biológica que comprende un cartucho microfluídico según uno cualquiera de los puntos 1 a 3.

20 6. El aparato de acuerdo con el punto 5, que además comprende un distribuidor de impulsión neumática fuera del cartucho con orificios de interconexión neumática y circuitería para conectarse a, y controlar, las numerosas válvulas y diafragmas de fuelle de dicho cartucho microfluídico, así como comprender además un microprocesador con programación lógica de las válvulas configurado para controlar la impulsión neumática de los elementos de válvulas y de diafragmas.

Otras realizaciones incluyen una «cámara de detección múltiplex» en el sistema analizador, mediante la cual varios resultados, como los de un panel de pruebas, se muestran en un formato visual agradable para el usuario.

25 Los dispositivos microfluídicos con una sola entrada utilizan la microfluídica para los distintos canales válvulas, filtros, bombas, barreras líquidas, reservorios de reactivos en el sistema analizador y otros elementos organizados como una combinación de subcircuitos fluidicos que extraen los ácidos nucleicos de la muestra, amplifican las posibles secuencias diana del ácido nucleico y detectan los resultados del ensayo en un formato accesible para el usuario.

30 Los patógenos de muestras clínicas que dan resultados confusos o no concluyentes mediante electroforesis en gel de los productos amplificados y que requerirían la transferencia Southern confirmatoria se identifican con facilidad en minutos mediante los métodos descritos aquí.

En las realizaciones actuales, la extracción se lleva a cabo en un microcanal con una longitud de 4 cm o menos, sin el tratamiento previo con proteinasas ni la precipitación con fenol:cloroformo ni las centrifugaciones asociadas.

35 También se describen mejoras en el formato del dispositivo microfluídico centradas en la naturaleza peligrosa de los especímenes a analizar y que superan los inconvenientes de los dispositivos más antiguos. En determinadas realizaciones mostramos una estrategia integrada para el manejo de especímenes y la extracción en dispositivos desechables con una sola entrada, en donde el espécimen se introduce o se pipetea en el dispositivo, se sella dentro y entonces se lleva a cabo el ensayo sin más exposición del operario al espécimen. En el sistema analizador
40 también se proporciona el aislamiento y la descontaminación de los residuos.

También demostramos que los peptidil-conjugados en el extremo 5' de los conjuntos de cebadores de amplificación son por lo general aplicables a los protocolos de amplificación dependiente de la polimerasa y además son robustos, y conservan sorprendentemente toda la antigenicidad y la integridad de fijación después de la amplificación. Mostramos que un anticuerpo inmovilizado, por ejemplo un anticuerpo monoclonal, específico contra un cebador de
45 amplificación conjugado a hapteno peptidílico capturará el amplicón diana etiquetado con el cebador. Con el uso de un segundo cebador etiquetado con un segundo ligando de afinidad, se diseñan fácilmente métodos que emplean complejos de detección específicos de la diana. Los oligopéptidos no se han utilizado antes como cebadores en la amplificación por PCR, u otros protocolos de amplificación, ni se utilizan para etiquetar ni discriminar los productos de PCR mezclados en los protocolos de detección múltiplex de dianas. Estos complejos, por lo tanto, sirven
50 esencialmente para interrogar un colección de amplicones de cebadores con peptidilo. Inesperadamente, este método tiene más amplitud que los métodos de la técnica anterior basados en etiquetar cebadores, lo que permite la separación y detección simultáneas de un número esencialmente infinito de amplicones gracias a la etapa de etiquetar cada amplicón con un único hapteno peptidico y emplear el correspondiente anticuerpo para inmovilizarlo. Los ensayos con perlas magnéticas ilustrados aquí son una realización descrita en la presente memoria.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS DIFERENTES PROYECCIONES DE LOS DIBUJOS

La figura 1 es un esquema de un subcircuito microfluídico de extracción de muestras.

La figura 2 es un esquema de un subcircuito microfluídico de amplificación por PCR con una interfase térmica de temperatura variable.

5 La figura 3 es un esquema de un subcircuito microfluídico de detección de diana.

La figura 4 es un esquema de un dispositivo integrado que combina los subcircuitos microfluídicos de extracción, amplificación y detección por PCR de las figuras 1, 2 y 3.

La figura 5 es un esquema de una detección positiva que describe un amplicón de dos colas y la inmunoinmovilización de una perla magnética de captura sobre un bloque de análisis.

10 La figura 6 es una fotografía de los datos analíticos para las dianas patógenas entéricas obtenidas con un dispositivo de la figura 4.

La figura 7 es una proyección en planta y transversal de un elemento de válvula neumática conectado a un distribuidor neumático, para controlar el flujo de líquido en un canal microfluídico.

La figura 8 es un árbol microfluídico de distribución de válvulas.

15 La figura 9 es una proyección en planta y transversal de una válvula neumática con un filtro de aislamiento higiénico en línea en el distribuidor neumático.

La figura 10 es una proyección transversal de un envase blíster en funcionamiento.

La figura 11 es una proyección transversal de una cámara de aislamiento de residuos con una válvula de purga higiénica.

20 La figura 12 es la proyección en planta y transversal de una cámara de fuelle con diafragma elastomérico.

La figura 13 es una proyección en planta de un subcircuito de amplificación que tiene dos cámaras de fuelle de bombeo recíproco con interfases térmicas de temperatura fija controlable independientemente.

25 La figura 14 es una proyección transversal del dispositivo de la figura 13 en funcionamiento. El termociclado se produce a medida que el líquido fluye hacia atrás y hacia delante entre las dos cámaras con interfases térmicas de temperatura fija controlables independientemente.

La figura 15 es una proyección en planta de un subcircuito de amplificación que tiene dos cámaras de fuelle de bombeo recíproco con interfases térmicas de temperatura fija controlables independientemente y con flujo continuo.

30 La figura 16 es una proyección transversal del dispositivo de la figura 15 en funcionamiento. El termociclado se produce a medida que el líquido fluye hacia atrás y hacia delante entre las dos cámaras con interfases térmicas de temperatura fija controlables independientemente y con flujo continuo.

La figura 17 es una proyección en planta de un subcircuito de amplificación optativo que tiene tres cámaras de fuelle de bombeo recíproco con interfases térmicas de temperatura fija controlables independientemente y con flujo continuo.

35 La figura 18 es una proyección en planta de una realización optativo de un subcircuito de amplificación que tiene tres cámaras de fuelle de bombeo recíproco con interfases térmicas de temperatura fija controlables independientemente y con flujo continuo. Obsérvese que la cámara de desnaturalización está distanciada de las demás cámaras de fuelle y que la comunicación fluidica entre dos cámaras cualesquiera es independiente de la tercera cámara.

La figura 19 muestra una proyección elevada y transversal de un mezclador microfluídico en línea con la dimensión más estrecha acercándose a la longitud de la vía libre difusional.

40 La figura 20 es una proyección transversal de un canal, un reservorio y una cámara microfluídicos que tiene depositados reactivos deshidratados.

La figura 21 es una proyección en planta de una cámara de detección múltiple y una ventana óptica.

La figura 22 es una proyección en planta de las geometrías representativas de bloques de análisis.

La figura 23 es un esquema de un subcircuito de amplificación que tiene dos interfases térmicas de temperatura fija.

45 La figura 24 es un esquema que muestra un dispositivo para un protocolo de ensayo que se basa en reacciones de PCR secuenciales.

La figura 25 es un esquema de un subcircuito de extracción y amplificación con provisión para el análisis de ARN.

La figura 26 es un esquema más generalizado de una detección positiva que describe un amplicón con dos colas a modo de enganche para la inmovilización de un grupo indicador sobre un sustrato sólido.

5 La figura 27 es un modelo conceptual de un dispositivo con una única entrada con un orificio de muestras que se puede sellar para torunda con asa separable.

La figura 28 es una clave para los símbolos gráficos utilizados en las figuras 1 a 4.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

10 Aunque la siguiente descripción detallada contiene muchos detalles específicos con el propósito de ser ilustrativos, cualquier experto en la técnica se dará cuenta que muchas variaciones y alteraciones de los siguientes detalles se encuentran dentro del alcance de la invención. Por consiguiente, las realizaciones de ejemplo de la invención descritas a continuación se presentan sin ninguna pérdida de generalidad de la invención reivindicada, y sin imponerle limitaciones,.

15 Las definiciones que vienen a continuación se dan a conocer como ayuda para interpretar las reivindicaciones y la especificación en la presente memoria. Cuando se citan obras mediante referencia y las definiciones contenidas en ésta son incoherentes en parte o en su totalidad con las aportadas aquí, la definición utilizada en éstas puede complementar, pero nunca reemplazar ni enmendar, la definición dada a conocer en la presente memoria.

1. Definiciones

20 Muestras problema: las muestras biológicas representativas incluyen, por ejemplo: sangre, suero, plasma, capa leucocitaria, saliva, exudados de heridas, pus, aspirados de pulmón y otros aspirados respiratorios, aspirados y lavados nasales, drenaje sinusal, líquidos del lavado bronquial, esputo, aspirados del oído medio e interno, aspirados de quistes, líquido cefalorraquídeo, heces, líquido diarreico, orina, lágrimas, secreciones mamarias, contenido de ovarios, líquido ascítico, mucosidad, líquido gástrico, contenido gastrointestinal, descarga uretral, líquido sinovial, líquido peritoneal, meconio, secreción o descarga vaginal, líquido amniótico, semen, descarga del pene o similares, y se pueden analizar. El análisis de torundas o lavados que representan las secreciones de las mucosas o epitelios son aceptables, por ejemplo, torundas de la mucosa de la garganta, amígdalas, pases nasales, gingivales, vagina, uretra, recto, colon inferior y ojos, ya que son homogeneizados, lisados y digestiones de especímenes de tejido de toda clase. Las células de mamíferos son muestras aceptables. Además de los líquidos fisiológicos, las muestras de agua, descargas industriales, productos alimenticios, leche, filtrados de aire, etcétera, son también especímenes problema. En algunas realizaciones, las muestras problema se colocan directamente en el dispositivo; en otras realizaciones se contempla el procesamiento preanalítico.

35 Molécula diana del bioensayo: o «análito de interés» o «molécula diana», pueden incluir un ácido nucleico, una proteína, un antígeno, un anticuerpo, un glúcido, un componente celular, un lípido, un ligando de receptor, una molécula pequeña tal como un fármaco, etcétera. Los ácidos nucleicos diana incluyen genes, porciones de genes, secuencias reguladoras de genes, ARNm, ARNr, ARNt, ARNpi, ADNc y pueden ser monocatenarios, bicatenarios o tricatenarios. Algunas dianas de ácido nucleico tienen polimorfismos, deleciones y secuencias de ajuste alternativo. Pueden existir varios dominios diana en una sola molécula, por ejemplo, un inmunógeno puede incluir varios determinantes antigénicos. Un anticuerpo incluye regiones variables, regiones constantes y la región Fc, que es valiosa para inmovilizar los anticuerpos.

Patógeno: un microorganismo asociado a una infección o enfermedad infecciosa.

40 Afección patogénica: una afección de un mamífero hospedador caracterizado por no estar saludable, a saber, una enfermedad, achaque, morbilidad o rasgo genético asociado a una posible morbilidad.

45 Ácido nucleico: la terminología «ácido nucleico», «polinucleótido» y «oligonucleótido» se utilizan en la presente memoria para incluir una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, que incluyen, pero sin limitarse a ellos, ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos. A menudo se utilizan polímeros de ácidos nucleicos relativamente cortos como «cebadores» o «sondas». La definición abarca ácidos nucleicos de fuentes naturales que se pueden metilar o llevar caperuza, y también formas sintéticas, que pueden contener nucleobases sustitutas o modificadas y se pueden basar en un esqueleto peptídico. Los ácidos nucleicos son generalmente polímeros de adenosina, guanina, timina y citosina y sus formas «desoxi-», pero también pueden contener otras pirimidinas, tales como uracilo y xantina, o espaciadores y bases universales tal como desoxiinosina. Los ácidos desoxirribonucleicos pueden ser monocatenarios o bicatenarios dependiendo de la presencia o ausencia de las secuencias complementarias, y de las condiciones de pH, concentración de sales, temperatura y la presencia o ausencia de determinados disolventes orgánicos, tales como formamida, *N,N*-dimetilformamida, dimetilsulfóxido y *N*-metilpirrolidinona.

55 «Secuencia diana de ácido nucleico» o «plantilla»: tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «diana» se refiere a una secuencia de ácido nucleico en una muestra biológica que se tiene que amplificar y detectar

en el ensayo mediante una polimerasa. La molécula «diana» puede estar presente por «enriquecimiento» o como un analito sin caracterizar en una muestra, y puede consistir en ADN, ADNc, ADNg, ARN, ARNm, ARNr o miARN, bien sintético o nativo de un organismo. El «organismo» no se limita a un mamífero. La secuencia de ácido nucleico diana es una plantilla para la síntesis de una secuencia complementaria durante la amplificación. Las secuencias diana genómicas están indicadas por una lista del orden de las bases, recogidas por convención desde el extremo 5' al extremo 3'.

Indicador, «marca» o «etiqueta»: se refiere a una biomolécula o modificación de una biomolécula que se puede detectar mediante técnicas físicas, químicas, electromagnéticas u otras técnicas analíticas relacionadas. Ejemplos de indicadores detectables incluyen, pero sin limitarse a ellos, radioisótopos, fluoróforos, cromóforos, marcadores de masa, partículas electrodensas, partículas magnéticas, partículas coloreadas, Qdots[®], marcadores de espín, moléculas que emiten quimioluminiscencia, moléculas electroquímicamente activas, enzimas, cofactores, enzimas unidas a sondas de ácido nucleico y sustratos de enzimas. Los indicadores se utilizan en los bioensayos como reactivos y a menudo se unen covalentemente a otra molécula, se adsorben en una fase sólida o se fijan mediante fijación por afinidad específica.

Ligando: cualquier molécula para la cual existe otra molécula (a saber, un «antiligando» o molécula de fijación al ligando) que se fija con afinidad específica al ligando con reconocimiento estereoquímico o que se «encaja» en alguna porción del ligando mediante la molécula de fijación al ligando. Las fuerzas entre el ligando y la molécula de unión son típicamente Van der Waals, puente de hidrógeno, enlace hidrófobo y enlace electrostático. La fijación al ligando típicamente no es covalente y, por lo tanto, se diferencia del «entrecruzamiento» y de la «modificación». Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «ligando» se reserva a los restos de fijación que no son «haptenos peptídicos».

Hapteno peptídico: se refiere a una subclase de haptenos que es un fragmento peptídico. Tal y como se utiliza en la presente memoria, los haptenos peptídicos se utilizan con su anticuerpo complementario al fragmento peptídico como un medio para capturar amplicones con dos colas.

Hapteno es una «clave molecular» reconocida por un anticuerpo, y cuando está fijada a un vehículo inmunógeno y se introduce en un vertebrado, un hapteno desencadenará la formación de anticuerpos específicos contra el hapteno o epítopo. Estas claves moleculares tienen especificidad estereoquímica, generalmente están expuestas en la superficie del vehículo, y tienen una masa molecular menor que el vehículo. Los ejemplos ilustrativos incluyen moléculas pequeñas que proceden de proteínas nativas, estructuras ahorquilladas del ARN, un fármaco o esteroide tal como digoxigenina, las cadenas laterales de los glúcidos que decoran un mucopéptido y péptidos de cadena corta o hélices de proteínas no nativas tales como el toxoide o la toxina de la difteria. Incluso un dipéptido o un lípido, cuando se conjuga a un vehículo inmunógeno adecuado, puede producir una respuesta de anticuerpos, y se puede producir el anticuerpo capturado por afinidad específica del dipéptido o del propio lípido, no del inmunógeno, absorbiendo los anticuerpos inespecíficos con un antisuero o preparando un anticuerpo monoclonal mediante la selección de linfocitos. Aunque un hapteno no es inmunógeno por sí mismo, tiene una inmunoespecificidad dirigida muy precisa y es reconocido por un conjunto muy escaso de anticuerpos complementarios.

Tal y como se utilizan en la presente memoria, los péptidos de cadena corta son un hapteno preferente para etiquetar amplicones que se utilizan para crear colecciones de amplicones etiquetados con peptidilo debido a su química robusta, a su compatibilidad con enzimas como marcadores de cebadores y, esencialmente, a su inmunoespecificidad infinita.

Agente de captura: o «agente de captura por afinidad» es una terminología genérica para un asociado complementario en una pareja de fijación por afinidad y se suele utilizar para capturar un ligando o hapteno fijándolo a una fase sólida. Las parejas de fijación por afinidad incluyen estreptavidina:biotina, anticuerpo:antígeno, hapteno:anticuerpo y antígeno:anticuerpo, por ejemplo, y cualquier miembro de la pareja de fijación por afinidad puede ser el agente de captura.

Superficie del bloque de análisis: o tira reactiva, o campo de análisis, o simplemente «bloque de análisis», tal y como se utiliza en la presente memoria, es una superficie o zona ocupada por un agente de captura por afinidad. La superficie es tridimensional a nivel nanomolecular y generalmente está formada en la superficie de un sustrato en una vía de flujo líquido. El bloque de análisis es generalmente el sitio del ensayo en donde se observa o mide el ensayo a punto final, y como tal puede estar albergado en una cámara de detección con ventana óptica.

Captura heterogénea o inmovilización: se refiere al uso de parejas de fijación por afinidad para concentrar un analito o complejo de detección en una superficie de fase sólida, partícula o material absorbente poroso. La captura en fase sólida o heterogénea se puede conseguir con agentes de captura tal como la inmovilización de antígeno, anticuerpo, avidina, níquel-NTA, lectina u otros sistemas ligando/receptor. Tal y como se cita en la presente memoria, el complejo molecular formado por la captura heterogénea es el «complejo indicador inmovilizado». Tales complejos se estabilizan mediante la unión no covalente y cooperativa.

Inmovilizado: se pueden construir ensayos de reactivos que sirven para capturar y concentrar el analito en una posición o superficie definida del dispositivo, tal como un bloque de análisis. La terminología «inmovilizar» o

«inmovilizado», tal y como se utiliza en la presente memoria, indica que el analito y la fijación del reactivo de captura por afinidad es efectivamente irreversible en las condiciones del ensayo.

Sonda: una «sonda» es un ácido nucleico capaz de unirse a un ácido nucleico diana mediante el apareamiento de bases complementarias con suficiente complementariedad para formar una doble hélice estable a temperatura ambiente. Las sondas se pueden marcar con grupos indicadores. Los marcadores adecuados que se pueden unir a las sondas incluyen, pero sin limitarse a ellos, radioisótopos, fluoróforos, cromóforos, marcadores de masa, partículas electrodensas, partículas magnéticas, marcadores de espín, moléculas que emiten quimioluminiscencia, moléculas electroquímicamente activas, enzimas, cofactores y sustratos de enzimas. Las herramientas para la selección de la secuencia de la sonda, su longitud y las condiciones de hibridación son por lo general familiares para los expertos en la técnica.

Amplificación: tal y como se utiliza aquí, la terminología «amplificación» se refiere a un «procedimiento dependiente de plantilla» que da lugar a un incremento de la concentración de una secuencia de ácido nucleico respecto a su concentración inicial. Un «procedimiento dependiente de plantilla» es un procedimiento que implica la «extensión dependiente de plantilla» de una molécula «cebadora». Una molécula «cebadora» se refiere a una secuencia de un ácido nucleico que es complementaria a una porción conocida de la secuencia diana. Una «extensión dependiente de plantilla» se refiere a la síntesis de ácido nucleico de ARN o de ADN, en donde la secuencia de la hebra recién sintetizada de ácido nucleico viene dictada por las reglas del apareamiento de bases complementarias del ácido nucleico diana y los cebadores.

Amplificón se refiere a un producto de ADN bicatenario por medio de la amplificación con la técnica previa e incluye productos de ADN bicatenarios formados a partir de plantillas de ADN y de ARN.

Amplificón con dos colas se refiere a un producto de ADN bicatenario por medio de una amplificación en el cual las parejas de cebadores etiquetados se incorporan covalentemente, un primer cebador conjugado con un hapteno o epítipo peptídico, un segundo cebador conjugado con un indicador, etiqueta o «ligando» de afinidad. Tal y como se utiliza en la presente memoria, el amplificón con dos colas funciona como un enganche «heterobifuncional» y forma un complejo de detección molecular sobre un sustrato sólido.

Cebador: tal y como se utiliza en la presente memoria se trata de un polinucleótido monocatenario o conjugado polinucleotídico capaz de actuar como punto de inicio para la síntesis de ADN dirigida por la plantilla en presencia de una polimerasa adecuada y cofactores. Los cebadores son generalmente de al menos de 7 nucleótidos de longitud y, más típicamente, oscilan de 10 a 30 nucleótidos de longitud, o más largos. La terminología «pareja de cebadores» se refiere a un conjunto de cebadores que incluye un cebador en 5' «directo» o «secuencia arriba» que se hibrida con el complemento del extremo 5' de la plantilla de ADN a amplificar, y un cebador en 3' «inverso» o «secuencia abajo» que se hibrida con el extremo 3' de la secuencia a amplificar. Obsérvese que ambos cebadores tienen los extremos 5' y 3', y que la extensión del cebador siempre se produce en la dirección de 5' a 3'. Por consiguiente, la conjugación química en el extremo 5', o cerca de él, no bloquea la extensión del cebador por una polimerasa adecuada. Los cebadores se pueden citar como un «primer cebador» y un «segundo cebador», lo que indica una pareja de cebadores en la cual la identidad de los cebadores «directo» e «inverso» es intercambiable. Se pueden utilizar otros cebadores en la amplificación anidada.

En la realización preferente, el primer cebador es un oligonucleótido mono-específico o específico de la clase conjugado a un hapteno o epítipo peptídico reconocido por un anticuerpo específico. Y el segundo «cebador» es un oligonucleótido conjugado a un hapteno, a biotina, a digoxina, a un polisacárido, a un colorante de ficoeritrina, a un fluoróforo, a un agente de fijación por afinidad, a un fragmento Fc de un anticuerpo, a un atrapador de níquel tal como NTA, o a una lectina, etcétera, en el extremo 5' o cerca de él. Los cebadores se pueden seleccionar para que sean «sustancialmente complementarios» a la secuencia de la plantilla sobre la que se diseñó que se hibridaría y para que sirvan como un sitio para el inicio de la síntesis.

Las **polimerasas** son enzimas definidas por su función de incorporación de trifosfatos de nucleósidos, o trifosfatos de desoxinucleósidos, para extender un extremo hidroxilo en 3' de una molécula de cebador. Para una discusión general referente a las polimerasas, véase Watson, J. D. et al., (1987) *Molecular Biology of the Gene*, 4.^a ed., W. A. Benjamin, Inc., Menlo Park, Calif. Los ejemplos de polimerasas incluyen, pero sin limitarse a ellos, ADN polimerasa I de *E. coli*, fragmento «Klenow», polimerasa Taq, polimerasa de T7, polimerasa de T4, polimerasa de T5 y la retrotranscriptasa. Los ejemplos de retrotranscriptasas incluyen la retrotranscriptasa VIH-1 del virus de tipo 1 de la inmunodeficiencia humana, la telomerasa, la retrotranscriptasa M-MuLV del virus de la leucemia murina de Moloney y la retrotranscriptasa AMV del virus de la mieloblastosis aviar.

Se debe advertir que la retrotranscriptasa se suele utilizar en las investigaciones para aplicar la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa a dianas de ARN. La técnica de la PCR clásica sólo se puede aplicar directamente a ADN, pero con el uso de la retrotranscriptasa para sintetizar ADNc a partir de ARN se pueden analizar por PCR las dianas de ARN. La técnica se llama en conjunto reacción en cadena de la polimerasa acoplada a la retrotranscripción (RT-PCR, por su nombre en inglés).

Complementariedad (respecto a los ácidos nucleicos) se refiere a dos secuencias de ácido nucleico monocatenarias

que pueden hibridarse para formar una doble hélice. El emparejamiento de los pares de bases de la doble hélice de dos hebras complementarias no es necesariamente perfecto. La selectividad de la hibridación está en función de la temperatura de hibridación, de la concentración de sales y del solvente, y generalmente se producirá en condiciones poco rigurosas cuando hay una identidad de tan solo el 55% sobre un tramo de al menos 14-25 nucleótidos. La rigurosidad se puede incrementar mediante los métodos bien conocidos en la técnica. Véase M. Kanehisa, *Nucleic Acids Res.* 12: 203 (1984). En cuanto a la hibridación de los cebadores, un cebador que es «perfectamente complementario» tiene una secuencia totalmente complementaria por toda la longitud del cebador y no tiene discordancias. Una «discordancia» se refiere a un sitio en el cual la base en el cebador y la base en el ácido nucleico diana con el cual está hibridado no son complementarias.

5 Complementariedad (respecto a la inmunofijación) se refiere a la fijación anticuerpo:inmunógeno o anticuerpo:hapteno que es inmunoespecífica.

15 Microperla magnética: se refiere a una «nanopartícula», «perla» o «microesfera», o denominado con otros términos como se sabe en la técnica, que tiene al menos una dimensión, tal como un diámetro o circunferencia aparente, en el margen de micrómetros o nanómetros. Un intervalo superior de tales dimensiones es de 600 μm , pero típicamente el diámetro aparente está por debajo de 200 nm, y puede ser 1-50 μm o 5-20 nm, si bien no se limita a ellos. Tales partículas pueden estar compuestas, contener núcleos, o contener dominios granulares, de un material paramagnético o superparamagnético, tal como F_2O_3 y Fe_3O_4 (de tipo cristal de $\alpha\text{-Fe}$), $\alpha\text{'-FeCo}$, $\epsilon\text{-cobalto}$, CoPt , CrPt_3 , SmCo_5 , níquel y aleaciones de níquel, Cu_2MnAl , $\alpha\text{-FeZr}$, $\text{Nd}_2\text{Fe}_{14}\text{B}$, NiTi , por ejemplo. Las ferritas son preferentes, definidas con materiales de compuestos ferrimagnéticos o cerámicos que consisten en varias mezclas de óxidos de hierro tales como óxidos de hematita (Fe_2O_3) o de magnetita (F_3O_4) y óxidos de hierro en aleaciones con otros metales. Estos materiales se suelen utilizar por lo general como partículas que tienen unas dimensiones más pequeñas que un dominio magnético, y pueden estar formados por partículas, perlas o microesferas con aglutinantes tales como polímeros de látex (genéricamente), sílice, como generalmente se conoce bien, y en el marcado están disponibles otros que incluyen tales materiales.

25 Particularmente preferentes son las nanopartículas de Fe_3O_4 con diámetros en el intervalo de 50 nm a 100 μm que están disponibles en el mercado para bioseparaciones magnéticas. Estas partículas son «superparamagnéticas», lo que significa que se ven atraídas en un campo magnético, pero no conservan ningún magnetismo residual después de retirar el campo. Por lo tanto, las partículas superparamagnéticas en suspensión etiquetadas al biomaterial de interés se pueden retirar de una matriz mediante un campo magnético, pero no se aglomeran (a saber, permanecen en suspensión) después de la retirada del campo. También resultan de interés las microperlas de níquel y cobalto. Estas perlas pueden reaccionar con péptidos que contienen histidina.

Las perlas paramagnéticas tienen la propiedad de que se alinean por sí solas a lo largo de las líneas del flujo magnético y son atraídas desde áreas de densidad del flujo magnético más baja hacia las áreas de densidad de flujo magnético más alta.

35 Se debe reconocer que las microperlas magnéticas pueden ser materiales compuestos. Tales perlas pueden además contener otras micro- o nanopartículas aglomeradas con un aglutinante. Los compuestos con etiquetas RF, QDots[®], fluóroforos convertidores al alza, soles y arcillas coloidales, y similares, tienen contemplada su utilización en la presente invención. Una perla magnética no necesita estar completamente formada por un material magnético, sino que puede en cambio comprender materiales magnéticos y no magnéticos.

40 Las microperlas por sí mismas puede ser coloidales y tener propiedades cromógenas, o se pueden combinar con otras partículas metálicas coloidales con propiedades cromógenas. Se pueden utilizar suspensiones mixtas de microperlas modificadas de manera diferente.

45 Las microperlas no son de ninguna manera artículos simples. Pueden modificarse con agentes tensioactivos, tales como detergentes, para controlar sus propiedades reológicas, como en los ferrolíquidos. La superficie de las microperlas se pueden modificar mediante la adsorción o adhesión covalente de moléculas bioactivas, que incluyen agentes de inmunofijación, anticuerpos, enzimas, colorantes, colorantes fluorescentes, extintores de fluorescencia, oligómeros, nucleómeros peptídicos y similares, y más específicamente mediante el recubrimiento con estreptavidina u oligómeros de ADN monocatenario, por ejemplo. Las microperlas de interés en la presente memoria comprenden al menos un elemento paramagnético en ellas, como reconocerán fácilmente los expertos en las técnicas previas.

55 Las matrices adecuadas para las microperlas incluyen poliestireno, divinilbenceno, poliviniltolueno, poliéster, poliuretano, con grupos funcionales opcionales seleccionados entre SO_3 , COOH , NH_2 , glicidil (COC), OH, Cl, tosilo, aldehído y sulfhidrilo. Las partículas a menudo oscilan de 0,3 a 5 μm o más. Las partículas de látex de 100 nm, y 1, 5, 20, 50 o 100 μm están disponibles a granel en el mercado. El sílice se puede utilizar como una matriz o como una cápsula. El silano se puede modificar con OH, NH_2 , COOH y más. Las partículas a menudo oscilan de 0,5 a 3 μm . El dextrano también puede utilizarse como una matriz. Las partículas a menudo oscilan de 20 a 50 nm. También puede utilizarse polisacárido con silano como microperlas fortificadas de sílice cuyo tamaño de partícula oscila en torno a 250 nm. Las matrices de agarosa y celulosa incluyen partículas en el margen de 1 a 10 μm , y se pueden activar para la introducción de grupos funcionales. Las partículas proteicas, tales como gelatina o albúmina, se han utilizado

desde hace tiempo para microesferas magnéticas. Se le activan fácilmente los enlaces amina, carboxilo, hidroxilo y sulfhidrilo con ligandos o etiquetas. Los liposomas son algo más resistentes a la modificación química, pero se han utilizado para hacer partículas magnéticas. También se conocen el óxido de hierro desnudo y otras partículas metálicas paramagnéticas, y se pueden modificar con la adición de grupos sulfhidrilo o atrapadores. Estas partículas a menudo tienen tamaños de 5 a 300 nm. Algunos tipos de poblaciones de partículas se sabe que tienen un tamaño uniforme; en otros, se puede controlar o seleccionar la heterogeneidad.

Tales microperlas se pueden preparar con facilidad. Por ejemplo, se fabrican microperlas modificadas con carboxilo que contienen aproximadamente del 20 al 60% de magnetita mediante la dispersión de una mezcla ferrolíquida de (magnetita)/estireno/divinilbenceno en agua, y la polimerización por emulsión de los monómeros para atrapar la magnetita en una matriz polimérica de microperlas de un diámetro aproximado de 1 µm. Así pues, la magnetita se dispersa por las perlas sólidas. Por lo general se conocen otros medios de la técnica anterior para sintetizar y modificar microperlas.

Las microperlas adecuadas para practicar la presente invención también se pueden comprar de vendedores tales como Bang's Laboratories, Inc (Fishers IN) y Polysciences, Inc (Warrington PA), así como numerosos proveedores especializados en microperlas modificadas tales como Bioscience Beads (West Warwick RI). Los nombres comerciales de tales perlas, de nuevo no como una relación exhaustiva, incluyen microesferas superparamagnéticas Estapor®, microesferas magnéticas uniformes COMPEL™, microesferas Dynabeads® MyOne™ y similares. Las microperlas paramagnéticas de cobalto se venden como Dynabead's MyOne TALON. Las microperlas BioMag Plus de Polysciences tienen una forma irregular y, por consiguiente, más área superficial para la química de afinidad.

Poblaciones: de microperlas; generalmente se utilizan para analizar poblaciones de dianas del ensayo. Una población tal y como se utiliza en la presente memoria se refiere a un conjunto de miembros que comparten algunos elementos comunes o propietarios. Por ejemplo, una población de perlas puede ser similar en que las perlas comparten una etiqueta común, tal como un recubrimiento de avidina, o un código de barras. Una población de ácidos nucleicos que comprende una diana de ensayo puede simplemente compartir una secuencia diana de ácido nucleico, o puede contener una etiqueta común. Una población de anticuerpos puede compartir una especificidad común. Y así sucesivamente.

Paramagnético y superparamagnético se toman como sinónimos funcionales para los propósitos de la presente invención. Estos materiales, cuando se fabrican como microperlas, tienen la propiedad de responder a un campo magnético externo cuando está presente, pero de disipar cualquier magnetismo residual inmediatamente tras la desaparición del campo magnético externo y, por lo tanto, se resuspenden así fácilmente y permanecen monodispersas, pero cuando se colocan cerca de un campo magnético, se aglomeran fuertemente, y el proceso es totalmente reversible simplemente retirando el campo magnético.

Campo de fuerza magnética: es el volumen definido por las líneas de flujo magnético entre dos polos de un imán o dos caras de una bobina. Los electroimanes y la circuitería conductora se pueden utilizar para generar campos magnéticos y localizar los campos magnéticos. También se pueden utilizar imanes permanentes. Los materiales magnéticos permanentes preferentes incluyen NdFeB (neodimio-hierro-boro $\text{Nd}_2\text{Fe}_{14}\text{B}$), ferrita (ferrita de bario o estroncio), AlNiCo (aluminio-níquel-cobalto) y SmCo (samario cobalto). Las fuerzas magnéticas dentro de un campo de fuerza magnética siguen las líneas del flujo magnético. Las fuerzas magnéticas son más fuertes donde el flujo magnético es más denso. Los campos de la fuerza magnética penetran en la mayoría de los sólidos y líquidos. Un campo de fuerza magnética móvil tiene dos vectores: uno en la dirección del desplazamiento del campo y el otro en la dirección de las líneas del flujo magnético.

Reactivo se refiere de forma amplia a cualquier sustancia química o bioquímica utilizada en una reacción, que incluye las enzimas. Un reactivo puede incluir una única sustancia que por sí misma se puede monitorizar (p. ej., una sustancia que se monitoriza a medida que se calienta) o una mezcla de dos o más sustancias. Un reactivo puede estar vivo (p. ej., una célula) o no vivo. Los reactivos de ejemplo para la reacción de amplificación de ácido nucleico incluyen, pero sin limitarse a ellos, tampón, ion metálico (por ejemplo, sal de magnesio), atrapador, polimerasa, cebador, plantilla, trifosfato de nucleósido, marcador, colorante, inhibidor de las nucleasas y similares. Los reactivos para las reacciones enzimáticas incluyen, por ejemplo, sustratos, cromógenos, cofactores, enzimas acopladoras, tampón, iones metálicos, inhibidores y activadores. No todos los reactivos son reactantes.

Detergente: incluye tensioactivos aniónicos, catiónicos, zwitteriónicos y no iónicos.

Robustez: se refiere a la tolerancia relativa de un formato de ensayo a la variabilidad en la ejecución, a sustituciones de materiales y a las interferencias, a lo largo de un abanico de condiciones de ensayo. La robustez por lo general se incrementa con la fuerza de la señal de detección generada por un resultado positivo. La robustez se correlaciona negativamente con la dificultad y complejidad del ensayo.

Especificidad: se refiere a la capacidad que tiene un ensayo para diferenciar de forma fiable entre una señal positiva verdadera del biomarcador diana y cualquier señal de fondo, errónea o interferente.

Sensibilidad: se refiere al límite inferior de detección de un ensayo donde ya no resulta fiable diferenciar un negativo de un positivo.

Estabilidad: durante el almacenamiento denota inestabilidad cualquier cambio de composición medido en un parámetro, por ejemplo actividad, concentración, degradación, viscosidad, pH o composición de partículas, que es mayor del 10% en el tiempo. Los cambios menores o iguales al 10% son signo de estabilidad. El periodo de tiempo a lo largo del cual se mide la estabilidad es relativo, según la utilidad pretendida de la composición. La estabilidad acelerada a una temperatura más alta a veces se toma como un modo más rápido de extrapolar la estabilidad durante periodos largos de tiempo que los que se miden realmente.

Punto final: un «punto final» o «punto de datos» se utiliza aquí como una abreviación para un «resultado» de ensayos cualitativos o cuantitativos, y puede referirse tanto a puntos finales estables en donde se alcanza un valor o nivel meseta constante del reactivo, y para la velocidad de las reacciones, en donde la velocidad de aparición o desaparición de un reactante o producto en función del tiempo (a saber, la pendiente) es el punto de datos.

Cartucho microfluídico: un «dispositivo», «tarjeta» o «chip» con estructuras fluidicas y canales internos que tienen dimensiones microfluídicas. Estas estructuras fluidicas pueden incluir cámaras, válvulas, válvulas de purga, vías, bombas, entradas, boquillas y medio de detección, por ejemplo. Por lo general, los canales microfluídicos son pasajes de líquidos que tienen al menos una dimensión transversal interna de menos de unos 500 μm y típicamente están entre unos 0,1 μm y unos 500 μm , pero extendemos el límite superior del intervalo a 600 μm porque el carácter macroscópico de las suspensiones de perlas utilizadas aquí tienen un efecto catastrófico sobre el régimen del flujo microfluídico, en particular en lo que se refiere a las restricciones en las vías del líquido. Por lo tanto, tal y como se define en la presente memoria, los canales microfluídicos son pasajes de líquido que tienen al menos una dimensión transversal interna que de menos de 600 μm . El régimen del flujo microfluídico se caracteriza por ser un flujo de Poiseuille o «laminar». La fracción del volumen de partículas (φ) y la proporción del diámetro del canal por el diámetro de las partículas (D/d) tiene un efecto medible sobre las características del flujo (véase, por ejemplo, Staben M. E. et al. 2005. «Particle transport in Poiseuille flow in narrow channels». *Intl. J. Multiphase Flow* 31: 529-47, y las referencias citadas en ella).

Los cartuchos microfluídicos pueden fabricarse de distintos materiales con técnicas tales como el troquelado con láser, grabado en relieve, estampación, moldeado por inyección, enmascaramiento, grabado y litografía suave tridimensional. Los cartuchos microfluídicos laminados se fabrican además con intercapas adhesivas o con técnicas de adhesión térmica sin adhesivo, tal como mediante el tratamiento con presión de polipropileno orientado. La microarquitectura de los cartuchos microfluídicos moldeados y laminados puede ser diferente.

Canal microfluídico: también denominado «microcanal», es un canal de líquidos cuya longitud es variable, pero cuya dimensión transversal es de menos de 500 μm . El comportamiento del flujo del líquido microfluídico en un canal microfluídico está muy lejos de lo ideal y es laminar, y puede ser más dependiente de las propiedades de humedecimiento de la pared, de rugosidad, y de viscosidad, adhesión y cohesión del líquido que de la caída de la presión de un extremo a un extremo al otro o en la zona del corte transversal. El régimen de flujo microfluídico se asocia a menudo a la presencia de «paredes líquidas virtuales» en el canal. Sin embargo, en los canales más grandes, la presión hidrostática de carga de 10 psi o más puede generar regímenes de flujo transitorios que lindan en lo turbulento, que pueden ser importantes en las etapas de enjuague de los ensayos.

Los microcanales construidos por capas formadas mediante moldeado por extrusión pueden tener perfiles de canal más redondeados y un radio en cada «vía». La superficie interna del canal de las partes moldeadas por inyección son también algo más lisas. Las características de flujo de los canales son importantes debido a los profundos efectos de superficie en el régimen de microflujo. La tensión superficial y la viscosidad componen los efectos de rugosidad superficial. La dimensión más estrecha de un canal tiene el efecto más serio en el flujo. Lo siguiente es que el flujo en los canales que tienen perfiles transversales circulares o rectangulares está controlado por la anchura de la diagonal o el diámetro, y el diseño varía típicamente para sacar ventaja de este comportamiento. La reducción de la unión cónica en la dirección del flujo conduce a un efecto de mecha para los diámetros por debajo de 200 μm . Y al contrario, puede detenerse el flujo abriendo un canal para formar una ampolla a menos que se aplique presión. Las vías en un canal pueden diseñarse para que favorezcan el flujo direccional, una especie de válvula de comprobación en estado sólido.

Bombas microfluídicas: incluyen, por ejemplo, ampollas, fuelles, diafragmas o burbujas diseñadas para forzar el movimiento de los líquidos, en donde las subestructuras de la bomba tienen un grosor u otra dimensión de menos de 1 mm. Tales bombas incluyen las bombas de recirculación que actúan mecánicamente descritas en las patentes de los EE.UU. 6 743 399 de Weigl y 2005/0106066 de Saltzman, asignadas habitualmente al solicitante. Tales bombas se pueden hacer funcionar a mano o por control robotizado. También se proporcionan bombas electrosmóticas. Tales bombas se pueden utilizar en lugar de empujes externos para impulsar el flujo de los reactivos solubilizados y de la muestra en los ensayos con dispositivos microfluídicos.

Bomba de fuelle: es un dispositivo formado como una cavidad, a menudo con forma cilíndrica, partida en dos en corte coronal por un diafragma elastomérico para formar una primera y una segunda semicámaras que no están conectadas por fluidica. El diafragma está controlado por un generador de pulsos neumáticos conectado a la primera semicámara. La presión positiva por encima del diafragma lo distiende y desplaza el contenido de la segunda semicámara, la presión manométrica negativa (succión) la retrae, y se expande la segunda semicámara a la vez que se introduce el líquido. Por semicámara se debe entender que la superficie eficaz del diafragma es la menor del

desplazamiento de volumen con presión positiva y el desplazamiento del volumen con presión de succión y, por lo tanto, es óptima cuando la primera y la segunda semicámaras son casi simétricas o iguales en volumen por encima y por debajo del diafragma. La segunda semicámara está conectada a un orificio de entrada y salida del líquido. El orificio de entrada y el de salida del líquido pueden ser orificios distintos o un único orificio, pero, en cualquier caso, están controlados por una válvula. Tal y como se describe más arriba, un generador de pulsos neumáticos está conectado neumáticamente a la primera semicámara, generalmente mediante un microcanal, que también tiene una válvula. En el aparato completo se puede programar el impulso neumático. Así pues, la lógica programable de la presión neumática utilizada por el generador de pulsos tiene dos funciones, accionar el diafragma cuando llega la señal, y abrir y cerrar las válvulas cuando llega la señal. Cuando el generador de pulsos está fuera del cartucho, se proporcionan boquillas o tomas, un distribuidor neumático y válvulas solenoides.

Cuando está en funcionamiento, el líquido entra en la segunda semicámara de una bomba de fuelle a través de la válvula de entrada cuando se aplica presión negativa al diafragma (o pasivamente, cuando el líquido es empujado por una segunda bomba de fuelle). Entonces, cuando se aplica una presión positiva al diafragma, el contenido del líquido de la cámara sale de ella a través de la válvula de salida. De igual forma, las señales de presión positiva y negativa controlan la apertura y el cierre de las válvulas. Al proporcionar un tren de pulsos de presión positiva y negativa a un diafragma, el líquido entrará y saldrá de una cámara de la bomba de fuelle. Este movimiento del líquido se hace direccional mediante la aplicación de una lógica de válvulas sincronizadas, y así la actúa de bombeo.

Las parejas de bombas de fuelle, a saber, «bombas de fuelle duales», pueden mezclar suspensiones de perlas o partículas en líquidos cuando se configuran con un primer diafragma activado a presión y un segundo diafragma pasivo, de modo que se fuerza el flujo recíproco entre las dos cámaras de fuelle después de que se cierran las válvulas de entrada y salida. El flujo recíproco también puede obtenerse con la acción sincronizada sobre ambos diafragmas con pulsos neumáticos alternantes o inversos. De igual forma, pueden conectarse en serie por fluidica numerosas bombas de fuelle para realizar una función de mezclado.

Válvulas microfluidicas: incluyen un género de controladores de flujo por accionamiento hidráulico, mecánico, neumático, magnético y electrostático con al menos una dimensión de menos de 500 μm . En la patente de los EE.UU. n.º 6 431 212 se describe una válvula de charnela representativa del género. También se incluyen válvulas de retención. Una clase de válvulas se refiere a una configuración en la que se cruzan un canal de flujo y un canal de control y están separados por una membrana elastomérica que puede curvarse hacia el canal de flujo o retraerse de él en respuesta a una fuerza de accionamiento en el canal de control. Las patentes que describen especies de válvulas microfluidicas incluyen las patentes de los EE.UU. n.º 5 971 355, 6 418 968, 6 51 899, 6 620 273, 6 748 975, 6 767 194, 6 901 949, y las solicitudes de patente de los EE.UU. n.º 2002/0195152 y 2005/02005816, varias de las cuales están habitualmente asignadas al solicitante.

Válvula de retención: es una válvula unidireccional. Son válvulas de retención las versiones a microescala de válvulas de flotador con resorte, con charnela y basculantes.

Válvulas de cierre pasivas: son insertos o revestimientos hidratables en canales microfluidicos que se hinchan cuando están sumergidos, con lo que cierran el microcanal al flujo en cualquier dirección. Análogamente, las «válvulas de tensión superficial» que consisten en un anillo de material hidrófobo en las paredes de un microcanal se ha descrito que retrasan o detienen el flujo de un reactivo. La detención del flujo también puede conseguirse ensanchando la unión cónica del diámetro de un canal microfluidico.

Autocebado: connota un canal microfluidico que está fabricado de un material, o está tratado, de tal modo que el canal es hidratable y el flujo capilar comienza generalmente sin necesidad de cebar el canal.

Vía: una etapa en un canal microfluidico que proporciona un camino al líquido desde una capa de sustrato a otra capa de sustrato por encima o por abajo, característica de los dispositivos laminados construidos en capas.

«Orificios de aire»: se refiere a los brazos de un distribuidor neumático controlado por programa de servomecanismos externos. El distribuidor neumático se puede cargar con una presión manométrica positiva o negativa. Se ha encontrado que las presiones de funcionamiento de ± 5 a 10 psig son satisfactorias.

Ampollas comprimibles: son dispositivos de micro-«rellenado» que, cuando se comprimen, sirven para generar una presión hidráulica de carga en un dispositivo microfluidico y favorece la mezcla, y pueden estar hechas de poliuretano, por ejemplo.

Cojín: un paquete de reactivo en el sistema analizador formado por una bolsita deformable, por ejemplo una microbolsa de Mylar[®], opcionalmente encerrada en un dispositivo de impulsión neumática que pincha la bolsa para liberar su contenido en un momento controlado. Los colaminados de un metal y un plástico son preferentes por consideraciones de estabilidad.

Envase en láminas al vacío: un paquete de reactivo en el sistema analizador bajo un diafragma deformable (elástico). Utilizado para suministrar los reactivos al presurizar el diafragma y yuxtaponerlo a algo «cortante», tal como un cheurón metálico, de tal forma que la presión sobre el diafragma rompa el «cojín» (véase cojín). Se pueden usar con válvulas de retención o válvulas de purga que se pueden cerrar para producir el flujo direccional del líquido

y el suministro del reactivo. Los diafragmas elásticos se obtienen con facilidad de poliuretano, polisilicona y polibutadieno, y nitrilo, por ejemplo (véase elastómero). Los diafragmas inelásticos deformables están hechos de tereftalato de polietileno (PET), Mylar[®], polipropileno, policarbonato o nilón, por ejemplo. Otros materiales adecuados para la película deformable incluyen película de parafina, látex, lámina de aluminio y tereftalato de polietileno. Los factores clave para seleccionar una película deformable incluyen el punto de rendimiento y el coeficiente de relajación de la deformación (módulo elástico).

El uso de estos dispositivos permite suministrar o recibir un líquido mientras que se aísla el contenido del dispositivo microfluídico del medio externo, y se protege al usuario de la exposición a los líquidos que contiene.

Aislamiento o «aislado»: el «aislamiento directo» se refiere aquí a la protección del usuario frente a la exposición a materiales clínicos que pudieran estar contaminados con un agente infeccioso o una toxina. El «aislamiento inverso» se refiere a la protección del dispositivo de ensayo frente a la contaminación exógena espuria, tal como con un ácido nucleico, que puede provocar positivos falsos.

Entrada única: se refiere a un dispositivo, tarjeta o cartucho microfluídico que requiere, o permite, sólo una única introducción de muestra, y el ensayo se realiza entonces dentro de un sistema sellado autónomo. Tales dispositivos contienen opcionalmente un dispositivo para sellar o cerrar el orificio de la muestra y un medio en el sistema analizador para desinfectar el contenido del dispositivo y cualquier residuo después de terminar el ensayo. En una realización, el dispositivo se puede desechar después de su uso sin precauciones especiales.

Cámara de residuos o «paquete»: es una cavidad o cámara que sirve de receptáculo para aislar la muestra descargada, la solución de enjuague y los reactivos residuales. Típicamente también incluye un material de efecto de mecha (véase mecha trenzada). Los paquetes de residuos también pueden sellarse con una membrana de aislamiento elástica unida al cerrarse al cuerpo del dispositivo microfluídico. Esta membrana interna se expande a medida que se expande el material absorbente, lo que encierra al material residual. La cavidad fuera de la membrana de aislamiento se ventila a la atmósfera, por lo que el material residual está contenido y aislado. Los paquetes de residuos pueden contener opcionalmente esterilizantes líquidos o secos.

Mecha trenzada: se trata de un material muy absorbente utilizado para propulsar el flujo del líquido por hidratación del capilar en lugar de, o en coordinación con, las bombas microfluídicas. El núcleo muy absorbente típicamente incluye una red fibrosa de fibras naturales o sintéticas y también a menudo incluye ciertos materiales gelificantes absorbentes que se suelen denominar «hidrogeles», materiales «superabsorbentes» o «hidrocoloides». Los materiales incluyen papeles, esponjas, materiales para pañales, Conect-Wipe y otros. También pueden utilizarse secantes, tales como sulfato de calcio, gel de sílice, solo o en combinación con materiales muy absorbentes.

Trampa: una trampa de líquido con una presa que aísla adicionalmente un reservorio de residuos de una válvula de purga.

Válvula de purga: un poro que intercomunica una cavidad interna con la atmósfera. Una «válvula de purga de aislamiento» o «higiénica» también contiene un elemento de filtro que es permeable a los gases, pero que es hidrófobo y resistente a la hidratación. Opcionalmente, estos elementos de filtro tienen poros cuyo diámetro es de 0,45 µm o menos. Estos filtros funcionan aislando en ambos sentidos. Los elementos de filtro de este tipo y construcción también se pueden colocar internamente, por ejemplo, para que una válvula o bomba de fuelle esté aislada del distribuidor neumático que la controla.

Campo de análisis: se refiere al sitio en el ensayo basado en el dispositivo microfluídico en donde se observa o se mide el punto final del ensayo, tal como una ventana óptica, y es opcionalmente una cámara de detección que contiene bloques de análisis.

Conjunto de componentes para la captura de la diana de ácido nucleico se refiere a una combinación de un sustrato de fijación por afinidad al ácido nucleico en fase sólida y un medio para colocar el sustrato de fijación en la vía del líquido de un dispositivo microfluídico. Los sustratos de fijación incluyen filtros, perlas, fritas, lechos fluidificados y superficies sólidas en general. Los materiales incluyen sílice, sílice modificado, alúmina, circona, perlas de látex tratadas y similares. La manera de colocarlo puede ser tan simple como depositar directamente las perlas en un canal microfluídico, o más complejos tal como montar una membrana o una frita de filtro en la vía del líquido en el canal. Una membrana de filtro puede introducirse en un recorte de una capa, pegarse en su sitio, encajarse en su sitio en forma de un obturador de filtro o estar contenida en un alojamiento montado previamente que se ajusta en su sitio con presión. Por lo general, una frita se ajusta con presión o se decapa en su sitio.

Elastómero: en general, los elastómeros se deforman cuando se les aplica fuerza, pero luego regresan a su forma original cuando se retira la fuerza. La elasticidad mostrada por los materiales elastoméricos se puede caracterizar mediante un módulo de Young. Los materiales elastoméricos utilizados en los dispositivos microfluídicos descritos en la presente memoria tienen típicamente un módulo de Young entre aproximadamente 1 Pa y 1 TPa, en otros casos entre unos 10 Pa y 100 GPa, aún en otros casos entre unos 20 Pa y 1 GPa, aún en otros casos entre unos 50 Pa y 10 MPa y en algunos casos entre unos 100 Pa y 1 MPa. También se puede utilizar los materiales elastoméricos que tienen un módulo de Young fuera de estos intervalos en función de las necesidades de una aplicación particular.

Algunos dispositivos microfluídicos descritos en la presente memoria se fabrican de un polímero elastomérico tal como poliisopreno, polibutadieno, policlorofeno, poliisobutileno, poli(estireno-butadieno-estireno), nitrilos, los poliuretanos y las polisiliconas. GE RTV 615, un elastómero (familia) de silicona (de tipo) entrecruzado con vinil-silano, y membrana de polidimetilsiloxano (PDMS) disponible como membranas HT-6135 y HT-6240 de Bisco Silicons (Elk Grove, IL) son útiles para determinadas aplicaciones. La elección de los materiales depende típicamente de las propiedades del material concreto (p. ej., resistencia a disolventes, rigidez, permeabilidad de los gases y/o termoestabilidad) requeridas para que se lleve a cabo la aplicación. Otros materiales elastoméricos que se pueden utilizar en la fabricación de los componentes de los dispositivos microfluídicos se describieron en Unger et al. 2000 *Science* 288: 113-116. Algunos elastómeros de los presentes dispositivos se utilizan como diafragmas y además de por sus propiedades de tensión y relajación, se seleccionan también por su porosidad, impermeabilidad, resistencia química y sus características de hidratación y pasivación. Otros elastómeros se seleccionan por su conductividad térmica. El material Micronics Parker Chomerics Thermagap 61-02-0404-F574 (grosor de 0,020") es un elastómero suave (<5Shore A) que necesita sólo una presión de 5 a 10 psi para proporcionar una conductividad térmica de 1,6 W/m-°K.

Las películas deformables, que carecen de elasticidad, también se usan en los dispositivos microfluídicos de la invención.

Ensayo de flujo lateral: se refiere a una clase de ensayos convencionales en los que la agregación, aglutinación o fijación se detecta al aplicar un líquido que contiene partículas a una capa fibrosa, tal como una membrana permeable, y observar las propiedades cromatográficas a medida que las partículas y los agregados de partículas se mueven en el material y a través de él. Se impide la penetración de agregados de partículas, mientras que partículas libres sí penetran entre las fibras. De igual forma, las partículas libres se pueden acumular como agregados en zonas de la capa fibrosa tratadas con agentes de fijación por afinidad. Los dispositivos y métodos descritos aquí no son ensayos de flujo lateral.

«Convencional» es un término que designa que lo que se conoce en la técnica anterior con la que está relacionada esta invención.

«Aproximadamente», «unos» y «generalmente» son expresiones amplias de inexactitud, que describen una condición que es «más o menos», «aproximadamente» o «casi» en el sentido de «prácticamente», en donde la variación sería insignificante, obvia o de una utilidad o función equivalente, y que además indica la existencia de excepciones menores obvias a una norma, regla o límite.

En la presente memoria, cuando se describe un «medio para una función», se debe entender que el alcance de la invención no está limitado al modo o modos ilustrados en los dibujos únicamente, sino que también abarca todos los medios que lleven a cabo el funcionamiento que se describe en esta especificación, y todos los medios habitualmente conocidos en la técnica en el momento del registro. Uno «medio de la técnica previa» abarca todo medio que lleve a cabo el funcionamiento tal y como conoce un experto en la técnica en el momento del registro.

Medio para la extracción: se refiere a distintos elementos citados de un dispositivo, tal como un sustrato sólido, filtro, obturador de filtro, lecho de perlas, frita o columna, para capturar ácidos nucleicos diana de una muestra biológica, e incluye el conocimiento acumulado en la técnica citado en la presente memoria mediante referencia a unos pocos ejemplos.

Un medio para polimerizar, por ejemplo, puede referirse a diferentes especies de la maquinarias moleculares descritas como polimerasas y sus cofactores y sustratos, por ejemplo, retrotranscriptasas y polimerasa Taq, e incluye el conocimiento acumulado de la enzimología citado en la presente memoria mediante referencia a unos pocos ejemplos.

Medio para amplificar incluye termociclado y medio isotérmico. La primera técnica de termociclado fue la reacción en cadena de la polimerasa (citada como PCR) que se describe en detalle en las patentes de los EE.UU. n.º 4 683 195, 4 683 202 y 4 800 159, Ausubel et al. *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, Md, (1989) y en Innis et al., («PCR Protocols», Academic Press, Inc., San Diego, Calif, 1990). Las metodologías de reacción en cadena de la polimerasa se conocen bien en la técnica. Brevemente, en la PCR se preparan dos secuencias cebadoras que son complementarias a regiones de las hebras complementarias opuestas de una secuencia diana. Se añade un exceso de trifosfatos de desoxinucleósido a una mezcla de reacción junto con una ADN polimerasa, p. ej., la polimerasa Taq. Si la secuencia diana está presente en una muestra, los cebadores se fijarán a la diana y la polimerasa extenderá los cebadores a lo largo de la secuencia marcadora mediante la adición de nucleótidos. Con la subida o la bajada de la temperatura de la mezcla de reacción, los cebadores extendidos se disociarán de la plantilla para formar productos de reacción, los cebadores en exceso se unirán a la plantilla y a los productos de la reacción, y se repetirá el proceso. Al añadir agentes intercalantes fluorescentes, los productos de la PCR se pueden detectar en tiempo real.

Una técnica isotérmica es LAMP (amplificación isotérmica del ADN mediante bucles) y se describe en Notomi, T. et al. *Nucl. Acid Res.* 2000 28: e63.

La amplificación por desplazamiento de hebra (SDA, por su nombre en inglés) es otro método para llevar a cabo la

amplificación isotérmica de ácidos nucleicos que implica varias rondas de desplazamiento y de síntesis de hebras, a saber, traslado de mella (Walker et al., *Nucleic Acids Research*, 1992: 1691-1696). Un método similar, llamado reacción en cadena de reparación (RCR), implica la hibridación de varias sondas a lo largo de una región de la que se desea su amplificación, seguida de una reacción de reparación en la que sólo están presentes dos de las cuatro bases. Las otras dos bases se pueden añadir como derivados biotinilados para facilitar la detección. En la SDA se utiliza una estrategia similar. Las secuencias específicas diana también se puede detectar mediante una reacción cíclica de la sonda (CPR, por su nombre en inglés). En la CPR, una sonda que tiene secuencias en 3' y 5' de ADN inespecífico y una secuencia central de un ARN específico se hibrida al ADN que está presente en una muestra. Tras la hibridación, la reacción se trata con ARNasa H, y los productos de la sonda se identifican como productos distintivos que se liberan después de la digestión. La plantilla original se hibrida a otra sonda de ciclación y se repite la reacción.

Otra técnica de amplificación de ácidos nucleicos es la reacción en cadena de la polimerasa acoplada a retrotranscripción (RT-PCR). Primero se fabrica el ADN complementario (ADNc) a partir de una plantilla de ARN mediante una enzima retrotranscriptasa y luego se realiza la PCR con el ADNc resultante.

Otro método de amplificación es la reacción en cadena de la ligasa («LCR»), descrita en la EPO n.º 320 308. En la LCR se preparan dos parejas de sondas complementarias y, en presencia de la secuencia diana, cada pareja se unirá a las hebras complementarias opuestas de la diana de tal forma que estén contiguas. En presencia de una ligasa, las dos parejas de sondas se unirán para formar una sola unidad. Mediante ciclado de la temperatura, como en la PCR, las unidas ligadas unidas se disocian de la diana y entonces sirven como «secuencias diana» para la ligación de las parejas de sondas en exceso. La patente de los EE.UU. n.º 4 883 750 describe un método similar a la LCR para fijar parejas de sondas a una secuencia diana.

La replicasa Q β se puede utilizar también como otro método más de amplificación en la presente invención. En este método, una secuencia replicativa del ARN que tiene una región complementaria a la de una diana se añade a una muestra en presencia de una ARN polimerasa. La polimerasa copiará la secuencia replicativa que entonces se puede detectar.

Aún otros métodos de amplificación, descritos en la solicitud de patente de Gran Bretaña n.º 2 202 328 y en la solicitud de patente internacional PCT n.º PCT/US89/01025, se pueden utilizar de acuerdo con la presente invención. En la primera solicitud, los cebadores «modificados» se utilizan en una síntesis de tipo PCR dependiente de la enzima y de la plantilla. Los cebadores se pueden modificar mediante marcación con un resto de captura (p. ej., biotina) y/o un resto detector (p. ej., una enzima). En la última solicitud, a una muestra se le añade un exceso de sondas marcadas. En presencia de la secuencia diana, la sonda se fija y se escinde catalíticamente. Después de la escisión, la secuencia diana se libera intacta para que se le fije una sonda de exceso. La escisión de la sonda marcada señala la presencia de la secuencia diana.

Otros procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos incluyen los sistemas de amplificación basados en la transcripción (TAS, por su nombre en inglés), que incluyen la amplificación basada en la secuencia del ácido nucleico (NASBA, por su nombre en inglés) y amplificación de secuencias automantenida (3SR, por su nombre en inglés) (Kwoh et al., 1989, *Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 86: 1173; Gingeras et al., solicitud PCT de patente internacional WO 88/10315). En la NASBA, los ácidos nucleicos se pueden preparar para amplificarlos mediante la extracción estándar con fenol/cloroformo, desnaturalización con calor de una muestra clínica, tratamiento con tampón de lisis y columnas MiniSpin[®] para aislar el ADN o el ARN o extracción del ARN con cloruro de guanidinio. Estas técnicas de amplificación implican hibridar una sonda que tiene secuencias específicas de la diana. Después de la polimerización, los híbridos ADN/ARN se digieren con ARNasa H, mientras que las moléculas de ADN bicatenario se desnaturalizan con calor de nuevo. En cualquier caso el ADN monocatenario se hace totalmente bicatenario mediante la adición de un segundo cebador específico de la diana, seguido de la polimerización. Las moléculas de ADN bicatenario se transcriben luego muchas veces mediante una ARN polimerasa, tal como T7 o SP6. En una reacción cíclica isotérmica, los ARN se retrotranscriben en ADN monocatenario, que luego se convierte en ADN bicatenario, y luego se transcribe otra vez con una ARN polimerasa, tal como T7 o SP6. Los productos resultantes, bien truncados o completos, indican secuencias específicas de la diana.

Davey et al., EPO n.º 329 822 describen un proceso de amplificación de ácido nucleico que implica la síntesis cíclica de ARN monocatenario («ARNmc»), ADNmc, y ADN bicatenario (ADNbc), que se puede utilizar de acuerdo con la presente invención. El ARNmc es una plantilla para un primer oligonucleótido cebado, que es elongado por la retrotranscriptasa (ADN polimerasa dependiente de ARN). A continuación, el ARN se retira del dúplex ADN:ARN resultante por la acción de la ribonucleasa H (ARNasa H, una ARNasa específica del ARN en dúplex con ADN o ARN). El ADNmc resultante es una plantilla para un segundo cebador, que también incluye las secuencias de un promotor de la ARN polimerasa (ejemplificado mediante la ARN polimerasa de T7) en 5' de su homología con la plantilla. Este cebador se extiende entonces mediante una ADN polimerasa (ejemplificada por el fragmento grande «Klenow» de la ADN polimerasa D de *E. coli*), lo que da lugar a una molécula de ADN bicatenario («ADNbc»), que tiene una secuencia idéntica a la del ARN original entre los cebadores y que tiene además, en un extremo, una secuencia promotora. Esta secuencia promotora será utilizada por la ARN polimerasa adecuada para construir muchas copias de ARN a partir del ADN. Estas copias luego vuelven a entrar en el ciclo, lo que conduce a una amplificación muy veloz. Con la elección de las enzimas idóneas, esta amplificación se puede realizar de modo

isotérmico sin añadir enzimas a cada ciclo. Debido a la naturaleza cíclica de este proceso, se puede elegir una secuencia de comienzo que esté tanto en forma de ADN como de ARN.

5 Miller et al. en la solicitud PCT de la patente internacional WO 89/06700 describen un esquema de amplificación de secuencias de ácido nucleico basado en la hibridación de una secuencia promotor/cebador que se encuentra en un ADN monocatenario («ADNmc») diana seguido de la transcripción de muchas copias de ARN de la secuencia. Este esquema no es cíclico, a saber, las nuevas plantillas no se producen a partir de los ARN transcritos resultantes. Otros métodos de amplificación incluyen «RACE» y «PCR de un lado» (Frohman, M.A. En: «PCR protocols: a guide to methods and applications», Academic Press, N. Y., 1990; Ohara et al., 1989, *Proc. Natl. Sci. U.S.A.*, 86: 5673-5677).

10 Los métodos basados en la ligación de dos (o más) oligonucleótidos en presencia de ácidos nucleicos que tienen la secuencia del «dioligonucleótido» resultante, por lo que se amplifica el dioligonucleótido, también pueden utilizarse en la etapa de amplificación de la presente invención. Wu et al., (1989, *Genomics* 4: 560).

Medio para la detección: tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un aparato para mostrar un valor de punto final, a saber, el resultado de un ensayo, y puede incluir un canal de detección y bloques de análisis, y un medio para evaluar una detección a punto final. La detección de los valores a término la evalúa un observador a ojo en el campo de análisis, o una máquina equipada con un espectrofotómetro, fluorímetro, luminómetro, tubo fotomultiplicador, fotodiodo, neflómetro, contador de fotones, voltímetro, amperímetro, pH-metro, sensor capacitivo, transmisor de radiofrecuencias, magnetorresistómetro o dispositivo de efecto Hall. Las partículas, perlas y microesferas magnéticas que tienen o están impregnadas de color o que tienen un índice de difracción más alto se pueden utilizar para facilitar la mejor detección con máquina o visual de un ensayo a punto final. Se pueden utilizar lentes de aumento en la tapadera de la placa, filtros ópticos, líquidos coloreados y marcación para mejorar la detección y la interpretación de los resultados del ensayo. El medio para la detección de las partículas, perlas y microesferas magnéticas también pueden llevar incrustadas o como recubrimiento «marcas» o «etiquetas», tales como, pero sin limitarse a ellos, colorantes tales como cromóforos o fluoróforos; etiquetas de radiofrecuencia, resonancia de plasmones, espintrónica, radiomarcación, dispersión de Raman, quimioluminiscencia o un momento de inducción, como se conocen en la técnica anterior. Las partículas coloidales con firmas cromógenas únicas que dependen de su autoasociación también se anticipa que proporcionan valores a punto final que se pueden detectar. Los QDots[®], tales como CdSe recubierto con ZnS, decorado sobre perlas magnéticas, o amalgamaciones de QDots[®] y micropartículas de Fe₃O₄ paramagnéticas, opcionalmente en una matriz de gel o sol de micropartículas preparadas en una emulsión inversa son un método conveniente para mejorar la sensibilidad de un ensayo de la presente invención, lo que permite que los bloques de análisis sean más pequeños y las matrices sean más grandes. También se anticipa la detección del valor a punto final mediante extinción de fluorescencia. Se conocen bien en la técnica una serie de cromóforos de producto y de sustrato asociados a los ensayos inmunoenzimáticos y proporcionan un medio para amplificar una señal de detección de modo que se mejora la sensibilidad del ensayo. Los sistemas de detección son opcionalmente cualitativos, cuantitativos o semicuantitativos. Se prefiere la detección visual por su simplicidad, aunque el medio de detección puede implicar la detección visual, detección con máquinas, detección manual o detección automática.

Medio para el calentamiento y el enfriamiento: se ha descrito en la técnica anterior una serie de medios para termociclar una cámara llena de líquido. Estos medios de la técnica anterior incluyen elementos de calentamiento por conducción y por convección, tales como electrorresistores, aire caliente, láseres, radiación infrarroja, calentamiento Joule, dispositivos TEC o Peltier, bombas de calor, reactivos endotérmicos y similares, generalmente junto con un sumidero térmico para disipar el calor durante las partes de enfriamiento del ciclo. El medio para calentar puede incluir también el calentamiento por el movimiento de perlas magnéticas empujadas por un campo magnético de alta frecuencia.

45 Los dispositivos de calentamiento y enfriamiento para el termociclado caen en dos categorías: temperatura fija y con rampa de temperatura. Los dispositivos con la temperatura fija mantienen una temperatura relativamente constante en una reacción y se necesitan al menos dos cámaras de reacción para el termociclado. Los dispositivos con rampa de calentamiento variarán la temperatura entre al menos dos puntos establecidos y, por consiguiente, sólo se requiere una cámara de reacción para el termociclado. Se pueden combinar los elementos de calentamiento. Los dispositivos Peltier se pueden utilizar tanto para las aplicaciones de temperatura fija como con rampa de temperatura. Los baños de agua no están bien adaptados al control de la rampa de temperatura para el termociclado.

55 Generalmente, los medios de calentamiento y de enfriamiento interactúan con un miembro fluídico, de tal forma que efectúan un intercambio de calor con el contenido líquido. Para la PCR, los elementos relevantes que forman los canales o cámaras microfluídicos en donde tiene lugar el intercambio de calor se dice que forman parte del conjunto de componentes de la «fluídica e interfase térmica para la PCR».

60 El medio para el aislamiento incluye el cuerpo impermeable del cartucho, válvula de purga hidrófoba permeable a los gases, almohadillas muy absorbentes en las cámaras de residuos, desinfectante en la cámara de residuos, membrana elastomérica que separa el impulsor neumático del envase de láminas al vacío, válvula con membrana elastomérica accionada mediante presión de succión, presión de succión en dicho orificio de entrada de la muestra,

boquilla de goma en el orificio de entrada de la muestra, cierre que encaja a presión sobre el orificio de entrada de la muestra, paquete de reactivos en el sistema analizador y orificio de la muestra con una única entrada.

5 A menos que por el contexto se requiera otra cosa, a lo largo de la especificación y de las reivindicaciones que siguen, la palabra «comprender» y las variantes de la misma, tal como «comprende» y «que comprende», se interpretarán en un sentido inclusivo abierto, es decir, como «que incluye, pero no se limita a».

10 Cualquier referencia a lo largo de esta especificación a «una realización» significa que un rasgo, estructura o característica particular descrito en conexión con la realización está incluido en al menos una realización descrita en la presente memoria. Por consiguiente, las apariciones de la frase «en una realización» en diversos lugares a lo largo de esta especificación no necesariamente se refieren a la misma realización. Además, los rasgos, estructuras o características particulares se pueden combinar de cualquier manera adecuada en una o más realizaciones.

2. Descripción detallada

Los ensayos descritos en la presente memoria tienen tres etapas: extracción, amplificación y detección. Los dispositivos microfluídicos descritos aquí están formados por tres subcircuitos fluidicos que corresponden a estas funciones integradas juntas en un único dispositivo.

15 Refiriéndose ahora a las figuras, la figura 1 es un esquema de un subcircuito microfluídico 100 para el procesamiento de muestras y la extracción de ácidos nucleicos. La muestra, por ejemplo heces, orina, sangre completa o plasma, puede ser líquida, sólida o una mezcla de ambas. En una realización, la muestra líquida se pipetea o se introduce por un orificio para la muestra líquida. En otra realización, la muestra primero se hace líquida y luego se introduce en un orificio para muestras líquidas. En otra realización, una torunda que tiene el material de interés se introduce en una cámara dentro del dispositivo; entonces se rompe el cuello de la torunda y se cierra el dispositivo (como en la figura 27). Se contempla el tratamiento previo cuando sea necesario.

Después de introducir la muestra en el dispositivo, en los dispositivos integrados de la invención, las demás etapas del ensayo son automáticas o semiautomáticas. El dispositivo contiene salvaguardas para evitar la exposición del operario a material peligroso para los humanos después de cerrar el dispositivo.

25 Para efectuar en transporte del líquido se utilizan una bomba de fuelle y las válvulas de retención asociadas.

Para retirar verduras, mucosidad y materia particulada indeseable, la muestra fluidificada se filtra opcionalmente antes a través de un filtro exhaustivo, por ejemplo, hecho de fibras de polipropileno, y luego se mezcla con un tampón de lisis para liberar el contenido de ácido nucleico diana del desecho y los contaminantes que van asociados. Opcionalmente, se puede utilizar el filtrado previo para separar los componentes celulares y plasmáticos de la sangre.

El tampón de lisis en la bolsa del tampón de lisis contiene un caótropro en combinación con un detergente para reducir las asociaciones entre los ácidos nucleicos y las moléculas adherentes y, opcionalmente, contiene un inhibidor de nucleasas y un quelante tal como EDTA para reducir la degradación del ácido nucleico antes del lavado.

35 Hemos utilizado tiocianato de guanidinio a 4,5 M (GSCN), en combinación con detergentes tales como sarcosina y Triton X-100, con tampón ligeramente ácido, para retirar suficiente hemoglobina de la sangre completa, de tal forma que el ácido nucleico pase a sea idóneo para la PCR. El método también es satisfactorio en el caso de las heces. La bacterias gramnegativas se lisan con este tratamiento.

40 La mezcla de la muestra con el tampón de lisis a microescala requiere ingenio. La adaptación de la bioquímica a los reactores líquidos a microescala ha requerido una nueva ingeniería. Según nuestra experiencia, por ejemplo, un mecanismo de mezcla preferente en los dispositivos microfluídicos de la presente invención es una reducción de una dimensión transversal de un canal, de tal forma que se acercan la longitud de la vía difusional esperada a la velocidad de flujo lineal alcanzable. Generalmente, esto se realiza en dispositivos laminados o moldeados manteniendo constante la anchura del canal microfluídico y reduciendo la profundidad del canal de unos 75 μm (3 mil) a unos 25 μm (1 mil). La práctica asegura que las macromoléculas y los solutos se mezclen bastante a lo largo de una longitud predecible del microcanal a una presión hidrostática (AP) de carga o de succion manejables generalmente menor o igual a ± 10 psig. Los impulsores neumáticos se proporcionan para permitir el refluj de la solución entre la cámara de lisis y la bolsa del tampón de lisis. Las membranas elastoméricas aseguran un aislamiento inverso y directo.

50 A continuación, el lisado pasa a través de un conjunto de componentes de captura de la diana del ácido nucleico, que tiene una afinidad reversible e inespecífica por los ácidos nucleicos. El material de captura de la diana es generalmente un material hidrófilo electropositivo, típicamente también rico en grupos hidroxilo. Los materiales adecuados para capturar la diana se describen en la patente de los Estados Unidos U.S. 5 234 809. El conjunto de componentes de captura de la diana puede ser, por ejemplo, una superficie de sílice, una matriz de fibra o un filtro compuesto por materiales tales como sílice, un lecho de sílice o perlas de óxido de aluminio, un obturador fritado de circonio modificado y similares, adaptados a las dimensiones, presiones hidrostáticas y velocidades de flujo de un dispositivo microfluídico. Las perlas pueden ser gruesas o finas, pero por lo general son preferentemente de tamaño

homogéneo. Las fibras puede ser gruesas o finas y estar empaquetadas sueltas o estrechamente, según se requiera para obtener la superficie necesaria para la proporción de volumen, velocidad de flujo y caída de presión aceptable. El medio para sellar la almohadilla de fibras a las paredes de una cámara microfluídica incluyen la construcción en rebaje o mortaja, sellado con junta de estanqueidad o adhesivo, solvente plástico o soldadura mecánica, ajuste de la presión o elementos de construcción modular empaquetados previamente que se pueden encajar por presión en su sitio de tal modo que todo el líquido debe salir a través del lecho de filtro. Para los filtros de membrana, se pueden microelaborar con láser nervaduras de soporte.

Después de la descarga del lisado desde el conjunto de componentes de captura de la diana de ácido nucleico hacia la cámara de residuos mediante el control de una válvula, se enjuaga entonces lo retenido con el reactivo de lavado de la bolsa con el solvente de lavado, y el reactivo de lavado también se descarga en la cámara de residuos mediante el control de la válvula. El reactivo de lavado consiste en etanol anhidro, etanol del 70 al 95% en agua, acetona, o mezclas de acetona, etanol y agua, opcionalmente con tampón. El solvente se conserva en el sistema analizador en un «envase laminado al vacío» revestido con una lámina, al que se le realiza una punción en un momento programado con control neumático, de manera que el contenido lava lo retenido en el conjunto de componentes de captura de la diana de ácido nucleico y pasa a los residuos. El reactivo de lavado retira los lípidos, el EDTA y las sales incompatibles con la amplificación por PCR, mientras se precipitan los ácidos nucleicos. Después de que se ha completado el enjuague del lavado, el material capturado de diana se seca brevemente con una corriente de aire filtrado estéril para retirar el etanol o la acetona residuales.

Después del lavado satisfactorio, el ácido nucleico retenido se eluye del miembro de captura de la diana con tampón de elución de la bolsa del tampón de elución. La «elución repentina» es un procedimiento que optimiza la recuperación mediante el uso del diafragma de la cámara, por lo que el tampón de elución avanza y retrocede sobre el miembro de captura de la diana antes de pasar a los subcircuitos de amplificación como se mostrará en la figura 2.

Este procedimiento produce ácidos nucleicos que se pueden utilizar en la PCR inmediatamente, sin necesidad de un aislamiento intermedio (o purificación), lo que era un inconveniente de los primeros procedimientos. El tampón de elución, que contiene los ácidos nucleicos con la diana, se utiliza directamente para rehidratar una «mezcla de PCR» desecada que contiene reactivos y enzimas, con lo cual se comienza la PCR. También se contemplan otros medios para la amplificación.

Fortuitamente, la elución en el conjunto de componentes de captura de la diana cizalla el ADN genómico de alto peso molecular en fragmentos más adecuados para la PCR, una ventaja añadida para detectar dianas en bajo número de copias. Y como el procedimiento tiene lugar completamente dentro del dispositivo cerrado, esencialmente no hay riesgo de contaminación después de introducir la muestra.

Al utilizar el propio eluido como medio de rehidratación para la mezcla de PCR deshidratada en los subcircuitos de amplificación, no se diluyen adicionalmente las secuencias diana.

Por consiguiente, el tampón de elución, por diseño, sirve como tampón para la PCR. El tampón de elución está diseñado para ser bifuncional e integra sin discontinuidades la preparación de la muestra y la amplificación por PCR de un modo que no se ha intentado previamente a microescala.

AMPLIFICACIÓN

La amplificación por PCR es un ciclo de desnaturalización, hibridación y extensión, como se conoce bien en la técnica.

Volviendo ahora a la figura 2, el eluido de ácido nucleico se transporta a través de canales microfluídicos por válvulas acopladas con control neumático hacia uno o más canales o cámaras para la amplificación. Esta parte del subcircuito de amplificación constituye la «fluídica e interfase térmica para PCR» 200 y está diseñada para optimizar el intercambio de calor y la mezcla. En los canales o cámaras de amplificación, el eluido sirve para rehidratar la mezcla de PCR deshidratada que se depositó de antemano. La mezcla de PCR incluye una concentración optimizada de una sal de magnesio seleccionada entre acetato, cloruro, sulfato de magnesio o similares, como se requiere para la actividad de la polimerasa, un tampón para el pH óptimo y tensioactivos. Los reactivos deshidratados incluyen opcionalmente cloruro de sodio y citrato de sodio sincronizados a las curvas de fusión de los cebadores a utilizar en la reacción de PCR. Simultáneamente, los reactivos y la plantilla de control en el canal de amplificación de control (que no recibe la muestra) se rehidratan con el tampón de elución directamente desde la cámara del tampón de elución. Esta cámara de control negativo se utiliza para comprobar la contaminación de ácido nucleico en el dispositivo.

En nuestra experiencia no se necesita la mezcla para la rehidratación de los reactivos de la PCR. El calentamiento ocasiona un mezcla por convección en el canal o cámara de amplificación, lo que disuelve vigorosamente los reactivos y la matriz, y los distribuye. La pasivación de los subcircuitos de amplificación se lleva a cabo mediante el tratamiento previo y la incorporación de sustancias de pasivación adecuadas en la mezcla de PCR desecada.

La realización de la figura 2 contiene dos cámaras dentro de cada brazo del conjunto de componentes de fluídica y

de interfase térmica para PCR. Éstas se asocian con unos requisitos de temperatura distintos para el termociclado en el protocolo de la PCR. En los ejemplos posteriores se ilustrarán otras configuraciones.

El dispositivo de ensayo tal y como se describe en la figura 2 aboga por dos bloques de TEC en contacto térmico con el canal o la cámara de amplificación, con un control a temperatura fija. Un bloque está asociado a una bomba de fuelle que sirve como una cámara para fusión con las plantillas bicatenarias y disociar los cebadores, y el otro para la hibridación y la extensión de la polimerasa. El control para los bloques de temperatura se suele manipular fuera del dispositivo y está integrado con el control de neumático. Se conocen bien en la técnica otras maneras de calentar y de enfriar.

La temperatura puede ser fija o en rampa, según el diseño del conjunto de componentes de fluidica y de interfase térmica para PCR. Se conciben dispositivos de ensayo con estaciones de temperatura fija. El termociclado con dos o tres estaciones de temperatura, cada uno con una temperatura fija diferente, lleva a cabo la desnaturalización, hibridación y extensión, bien ciclando atrás y adelante la mezcla de reacción de la PCR entre las estaciones de temperatura, o bien mediante el flujo circular del líquido. También se contempla el termociclado en una única estación.

Debe señalarse que la temperatura óptima para la extensión de los cebadores con la polimerasa Taq nativa es de aproximadamente 72 °C, pero se sabe en la técnica que la extensión también se produce en el termociclado de la PCR si no se utiliza una incubación independiente de 72 °C. La temperatura de la cámara de hibridación se puede ajustar entre 20 y 85 °C, más preferentemente entre 50 y 80 °C, y lo más preferentemente entre 55 y 75 °C, según de la concentración de sales y la secuencia del cebador, y la cámara de desnaturalización se ajusta convencionalmente a unos 95 °C, más preferentemente de 96 a 100 °C, para obtener una fusión completa y la disociación de las plantillas bicatenarias y cebadores. Se obtiene con facilidad un tiempo de ciclo completo de menos de 1 minuto. Se ha visto que de forma habitual, el tiempo de ciclado es de menos de 30 s.

Las válvulas acopladas con un control neumático se utilizan para dirigir el flujo desde la fluidica para PCR a los subcircuitos de detección de la figura 3. Por lo tanto, se puede ver que hay dos clases principales de elementos de control neumático. Éstas comprenden diafragmas, los cuales están provistos de interconexiones neumáticas para la conexión con un distribuidor de impulsión neumática controlable y externo. Ambas clases de elementos de control neumático tienen una construcción parecida, y comprenden una entrada de líquido, una salida de líquido y un diafragma elastomérico que separa el líquido de la interconexión neumática, y difieren en que las válvulas comprenden una contención que separa la entrada de líquido de la salida de líquido y las cámaras de fuelle están abiertas por lo que el diafragma, cuando se extiende, llena la cámara y expelle el líquido, y cuando se retrae de la cámara mediante presión de succión en la interconexión neumática, extrae el líquido. Por consiguiente, ambas clases de elementos sirven para controlar las etapas del ensayo automático. Los elementos de control neumático pueden estar acoplados para simplicidad de control o se pueden operar independientemente mediante el diseño de la circuitería de la interconexión neumática y de la lógica de las válvulas. Por consiguiente, la circuitería de interconexiones neumáticas es a veces compleja, lo que requiere un diseño y experimentación considerables.

DETECCIÓN MEDIANTE PERLAS MAGNÉTICAS DE CAPTURA

Volviendo ahora al esquema de la figura 3, se muestra un subcircuito de detección 300. Los productos de amplificación se mezclan primero con perlas magnéticas de captura en la cámara de mezcla magnética. Estas perlas se guardan en las cámaras de reservorio de perlas magnéticas hasta su uso. Las perlas están cubiertas con avidina u otro agente de captura. La avidina, por ejemplo, capturará cebadores conjugados con biotina y amplicones de dos colas. La antidigoxigenina capturará cebadores conjugados con digoxigenina y amplicones de dos colas.

Las perlas magnéticas de captura se guardan típicamente en forma desecada y se reconstituyen por rehidratación con tampón de lavado desde la bolsa de tampón de lavado y rehidratación antes de mezclar con los productos de amplificación. El agente de captura fijado a las perlas se encuentra en exceso, y los cebadores marcados con ligando, tanto los elongados como no elongados, se fijarán a las perlas. La rehidratación y la mezcla están controladas por las válvulas.

El tamaño preferente de las perlas magnéticas en el ensayo es de aproximadamente 0,01 a 50 µm, más preferentemente de 0,5 a 10 µm y lo más preferentemente de 0,8 a 2,8 µm, de diámetro medio. Se prefieren las perlas con un tamaño homogéneo. Se pueden obtener perlas adecuadas de Dynal Invitrogen (Carlsbad CA), Agencourt Bioscience Corp (Beverly MA), Bang's Laboratories, Inc. (Fishers IN), Polysciences, Inc. (Warrington PA), Bioscience Beads (West Warwick RI), Bruker Daltonics (Nashville TN) y AGOWA (Berlín DE), por ejemplo.

Después de mezclar las perlas magnéticas de captura y los productos de amplificación, la mezcla de reacción se envía a una cámara de detección tal y como se muestra en la figura 3. El control de flujo se proporciona de manera hidráulica con bombas de fuelle. La cámara de detección contiene bloques de análisis 301 recubiertos con anticuerpo contra etiquetas de haptenos peptídicos en el amplicón, como se describirá con referencia a las figuras 5 y 26. En las figuras 21 y 22 se dan más detalles de una realización determinada de una cámara de detección que contiene tiras de bloques de análisis. La cámara de detección se proporciona con una ventana óptica para la observación a simple vista o a máquina para detectar lo ocurrido.

Opcionalmente se proporciona un canal o cámara de detección independiente para un control negativo porque la detección de cualquier amplicón en la reacción del control negativo invalidaría el ensayo e indicaría contaminación del dispositivo o de los reactivos. También se puede proporcionar un control positivo.

- 5 En el canal o cámara de detección, las perlas de captura magnéticas y los amplicones cautivos, después del enjuague opcional que se envía a los residuos, se ponen en contacto con un ordenamiento, tira o matriz de bloques de análisis 301 que tienen una geometría definida. Los bloques de análisis se trataron para inmovilizar el anticuerpo o anticuerpos de captura antes montar los componentes del dispositivo, por ejemplo, en poliestireno, mediante el tratamiento de las áreas de plástico delimitadas por una máscara mediante gas caliente ionizado a baja presión, y luego se aplica el anticuerpo y se seca.
- 10 En una realización descrita en la presente memoria, las perlas se dirigen a la superficie del bloque de análisis por el campo magnético y proporcionan un encuentro próximo con el anticuerpo o el agente de captura. Esto favorece la interacción de fijación entre el hapteno y el anticuerpo, por lo que la unión se produce muy rápidamente sin necesidad de extender la incubación. Una vez fijado, se apaga el campo magnético y los bloques de análisis se lavan fácilmente para retirar las partículas residuales sin fijar.
- 15 En la práctica, el tiempo que transcurre desde la amplificación hasta la presentación de datos es menos de 4 minutos. Los campos magnéticos incluyen, convenientemente, imanes permanentes o electroimanes.

20 En otra realización descrita en la presente memoria, la captura con perlas magnéticas para detectar los amplicones de ácido nucleico permite diseñar una estación de detección con varios bloques de análisis. La cámara o canal de captura puede contener un grupo de bloques de análisis (véase la figura 21), cada uno tratable en un «formato de detección múltiplex» mediante una pareja diferente de hapteno:anticuerpo anti-hapteno peptídico, o por otra pareja ligando:agente de captura. La visualización multiplexada de los resultados de detección mejora el nivel de conveniencia para el usuario.

25 La figura 4 ilustra cómo los tres subcircuitos microfluídicos, extracción de muestra 100, amplificación de la diana 200 y detección de la señal 300, se integran en una única tarjeta microfluídica 400. Se utiliza una secuencia de control neumático para mover los líquidos. Las señales neumáticas se envían a las válvulas o directamente hacen subir o bajar los diafragmas, con lo que transmiten una presión positiva o negativa al líquido a la vez que se mantiene el aislamiento de la muestra.

30 También se muestra en la figura 4 la capacidad para expandir el número de canales de amplificación, cada uno con una o más parejas de cebadores independientes en la mezcla de PCR, y entonces recombinar los productos para la detección múltiplex en la estación de detección. En algunas realizaciones se proporcionan 64 o más canales de amplificación. Más preferentes son 16 canales o menos seleccionados por realizar el diagnóstico diferencial necesario y ser detectables de una forma visualmente accesible. Las válvulas y las bombas están acopladas al distribuidor neumático para simplificar la lógica de órdenes. Se pueden analizar muchas muestras en una sola tarjeta.

35 En general, los cartuchos microfluídicos preferentes descritos en la presente memoria comprenden los elementos siguientes,

- 40 a. un orificio de entrada de la muestra, una cámara con un conjunto de componentes de captura de la diana de ácido nucleico, una cámara con tampón de lisis, una cámara con reactivo de lavado, una cámara con tampón de elución, una cámara con tampón de rehidratación, una cámara de residuos con válvula de purga, un conjunto de componentes de fluidica y de interfase térmica para PCR, una cámara para mezcla magnética, un reservorio de perlas magnéticas y una cámara de detección; y además comprende,
- b. un primer microcanal que interconecta con fluidica y con válvulas el orificio de la muestra y la cámara de lisis;
- c. un segundo microcanal que interconecta con fluidica la cámara de lisis con la cámara que contiene el conjunto de componentes de captura de la diana de ácido nucleico;
- 45 d. un tercer microcanal que interconecta con fluidica y con válvulas la cámara de lisis con la cámara que contiene la bolsa de tampón de lisis;
- e. un cuarto microcanal que interconecta con fluidica y con válvulas la cámara que contiene el conjunto de componentes de captura de la diana de ácido nucleico y la cámara con el tampón de lavado;
- 50 f. un quinto microcanal que interconecta con fluidica y con válvulas la cámara que contiene el conjunto de componentes para capturar la diana de ácido nucleico y la cámara con el tampón de elución;
- g. un sexto microcanal que interconecta con fluidica y con válvulas la cámara que contiene el conjunto de componentes para capturar la diana de ácido nucleico y al menos un conjunto de componentes de fluidica y de interfase térmica para PCR (en la figura 4 se muestran varios conjuntos de componentes en paralelo);
- h. un séptimo microcanal que interconecta con fluidica y con válvulas al menos un conjunto de componentes de

fluídica y de interfase térmica para PCR y al menos una cámara de mezcla magnética;

i. un octavo microcanal que interconecta con fluídica y con válvulas al menos una cámara de mezcla magnética y la cámara con el tampón de rehidratación, comprendiendo además el sexto microcanal un reservorio de perlas magnéticas interpuesto entre la cámara del tampón de rehidratación y la cámara de mezcla magnética;

5 j. un noveno microcanal que interconecta con fluídica y con válvulas la cámara de mezcla magnética y al menos una cámara de detección;

k. un décimo microcanal que interconecta con fluídica y con válvulas la cámara que contiene el conjunto de componentes para capturar la diana de ácido nucleico y la cámara de residuos con válvula de purga;

10 l. un undécimo microcanal que interconecta con fluídica y con válvulas la cámara de detección y la cámara de residuos con válvula de purga; y,

además comprende una gran cantidad de elementos de control neumático internos que comprenden válvulas que funcionan con un diafragma y cámaras de fuelle, en donde dicha gran cantidad de elementos de control neumático interno se proporcionan con una circuitería de interconexiones neumáticas para la conexión a un distribuidor controlable y externo de impulsión neumática.

15 Las variantes equivalentes menores, por ejemplo, la interconexión de los microcanales cuarto y quinto (a saber, mediante los cuales el tampón de lisis y el tampón de elución comparten una vía común hacia la cámara que contiene el conjunto de componentes para capturar la diana de ácido nucleico) no tendrían un efecto funcional sobre el funcionamiento del dispositivo. De igual forma, el décimo y undécimo microcanales pueden compartir un orificio común a la cámara de residuos. Pueden darse variantes importantes en la disposición del conjunto de componentes
20 de fluídica y de interfase térmica para PCR, y se tratará más adelante. Estas incluyen en el cartucho interfases únicas o múltiples con cámaras de reacción con interfase. Obviamente, se pueden añadir otros microcanales y funcionalidades, por ejemplo, una cámara entre el conjunto de componentes para capturar el ácido nucleico y el conjunto de componentes para amplificación para uso en la formación de ADNc o de ARNm. Otras variantes obvias incluyen reconfigurar el cartucho para el protocolo de amplificación isotérmica, mediante la eliminación de la
25 interfase de varias temperaturas del conjunto de componentes de fluídica y de interfase térmica para PCR.

De forma más general, los cartuchos comprenden:

a. un medio para extraer ácidos nucleicos de una muestra biológica;

b. un medio para sintetizar amplicones;

c. un medio para detectar amplicones; y, una cámara de aislamiento de residuos,

30 en donde el medio para extraer ácidos nucleicos de una muestra biológica comprende un subcircuito fluídico para extraer ácidos nucleicos de una muestra biológica con fase sólida; el medio para sintetizar amplicones comprende un subcircuito fluídico para sintetizar amplicones sin elemento de mezcla; y el medio para detectar amplicones comprende un subcircuito fluídico con cámara de detección y ventana óptica en un solo miembro desechable integrado, y la fluídica del único miembro integrado son controlables mediante una serie de elementos de control
35 neumático que comprenden válvulas que funcionan con diafragma y cámaras de fuelle, en donde la gran cantidad de elementos de control neumático se proporcionan con una circuitería de interconexiones neumáticas para la conexión a un distribuidor controlable y externo de impulsión neumática.

40 En la configuración automática o semiautomática, el cartucho microfluídico se introduce en un aparato (no se muestra). El aparato comprende un distribuidor de impulsión neumática fuera del cartucho con orificios neumáticos de interconexión y circuitería para la conexión y el control de la gran cantidad de elementos con válvulas y diafragmas de fuelle del cartucho microfluídico. El aparato se hace funcionar mediante un micoprocesador con una programación lógica de las válvulas configurado para controlar la impulsión neumática de los elementos válvula y diafragma. El aparato opcionalmente y además tiene un campo magnético fuera del dispositivo para la manipulación de un reactivo con micoperlas magnéticas, y el imán se monta opcionalmente en un soporte móvil.

45 En la figura 5 se ilustra un complejo molecular de detección positiva de la señal de la diana. El complejo de detección molecular 500 de la figura 5 representa una perla paramagnética 501 inmovilizada sobre un bloque de análisis 502. La sujeción entre la perla y el anticuerpo de captura 503 se forma mediante un amplicón con dos colas 504, en este caso con el primer cebador 506 etiquetado con hapteno peptídico 6 y el segundo cebador 507 etiquetado con biotina 508, a modo de ilustración. Las perlas paramagnéticas están recubiertas con avidina fijada
50 509.

Tal y como se muestra, el anticuerpo o anticuerpos inmovilizados en el bloque de análisis 301 capturarán los amplicones con dos colas. El ligando biotina es capturado por una perla recubierta de avidina, y la perla magnética u otro grupo indicador se inmoviliza a su vez sobre el bloque de análisis. Un número suficiente de perlas inmovilizadas, como las presentes en unos pocos microlitros de reactivo, dan lugar a una coloración visual del

bloque de análisis. Como será obvio para el experto en la técnica, las perlas magnéticas se pueden preparar con ayudas de marcación tales como QDots®, colorantes, RFID, etc, de modo que sean detectables cuando se inmovilizan en los respectivos bloques de análisis.

5 Por consiguiente, se produce una «detección positiva» cuando un amplicón, marcado con un cebador con una cola de biotina en un primer extremo y un cebador con una cola de hapteno peptidílico en un segundo extremo, queda sujeto a un bloque de análisis. Después de la liberación del campo magnético, los bloques de análisis a los cuales se sujetan las perlas magnéticas indican un resultado positivo para la especie de amplicón con cola de hapteno peptidílico. Los bloques de análisis a los cuales no se ancla ninguna perla magnética indican un resultado negativo para el correspondiente amplicón etiquetado con hapteno peptidílico. Dado que se conoce la especie de hapteno peptidílico, dado que el anticuerpo es muy específico, y el bloque de análisis está asignado a la detección de una secuencia de cebadores particular, la detección se puede interpretar como una detección positiva de la secuencia de ácido nucleico concreta que corresponde al bloque de análisis y, por inferencia, es diagnóstico de un patógeno o afección patógena.

15 Las detecciones positivas mediante la utilización de perlas se detectan con facilidad a simple vista, como se muestra en la figura 6, una ventaja significativa para cualquier dispositivo o kit de ensayo de la presente invención en un laboratorio móvil.

20 En un control negativo, típicamente no existirán amplicones de dos colas si no hay contaminación, por lo que los bloques de análisis que corresponden a todos los analitos permanecerán incoloros. Como control positivo se puede incorporar en la cámara de amplificación una plantilla conocida. Debido a la discriminación proporcionada por los anticuerpos anti-hapteno peptidílico, el control positivo puede ser un control interno.

25 La figura 6 es una fotografía de varias tiras de bloques de análisis montadas en cámaras de dirección paralelas. Cada tira representa un acontecimiento de fijación con un amplicón diferente formado a partir de parejas de cebadores seleccionados para los patógenos entéricos o los factores de virulencia: *Salmonella typhi* (Sal), *Campylobacter jejuni* (Camp), Stx1 (toxina 1 de Shiga), Stx 2 (toxina 2 de Shiga), *Shigella dysenteriae* (Shig), *E. coli* O157H enterohemorrágica (marcada como 157H7) y una *E. coli* no patógena (*E. coli*) como control positivo. Las reacciones positivas se ven con claridad sin instrumentación.

30 La estación de detección mostrada en la figura 6 consiste de siete canales de detección múltiple verticales montados en paralelo en una ventana óptica. Cada canal contiene 7 tiras de bloques de análisis, y cada bloque de análisis es de aproximadamente 2 x 0,5 mm. En la figura 21 se muestra una proyección en perspectiva de un canal de detección. En la fotografía es evidente la claridad visual proporcionada por poblaciones de perlas magnéticas fijadas a un bloque de análisis en la forma de la estructura molecular como la descrita en la figura 5.

35 Además, la ingeniería de dispositivos microfluídicos automáticos individuales descritos en la presente memoria ha requerido el desarrollo y la mejora de determinados elementos o miembros microfluídicos. Estos incluyen canales microfluídicos, cámaras, válvulas, árboles de válvulas, filtros, filtros de captura, filtros de aislamiento, distribuidores neumáticos, envases en láminas al vacío (bolsas de reactivos), cámaras de aislamiento de residuos, válvulas de purga higiénicas, cámaras de fuelle, bombas de fuelle, interfases térmicas para el intercambio de calor, mezcladores en línea, cableado en la tarjeta, ventanas ópticas, bloques de análisis y reactivos deshidratados depositados en los microcanales. Y también, los elementos de conexión programables incluyen distribuidores de control neumático, escáneres ópticos y soportes móviles para perlas magnéticas.

40 Los canales microfluídicos tienen preferentemente una sección transversal rectangular. La rugosidad de la pared depende del método de fabricación. Un método preferente de fabricación implica la laminación de hojas delgadas, troqueladas con un láser u otro dispositivo de recorte, para construir capas que contienen líquido y una circuitería neumática. Los microcanales formados por capas generadas por modelado por inyección tienen perfiles de canal más redondeados y un radio en cada «vía». Los canales internos de las partes moldeadas por inyección también son algo más suaves.

45 En el régimen del flujo microfluídico, se forma sobre el sustrato sólido una pared virtual de disolvente fijado, pero el grosor de la pared virtual se puede reducir en parte al pasivar las superficies de contacto de líquidos.

50 La figura 7 es una proyección en planta y otra transversal de un válvula neumática de apertura y cierre de los dispositivos de la invención, que se basa en un diafragma de control neumático para abrir y cerrar un orificio de interconexión entre dos vías en la válvula. El diafragma es típicamente un material elástico que descansa sobre la barrera entre las dos vías de líquido y que cuando se tira de él por vacío, aguanta lo suficiente de modo que el líquido puede fluir debajo de él. Y al contrario, con presión positiva, el diafragma presiona sobre las bocas de las vías e impide el flujo de líquido. Por encima del diafragma, una vía conecta la válvula con un canal microfluídico que tiene una interconexión neumática construida en una capa diferente del dispositivo, que funciona enchufado para interconectar los brazos de un distribuidor neumático complejo utilizado para controlar el ensayo.

55 Las figuras 7B y C son proyecciones transversales de la válvula de apertura y cierre de la figura 7A y muestran su funcionamiento. Un diafragma elastomérico montado encima de la vía de entrada y salida controla el flujo de líquido. En esta realización, cuando se tira del diafragma, el líquido fluye sobre la barrera desde la entrada a la salida.

Cuando el diafragma recibe presión, se bloquea el flujo del líquido. Los diafragmas se mantienen en su lugar entre laminados de plástico mediante capas con las dos caras adhesivas.

La figura 8 representa una matriz de válvulas para la distribución de un líquido. El lado del líquido del árbol de válvulas y el sistema de control neumático colateral se construyen por lo general en capas diferentes por encima y por debajo del diafragma, respectivamente.

Las instrucciones del programa para aplicar presión y vacío a las válvulas y a las bombas requiere el diseño de la lógica de válvulas para hacer funcionar el dispositivo, por lo que cada dispositivo es de hecho una invención mecánica sobre sus propias cuatro patas. Un microprocesador fuera del dispositivo está programado con un conjunto de instrucciones para controlar el funcionamiento neumático de los dispositivos. El microprocesador, los solenoides asociados y las fuentes de presión neumática positivas y negativas están localizadas fuera del dispositivo en un instrumento analítico asociado en el que se introducen los dispositivos microfluídicos.

La figura 9 representa una proyección en planta y otra transversal de una válvula modificada de apertura y cierre que tiene un filtro higiénico en línea con el canal neumático que controla el diafragma de la válvula. En esta realización, si el diafragma falla, se evita la contaminación del distribuidor neumático con el contenido líquido del dispositivo. La figura 9B muestra un corte parcial, que incluye una trampa de líquido por debajo de la membrana hidrófoba. Estas membranas se utilizan en el procedimiento estéril porque se permite el flujo de gases, pero los líquidos acuosos quedan detenidos por el filtro. El tamaño de los poros de la membrana del filtro puede ser de 0,45 μm y se puede validar para procedimientos estériles.

La figura 10 ilustra una proyección transversal de un envase en láminas al vacío que contiene una bolsa de reactivo en la que se guardan los reactivos en el sistema analizador durante el transporte y antes de su uso. Los reactivos se cargan en el momento de la fabricación y se liberan con control neumático en la secuencia apropiada durante el ensayo. Una membrana deformable entre la bolsa del reactivo y el orificio de aire impide que el dispositivo se pueda contaminar con el material introducido en el suministro de aire. A medida que la presión del aire se acumula sobre la membrana deformable (figura 10A, B, C en secuencia), la presión hacia abajo sobre la bolsa del reactivo fuerza a que una lengua de la bolsa de reactivo atraviese un orificio que se ha calzado por debajo de la bolsa. La bolsa se pega a la cuña mediante un adhesivo excepto donde se proyectará por el orificio. En el orificio hay una hoja afilada o en ángulo, por lo que la presión del aire deforma la bolsa, poniéndola en contacto con el borde afilado, lo que rompe así la bolsa y libera los reactivos que contiene.

Con el diseño de estos dispositivos se proporcionan dobles capas de protección, por lo que el residuo contaminado no abandonará el dispositivo. Tal y como se ilustra en la figura 11, el residuo líquido que entra en el receptáculo de aislamiento de residuos se encuentra primero una almohadilla fibrosa muy absorbente. A medida que la almohadilla se hincha, desplaza el diafragma elastomérico o la película deformable que lo aísla de la válvula de purga con el exterior. En el caso de que falle la película deformable, el filtro hidrófobo montado en la vía de la válvula de purga detendrá la fuga del líquido.

Las almohadillas están hechas de materiales similares a los encontrados en los artículos absorbentes, tales como los pañales desechables. El núcleo absorbente incluye típicamente una red fibrosa que puede ser una red no tejida con aire hecha de fibras sintéticas o naturales, o combinaciones de las mismas. Las redes fibrosas utilizadas en tales artículos absorbentes también incluyen a menudo determinados materiales gelificantes absorbentes que se suelen denominar «hidrógenos» materiales «superabsorbentes» o «hidrocoloides» que almacenan una gran cantidad de líquido corporal descargado. Estos materiales absorben mediante fuerzas capilares u osmóticas, o una combinación de ambas (véanse las patentes de los EE.UU. n.º 4 610 678 y 5 906 602).

El pañal o almohadilla muy absorbente de material fibroso se trata opcionalmente con un desecante. Las almohadillas de fibra son típicamente celulósicas. Los desecantes incluyen sulfato de calcio, yeso, cloruro de calcio y gel de sílice.

A medida que los reactivos líquidos se introducen en el canal del ensayo microfluídico, todo el aire desplazado sale del dispositivo a través de una válvula de purga higiénica que contiene un filtro hidrófobo y permeable a los gases, pero no a los líquidos, lo que protege al operario de la exposición a productos peligrosos para los humanos.

Las sales de guanidinio, el alcohol y los detergentes actúan en la cámara de residuos como desinfectantes. Un desinfectante puede utilizarse en combinación con lo anterior. Cuando se diseña convenientemente, el dispositivo se puede desechar después de su uso sin ninguna precaución especial.

La arquitectura del dispositivo microfluídico de la figura 27 se ha construido de tal modo que una vez que se ha colocado una muestra en el dispositivo, se evita que el operario quede expuesto a su contenido. El diseño garantiza que el dispositivo es desechable y tiene una sola entrada para las pruebas medioambientales o médicas. Los mecanismos opcionales de cierre y sellado que cubren el orificio de la muestra se enjuagan con el tapón de lisis después de la inserción de la muestra y el cierre, para manejarlo con seguridad.

La figura 12A muestra un esquema de una cámara de fuelle con un canal para el accionamiento neumático controlado por válvulas. La cámara de fuelle se suministra con una membrana elastomérica y, sometida a presión de

succión, introducirá líquido por el canal de entrada de líquidos. La figura 12B muestra dos proyecciones transversales de una cámara de fuelle en funcionamiento. En la proyección superior se ha tirado del diafragma elastomérico con vacío hacia el orificio de aire, atrayendo líquido al dispositivo. Con el movimiento descendente, cuando se presuriza el diafragma, se fuerza a que el líquido salga del cuerpo de la cámara. Las cámaras de fuelle también pueden utilizarse como bombas y suministrar una presión hidrostática de carga de succión y positiva. Cuando se utiliza en combinación con válvulas de retención, se produce el flujo de bombeo unidireccional.

Hemos encontrado que estas cámaras de fuelle se pueden utilizar como cámaras de reacción, como en la PCR. El termociclado puede conseguirse mediante parejas de cámaras de fuelle interconectadas por fluidica y con control independiente de la temperatura, por lo que el líquido va y vuelve de cámara a cámara a medida que los diafragmas se alternan en configuraciones presurizadas y de vacío. Este flujo recíproco puede utilizarse también como un dispositivo de mezcla, como ha sido el caso en las reacciones de ELISA en los dispositivos microfluidicos.

Al formar la base de la cámara de fuelle fuera de las delgadas películas laminadas con coeficientes de conductividad térmica alta, hemos encontrado que constituyen unos excelentes intercambiadores de calor y permiten el termociclado rápido en un envase compacto. En una realización preferente, la parte inferior del dispositivo está separado de la fuente de calor por una película de plástico que tiene una conductividad térmica de más de 1 W/m-°K.

La figura 13 es una proyección en planta de una pareja de cámaras de fuelle configuradas como un conjunto de componentes de fluidica y de interfase térmica para PCR de la invención. Se utilizan dos interfases de temperaturas fijas, una en cada cámara de fuelle, para formar un componente de fluidica e interfase térmica para PCR. Sólo se requiere una única válvula. El líquido se mueve de una cámara a la otra con el control de los impulsores neumáticos de la izquierda y de la derecha. El líquido que entra en la primera cámara se encuentra con condiciones de temperatura desnaturalizantes. Al pasar a la segunda cámara de fuelle, se reduce la temperatura por lo que tendrá lugar la hibridación de los cebadores. La extensión se produce al añadir la polimerasa y continúa hasta que las hebras se separan de nuevo con condiciones de desnaturalización o de «fusión». Se repite el ciclo mediante la compresión y la rarefacción alternantes sobre los dos diafragmas, lo que produce un flujo recíproco cíclico entre las cámaras. Después del número requerido de ciclos, el material amplificado se expele de las cámaras hasta la estación de detección.

El funcionamiento de las dos cámaras de fuelle como un recipiente de reacción para PCR se explica con referencia a las proyecciones transversales de la figura 14. El proceso tiene cuatro etapas, ilustradas como las figuras A, B, C y D, y tres elementos microfluidicos, numerados 1, 2 y 3. El elemento microfluidico 1 es una válvula, Los elementos 2 y 3 son cámaras de fuelle. La cámara de fuelle 3 no tiene salida. Todos los elementos están interconectados por fluidica.

En la etapa A, la válvula 1 y el fuelle 2 están con presión negativa, por lo que la válvula se abre y el líquido entra en la primera cámara de fuelle. Obsérvese que el diafragma elastomérico separa el líquido y el distribuidor neumático. Esto corresponde a la primera etapa de la PCR, en la que la muestra se mezcla con parejas de cebadores y se desnaturaliza. En la etapa B se cierra la válvula, con lo que se sella el sistema. La cámara de fuelle 2 se vacía con presión positiva y la cámara de fuelle 3 se llena por la presión negativa. Esto corresponde a la hibridación y la extensión. En la etapa C, los productos de la primera ronda regresan a la cámara de fuelle 2, donde se las hebras se separan de nuevo. Las etapas B y C se repiten el número de ciclos necesarios. Luego se expele el líquido desde las cámaras al abrirse la válvula 1 y presurizar las cámaras de fuelle 2 y 3. El calentamiento da lugar a una mezcla por convección.

La figura 15 describe una variante de lo anterior. La muestra entra por la izquierda. Aquí, el flujo de líquido neto es de izquierda a derecha. El producto sale a la estación de detección de la derecha. Se utilizan dos válvulas. Como antes, las dos cámaras de fuelle funcionan como la fluidica y la interfase térmica para la PCR.

El proceso tiene cinco etapas, ilustradas como las figuras A, B, C, D y E, y cuatro elementos microfluidicos, numerados 1, 2, 3 y 4. Los elementos microfluidicos 1 y 4 son válvulas. Los elementos 2 y 3 son cámaras de fuelle. La cámara de fuelle 2 tiene una temperatura fija que corresponde a la temperatura de fusión del ácido nucleico; la cámara de fuelle 3 tiene una temperatura fija que corresponde a la temperatura requerida en la PCR para la hibridación y la extensión. Todos los elementos están interconectados por fluidica mediante microcanales. El volumen total de la fluidica para PCR es de aproximadamente 50 µl.

En la etapa A, la válvula 1 y los fuelles 2 están con presión negativa, por lo que la válvula se abre y el líquido pasa a la primera cámara de fuelle. Obsérvese que los diafragmas elastoméricos separan el líquido y el distribuidor neumático. Esto corresponde a la primera etapa de la PCR, en donde la muestra se mezcla con las parejas de cebadores y se desnaturaliza. En la etapa B se cierra la válvula, con lo que se sella el sistema. La cámara de fuelle 2 se vacía con presión positiva y la cámara de fuelle 3 se llena con presión negativa. Esto corresponde a la hibridación y a la extensión. En la etapa C, los productos de la primera ronda regresan a la cámara de fuelle 2, en donde se produce de nuevo la separación de las hebras. Las etapas B y C se repiten el número necesario de ciclos. En la etapa D, el líquido se transporta a la cámara de fuelle 3. Entonces, el líquido se expulsa de la fluidica para PCR al abrir la válvula 1 y presurizar las cámaras de fuelle 2 y 3. Al abandonar la válvula 4, la mezcla de reacción se puede

mezclar con perlas magnéticas tal y como se describe en las figuras 3 y 4.

La figura 17 muestra una realización de tres cámaras con fuelle, que tiene tres estaciones a temperatura fija que corresponden a la temperatura de fusión, a la temperatura de extensión y a la temperatura de hibridación. Una temperatura preferente para la extensión es ligeramente más alta que para la hibridación y se puede mantener en un recipiente de reacción diferente. Como en la figura 15, la mezcla de reacción no sale de la fluidica para PCR atravesando el lado caliente, sino que, en su lugar, sale de la cámara de hibridación o recipiente de la derecha.

La figura 18 muestra una realización de cámara de fuelle triple, que tiene tres estaciones de temperatura fija. Esta configuración no requiere válvulas entre las cámaras de fuelle porque el flujo direccional del líquido a cualquier cámara seleccionada puede controlarse mediante la aplicación de la combinación correcta de presión positiva y negativa a los diafragmas de fuelle. El ciclo de PCR comienza con la entrada del líquido problema desde la extracción (fondo) directamente al recipiente a la temperatura de fusión en la parte superior de la figura. Después de la desnaturalización de las hebras y de la disolución de las parejas de cebadores y reactivos desecados en el microcanal de interconexión, la mezcla de reacción se dirige entonces a la cámara de hibridación. Después de alcanzar la temperatura de hibridación, como se puede medir con detectores de temperatura resistivos, termoparejas o mediante termometría con láser, todos en el sistema analizador, la mezcla de reacción se transfiere después a la cámara o recipiente a la temperatura de extensión durante un periodo de tiempo eficaz, y se repite el ciclo. La duración del ciclo es generalmente de menos de un minuto. Como todas las cámaras están interconectadas, el flujo desde la fusión a la hibridación, de la hibridación a la extensión y de la extensión a la fusión se produce sin el paso por un régimen de temperatura inadecuado. Al concluir el número de ciclos requeridos, se enfría la mezcla de reacción y el producto bicatenario se forma en la cámara de hibridación antes de que se expulse al detector a través de un microcanal con válvula (izquierda abajo). Todos estos procesos están controlados por orificios de aire asociados a los diafragmas de fuelle y de las válvulas.

La realización de la figura 18 se presta al protocolo de «comienzo en caliente» para la amplificación por PCR. El ADN diana entra en el subcircuito de amplificación desde el subcircuito de extracción. En la fluidica para PCR de la figura 16, la muestra primero se encuentra con una mezcla de cebadores desecada, con una sal de magnesio y con suficientes trifosfatos de nucleótidos para la amplificación. Opcionalmente, estos reactivos se pueden secar en su sitio al depositar manualmente una gota o mediante un dispositivo de impresión automático, y pueden incluir una matriz tal como seroalbúmina bovina, trehalosa o PEG 30,00, por ejemplo, para mejorar el humedecimiento, la pasivación y la rehidratación.

La mezcla de la diana con los cebadores se envía inmediatamente a la cámara de desnaturalización controlada por la lógica de válvulas. Aquí, el ADN diana se disocia en una plantilla monocatenaria libre, por lo que cuando la mezcla de reacción se transporta a la temperatura de hibridación, se forman los híbridos entre el cebador y la diana con la complementariedad adecuada. Luego, la mezcla entra en la cámara para la extensión de los cebadores, donde se ha depositado la polimerasa en forma deshidratada. Cuando la polimerasa se rehidrata, comienza la extensión de los cebadores. Este es el método de «comienzo en caliente», que otros autores han sugerido previamente que mejora el rendimiento y la especificidad del producto (D'Aquila et al, 1991. *Nucleic Acids Res* 19: 37-49; Chou et al, 1992, *Nucleic Acids Res* 20: 1717-1723; Kellogg et al, 1994. *Biotechniques* 16: 1134-1137).

Otras configuraciones de fluidica para PCR incluyen un microcanal circular que se extiende a lo largo de dos bloques de temperatura para que el líquido se termocicle a medida que fluye por una vía circular. También se contemplan diseños isotérmicos para los protocolos de amplificación isotérmica.

La figura 19 ilustra un mezclador microfluídico. La mezcla turbulenta en los canales microfluídicos es escasa. La mezcla en los regímenes del flujo microfluídico se puede llevar a cabo al reducir la altura de un microcanal a una dimensión que se acerque a la longitud de la vía de difusión de las moléculas de interés. Para los solutos típicos, esta dimensión se encuentra en el margen de 25 μm (aproximadamente 1 mezcla). Por consiguiente, una etapa de reducción en un canal como la mostrada en la figura 19, por ejemplo, se puede utilizar para poner en contacto las corrientes del líquido en dimensiones en donde la mezcla por difusión es la adecuada.

La figura 20A ilustra los métodos para pasivar las superficies internas de contacto con el líquido en los dispositivos microfluídicos, por ejemplo, los microcanales. Los pasivadores activos adecuados de la superficie incluyen, por ejemplo, seroalbúmina, poloxámeros, polivinilpirrolidona, tensioactivos PEGilados, Tween-80, Triton X-100 y mezclas de los mismos. En algunos casos se utilizan como hidrófobos los revestimientos de silano. Los materiales hidrófobos también pueden aplicarse a las juntas microfluídicas para impedir el paso de las soluciones acuosas, por ejemplo en un «conector en T» para dirigir el líquido hacia abajo por un brazo de la T y no por el otro.

La figura 20B ilustra el proceso de depositar perlas magnéticas en una matriz adecuada para la reconstitución dentro de una cámara o reservorio antes del montaje final del dispositivo microfluídico. La rehidratación de las perlas se lleva a cabo generalmente con un tampón de rehidratación.

La figura 20C ilustra el depósito de una «mezcla de PCR» en una cámara de amplificación como parte del conjunto de componentes de la fluidica para PCR o en proximidad a ella. La mezcla desecada contiene típicamente cebadores, magnesio, dNTP y polimerasa, opcionalmente con agentes tensioactivos. El tampón de elución se puede

utilizar para rehidratar la mezcla de PCR. La mezcla forzada del líquido por convención con calor en la fluidica para PCR ayuda a la reconstitución de la mezcla de PCR deshidratada. De igual forma, la retrotranscriptasa y los cofactores asociados se pueden depositar como reactivos secos en una cámara secundaria. Otras enzimas o reactivos también pueden encontrar utilidad de este modo.

5 La figura 21 muestra un modelo tridimensional de una cámara o estación de detección 2100 en forma de un canal microfluídico ampliado, cuyo fondo se ha enmascarado y tratado para formar bloques 2102 de anticuerpo inmovilizado 2103. El techo de la cámara forma una ventana óptica 2104. Las perlas magnéticas que entran en el canal de detección por una corriente de líquido en 2101 están sujetas a una fuerza magnética que acerca las perlas al anticuerpo y las mueve por el canal. Se pueden realizar los primeros lavados manteniendo las perlas contra el
10 techo o el suelo de la cámara, mientras que se enjuaga con el tampón. Después de que inmovilizar las perlas sobre los bloques de análisis, se pueden realizar los lavados que sean necesarios para limpiar la cámara de las perlas libres y ayudar a ver con claridad la valoración a punto final. Las perlas libres y los materiales de reacción se pueden mover magnéticamente hacia el residuo, o enjuagarlas hacia el residuo.

15 En la figura 22 mostramos las geometrías de los bloques de análisis. Los bloques de análisis son una característica de la etapa de detección del método descrito en la presente memoria. Los bloques de análisis 2201 y 2202 constituyen, por ejemplo, un campo de detección negativo y positivo para un ensayo. La matriz de bloques de análisis 2203 es una matriz con tiras o estrías lineales no muy distinto a lo mostrado en la figura 21. La matriz de bloques de análisis 2204 es una matriz rectangular de cuadrados analíticos individuales, cada uno tratado con un único agente de captura. El bloque de análisis 2205 es circular y se adapta a la impresión con chorro de tinta. El
20 bloque de análisis 2206 se trata con un gradiente de un agente de captura de modo que muestre un valor semicuantitativo fácilmente interpretable como criterio de valoración.

Los bloques de análisis tienen en común un campo definido por un borde dentro del cual se inmoviliza un agente de captura bioactivo. Aunque no es una lista exhaustiva, el agente de captura puede ser una proteína tal como un anticuerpo, un antianticuerpo y un anticuerpo contra hapteno peptídico, proteína A, proteína G o antígeno, o una no
25 proteína tal como un aptámero, un antígeno glucídico, un mucopolisacárido o un oligómero. Los agentes de captura también pueden incluir antígenos víricos y antígenos microbianos desnaturalizados en general, y componentes celulares o células enteras en general.

Obsérvese que los bloques de análisis no son necesariamente sustratos impermeables y pueden tener un carácter poroso o fibroso. El camino del analito líquido en el campo magnético puede tener que atravesar la superficie del
30 bloque de análisis, de lado a lado o de delante hacia atrás. La arquitectura del bloque de análisis, a nivel molecular, es esencialmente tridimensional, aunque se puede representar como un plano bidimensional.

Los sustratos sólidos para los bloques de análisis incluyen olefina y otros materiales termoplásticos tales como poliestireno, policarbonato, polipropileno, tereftalato de polietileno, sulfona de poliéter, cloruro de polivinilo, acetato de polivinilo, copolímeros de acetato de vinilo y de cloruro de vinilo, y poliamidas y también materiales inorgánicos
35 tales como vidrio. Algunos soportes fibrosos o porosos tales como nitrocelulosa, nilón, hidrogel y polietileno, se pueden aplicar también como bloques de análisis, y se pueden tratar previamente con el agente de captura para facilitar el montaje. Para mejorar la fijación de los agentes de captura a veces se emplean proteínas entrecruzadas. El secado también favorece la fijación irreversible del agente de captura. Otros agentes de captura pueden requerir protocolos modificados como los que se conocen en la técnica.

40 Un método preferente para el tratamiento previo del plástico antes de absorber el agente de captura es el tratamiento con gas caliente ionizado a presión baja. La exposición de la superficie al oxígeno o nitrógeno puros produce una capa activada de sustrato hidroxilada o carboxilada, o una capa activada aminada o nitroxilada, respectivamente. También puede utilizarse el argón. En una realización descrita en la presente memoria se utiliza el plástico de poliestireno como sustrato para inmovilizar el agente de captura. El enmascaramiento, seguido del
45 tratamiento con gas caliente ionizado se utiliza para activar áreas destinadas a ser bloques de análisis. El agente de captura se aplica, se seca en su sitio, y se retira la máscara. Cuando el agente de captura es un anticuerpo, la aplicación a mano o con una impresora automática va seguida del secado y el bloqueo. Otros agentes de captura requieren protocolos modificados como los conocidos en la técnica.

Las técnicas para la activación de la superficie se revisan en Chan et al. (1996) *Surface Science Reports* 24: 1-54 y en Garbassi et al. (1998) *Polymer Surfaces-From Physics to Technology* (John Wiley págs. 238-241) y en la patente de los Estados Unidos 6 955 738, que describe la hidrofiliación y la funcionalización de las superficies poliméricas.

El uso de varios bloques de captura en la cámara de detección permite multiplexar los resultados, a saber, la detección múltiplex en una cámara de detección múltiplex. En una realización preferente descrita en la presente memoria, la presentación visual será cómoda para el usuario, pero también se contemplan los instrumentos para la
55 detección de los resultados positivos en matrices más pequeñas de lo que puede discriminarse a simple vista. La detección instrumental de las detecciones no visuales también están dentro del alcance descrito en la presente memoria.

Se comprende que los dispositivos microfluídicos pueden incluir opcionalmente RFID, microchips o marcadores con

código de barras como ayuda para procesar los datos analíticos.

Las variantes de las realizaciones descritas más arriba se ilustran a continuación.

5 La figura 23 describe un conjunto de componentes de amplificación dúplex opcional que tiene dos cámaras con temperatura fija interconectadas, una cámara de hibridación (50 °C) a la izquierda y una cámara de desnaturalización (96 °C) a la derecha. Cada una es una cámara de fuelle automática en serie, como en la figura 15. Los diafragmas elastoméricos flexibles de poliuretano se utilizan para empujar el líquido hacia atrás y hacia delante con vacío y presión. Al aplicar el vacío a una cámara mientras que se presuriza la otra cámara, se puede conseguir la transferencia casi cuantitativa de líquido de una cámara a otra. La mezcla se consigue en el microcanal de interconexión. Al controlar la temperatura en cada una de las cámaras en un punto fijo, se completa un ciclo de desnaturalización, hibridación y extensión cada vez que el líquido se desplaza de una cámara a la otra y viceversa.

10 La figura 24 representa un esquema que tiene dos conjuntos de componentes de fluidica y de interfase térmica para PCR en tándem para que se pueda realizar la PCR en serie. Los productos de PCR de la primera ronda de PCR en el conjunto de componentes 1 (izquierda) se transfieren a través de las válvulas de interconexión al conjunto de componentes 2 (derecha), donde se vuelve a realizar la PCR con reactivos y cebadores nuevos. Esto, por ejemplo, es útil para realizar la PCR asimétrica, o la PCR semianidada, en donde los productos de una primera pareja de cebadores luego es amplificado por una pareja de cebadores que consiste al menos en un cebador seleccionado entre la secuencia amplificada cercana al extremo 3' distal de los amplicones de la primera reacción.

Un amplicón con dos colas de la invención se obtiene después de dos rondas de PCR.

20 Sólo uno de los cebadores utilizados en la primera ronda de amplificación está etiquetado, pero el tercer cebador anidado utilizado en la segunda ronda de la PCR lleva la segunda etiqueta. Son posibles otras variantes.

25 Si acudimos ahora a la figura 25, vemos que el camino de la muestra se ramifica en una «T» después de la elución desde el conjunto de componentes para capturar la diana. Un «conjunto de componentes fluidoico de síntesis del ADNc» está intercalado en un brazo de la rama. En esta opción, los dos caminos paralelos proporcionan diferentes funciones analíticas. Una vía se utiliza para analizar el contenido de ADN de la muestra, que se puede tratar con ARNasa. La otra rama se dedica a un elemento microfluidico para la síntesis del ADNc a partir del ARN mediante cualquiera de los muchos métodos de la técnica anterior bien conocidos por los expertos en la técnica, pero que suelen implicar una de retrotranscriptasas. Es el ADNc que luego se analiza por PCR.

30 En la figura 26 se muestra un complejo de detección molecular 2600 que comprende un complejo indicador de ficoeritrina-avidina sujeto a un sustrato sólido 2602 mediante un anticuerpo 2603 y un amplicón con dos colas 2604. El primer cebador 2605 está conjugado a un hapteno peptídico 2606 complementario al anticuerpo inmovilizado 2603. El segundo cebador 2607 está conjugado a biotina 2608, y la biotina se utiliza para capturar el complejo indicador 2601 antes de la inmunocaptura sobre el sustrato sólido (y evitar así el efecto «gancho»).

35 Se debe ver en esta figura que se construyen con facilidad variantes del complejo de detección molecular único. El complejo indicador de ficoeritrina-avidina (2601) se eligió aquí porque se adquiere con facilidad y tiene una señal fluorescente fuerte. Pero se puede sustituir por otros muchos grupos o partículas indicadores.

Los elementos comunes son el amplicón con dos colas con hapteno peptídico en el primer cebador, el anticuerpo anti-hapteno peptídico complementario inmovilizado sobre una superficie de detección, tal como un bloque de análisis, y un grupo indicador de alguna clase fijado a un ligando complementario en el segundo cebador.

40 El uso de haptenos antiepítipo para la inmunocaptura tiene la ventaja del grado alto de especificidad de la fijación del anticuerpo y la variabilidad casi infinita de las etiquetas de hapteno peptídico que se pueden conjugar al primer cebador. Esto permite la construcción de colecciones de amplicones mediante la amplificación con parejas de cebadores conjugados y la posterior interrogación de esas colecciones en el bioensayo.

Los grupos indicadores incluyen fluoróforos, biotina, digoxinas, péptidos, extintores, proteínas, perlas, partículas, microesferas, microperlas magnéticas, proteínas, etc.

45 La figura 27 es un boceto conceptual de un dispositivo analítico con una sola entrada, autónomo, totalmente autosuficiente, para el cuidado de pacientes. En A, una torunda con la muestra se introduce en el orificio para la muestra. En B, C y D se ilustra el uso de una muesca para escisión en la torunda para describir cómo se puede aislar completamente la muestra. Después de separar el asa de la torunda, la tapa con bloqueo se desliza por las guías de la tapa para sellar el orificio de la muestra. Esta tapa se bloquea y no se puede volver a abrir sin forzarla con una herramienta afilada. A continuación se aprieta un botón para comenzar el ensayo. Se han concebido versiones manuales o automáticas. Al final del ensayo se muestra una detección en una ventana óptica. La detección implica la construcción molecular de la presente invención, pero no se limita a tal construcción.

55 Opcionalmente, una vez que la tapa con bloqueo está en su lugar, la parte inferior de la tapa se puede sumergir en desinfectante para que el dispositivo sea totalmente desechable sin tomar precauciones especiales. Contemplamos dispositivos de esta clase para el análisis de torundas nasales y rectales, y para otros especímenes biológicos.

La figura 28 es una clave de los símbolos gráficos utilizados en las figuras 1-4.

CONTROL DE LA TEMPERATURA

5 Se utilizó un solo bloque TEC con control de la rampa de temperatura al comienzo del desarrollo del ensayo. En esta realización se utilizan chips Peltier para controlar la transferencia de calor hasta y desde un sumidero de calor de tamaño adecuado controlado por un controlador PID. La respuesta rápida del canal o cámara de amplificación se construyó reduciendo la masa térmica y la barrera a la difusión térmica que presentaban el dispositivo microfluídico y el bloque de calentamiento asociado. Posteriormente se utilizaron bloques de temperatura fija duales en los protocolos de PCR. Debido a que los volúmenes que se necesitan para la amplificación son relativamente pequeños, la mezcla en las cámaras de amplificación se consigue mediante la convección térmica del líquido. No se necesita ningún elemento mezclador mecánico.

Otros aspectos se refieren a la preparación de las muestras y al diseño de los cebadores.

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

15 La extracción de los ácidos nucleicos de la muestra es decisiva para el desarrollo de los ensayos clínicos. Los especímenes difíciles incluyen heces y esputos. La sangre, ya que la hemoglobina interfiere con la actividad de las polimerasas utilizadas en la amplificación, también puede ser problemática.

20 No obstante, hemos tenido éxito con un medio muy rápido con a) filtro previo de las muestras clínicas para retirar las partículas macroscópicas, b) lisis de los patógenos diana en un caótopo tal como tiocianato de guanidinio, c) atrapamiento de los ácidos nucleicos y luego d) lavado en serie en un miembro de la trampa del ácido nucleico, e) elución directa en el conjunto de componentes de la fluidica para PCR para que se amplifique. Sorprendentemente se obtuvieron buenos resultados con este método rápido, lo que elude la extracción con cloroformo:fenol, el tratamiento con proteinasa K, la centrifugación y otros medios de la técnica previa más complejos y que requieren su tiempo, como se describe en la bibliografía.

25 Desde el subcircuito de amplificación, la mezcla de amplificación se transporta directamente al subcircuito de detección, donde los resultados se visualizan en 2 a 6 minutos, más preferentemente en unos 4 minutos. Al realizar esto, mediante la combinación de subcircuitos fluidicos para la extracción, amplificación y detección en un dispositivo microfluídico, hemos desarrollado una interfase ininterrumpida entre la preparación de la muestra, la amplificación y el resultado diagnóstico. Se reducen considerablemente la duración total del ensayo, el volumen de la muestra, el volumen de los reactivos, el trabajo y el gasto.

OPTIMIZACIÓN DE LA AMPLIFICACIÓN

30 La lisis de los microorganismos y de las partículas víricas en una muestra puede requerir la solubilización parcial de la nucleocápsida, de los lípidos y de los mucopolisacáridos en la muestra. Los tratamientos previos opcionales incluyen el uso de mercaptoetanol o de *N*-acetilcisteína para romper los enlaces disulfuro, el uso de «solventes universales» tales como *N,N*-dimetilformamida y *N*-metilpirrolidinona para deshacer las asociaciones entre ácido nucleico y proteínas, y entre ácido nucleico y lípidos, así como tratamientos previos de congelación y descongelación o mecánicos, tales como con un homogeneizador Dounce, sonicación o una prensa French para muestras de tejido. También se puede utilizar un triturador o sonicador de impacto con miniperlas para muestras que contienen cocos, bacilos o endoesporas grampositivos.

40 La lisis produce mezclas de ácidos nucleicos que generalmente consisten en cantidades significativas de ARN ribosómico y mensajero. Muchos virus de interés pueden ser virus de ARN, pero para una gran cantidad de bacterias, las dianas de interés son ADN plasmídico o genómico. Por consiguiente, el tratamiento del lisado con una ARNasa (para así retirar el ARNr y el ARNm que compiten por la fijación y elución) puede ayudar a aumentar al máximo la cantidad de ADN fijado al conjunto de componentes de captura de la diana de ácido nucleico.

También es posible amplificar las secuencias de intrones en vez de los marcos abiertos de lectura (exones) habituales y, haciéndolo, evitar así que el ARNm compita por la unión del cebador.

45 Como se describió antes, se ha sugerido que la PCR de comienzo en caliente mejora la sensibilidad y el rendimiento de la amplificación, y que reduce los dímeros de cebadores y la amplificación inespecífica. Esto es especialmente importante en las extensiones de la primera ronda, que pueden enriquecerse en esta etapa y dominar la amplificación posterior.

50 También se ha sugerido para los protocolos de amplificación múltiple una amplificación en dos etapas en la cual la primera ronda de amplificación con un conjunto de cebadores mezclados para un número de copias de amplicones de unos miles o menos va seguida de la amplificación de alícuotas de la mezcla de reacción en cámaras separadas con parejas de cebadores individuales. La detección se puede multiplexar mediante el método de la presente invención.

Otro medio de amplificación es realizar la amplificación asimétrica en la cual un cebador con hapteno peptídico se

utiliza para realizar un número alto de copias de la hebra de complementaria y entonces se añade el cebador haptenizado inverso y se repite la amplificación para completar la síntesis de la estructura bicatenaria de ambas secuencias diana. El resultado neto es el mismo, los amplicones dúplex están marcados en un extremo con un hapteno y en el otro extremo con biotina o similar. Como los cebadores no se ven unos a los otros a una concentración elevada, se forman muy pocos dímeros de cebadores. En una variante de la amplificación asimétrica se puede utilizar un tercer cebador que se selecciona entre una secuencia cadena arriba del segundo cebador, y es el tercer cebador, no el segundo cebador, el que se hapteniza con péptido. Esta variante semianidada de la PCR ayuda a reducir la formación de dímeros de cebadores etiquetados doblemente.

Los cebadores preferentes tienen de 10 a 30 bases de longitud; los cebadores más preferentes tienen de 17 a 28 bases de longitud. Los cebadores más cortos pueden dar lugar a una amplificación inespecífica. La distancia en la secuencia entre los cebadores inverso y directo debe ser del orden del 70 a 600 pb, más preferentemente de 100 a 300 pb. La composición de bases de los cebadores debe ser del 40 al 60% de G+C, más preferentemente del 50 al 60% de G+C, sin ninguna aglomeración de las purinas, en particular en el extremo 3'.

Aquí están contemplados los dispositivos, aparatos y métodos para la amplificación simplex y múltiple de dianas de ácido nucleico. La amplificación simplex, que se lleva a cabo con facilidad en conjuntos de componentes de fluidica y de interfase térmica para PCR en paralelo con el control de válvulas acopladas, es una realización preferente.

Tanto los dispositivos de detección simplex como los múltiple están contemplados aquí. La detección múltiple es una realización preferente. Los medios visuales de la detección múltiple son preferentes entre los medios descritos aquí, aunque también se contemplan los medios con máquinas, medios manuales y medios de detección automática.

DIANAS DE ENSAYO

Se contempla la detección diagnóstica de diferentes patógenos. Los patógenos de transmisión hemática incluyen *Salmonella typhosa*, *Salmonella paratyphi*, *Bacillus anthracis*, *Brucella abortus*, *Brucella suis*, *Brucella melitensis*, *Yersinia (Pasteurella) pestis*, *Pasteurella multocida*, *Francisella tularensis*, *Spirillum minus*, *Burkholderia mallei*, *Leptospirum icthohaemorrhagiae*, *Coxiella burnetii*, *Rickettsia typhi*, hantavirus, virus de la fiebre del dengue, virus de la fiebre amarilla (y otros virus del grupo *Flavivirus*), virus del Nilo oriental, virus de la encefalitis japonesa B, de la encefalitis de San Luis, de la encefalitis equina oriental, virus de la inmunodeficiencia humana 1 y 2, virus de la leucemia de los linfocitos T humanos 1 y 2, *Dirofilaria immitis* en los perros, *Plasmodium vivax*, *falciparum*, *malariae*, *ovale* y *berghei*, por nombrar unos cuantos. La detección cuantitativa de *P. falciparum*, la causa del paludismo con fiebre hemoglobinúrica, puede ser importante en la sangre.

Los patógenos de heridas y mordeduras incluyen *Staphylococcus aureus*, serotipos de *Streptococcus pyogenes* responsables de la fascitis necrosante, *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Yersinia pestis*, *Bacillus anthracis* y *Bacteroides fragilis*.

Los patógenos del sistema nervioso central y del LCR incluyen *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *syphilis*, *Haemophilus influenzae* serotipo B, *Acinetobacter spp*, *Escherichia coli*, *Enterobacter spp*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, encefalitis vírica tal como la encefalitis japonesa B, virus de la parotiditis, virus de la polio, virus del herpes (VHS-1, VHS-2), virus de la varicela zóster y virus de la rabia.

Los patógenos representativos de las vías urinarias están dominados por bacilos gramnegativos e incluyen *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* e infecciones ocasionales de *Pseudomonas*, por ejemplo.

Se contempla un panel de enfermedades transmitidas por vía sexual. Los patógenos de interés clínico incluyen *Neisseria gonorrhoea*, *Treponema pallidum*, herpes simple, *Chlamydia trachomatis*, virus del papiloma, *Candida albicans* y similares.

Los patógenos entéricos incluyen las enterobacteriáceas del género *Salmonella*, *Shigella* y algunos serovares de *E. coli*, entre otros. También son patógenos una amplia franja de parásitos y virus.

Determinados patógenos se pueden detectar individualmente o en paneles mediante los dispositivos de la invención. Se anticipan kits para la detección de determinados patógenos o afecciones patógenas.

La detección de cocos grampositivos, bacilos grampositivos, levaduras y endosporas puede requerir el tratamiento previo de las muestras en una trituradora de impacto con miniperlas, ultrasonidos, o con peptidoglucanasa o quitinasa antes del análisis. Se contempla el diagnóstico de la endocarditis bacteriana subaguda.

En otras realizaciones descritas en la presente memoria se contempla la detección de células cancerosas en la sangre y en los tejidos. Se anticipan los protocolos para adaptar la lisis de las células de los mamíferos a una tarjeta microfluidica de la presente invención. Las parejas de cebadores se pueden seleccionar entre secuencias de oncogenes. También se contempla el diagnóstico de las afecciones patógenas de los sistemas cardíaco, inmunitario

y vascular.

Los cartuchos están particularmente adaptados a paneles de ensayo que se ejecutan en paralelo. En una realización preferente descrita en la presente memoria, una cámara de detección múltiplex en el sistema analizador permite la presentación simultánea de varios resultados.

- 5 Es otro aspecto el uso de amplicones etiquetados con cebadores peptídicos en los ensayos de esta clase. Una serie de métodos están disponibles ahora para fabricar epítomos peptídicos específicos unidos a sondas o cebadores oligonucleotídicos (véase C. H. Tung y S. Stein, *Bioconjugate Chem* 2000, 11, 605-618; E. Vives y B. Lebleu, *Tetrahedron Lett.*, 1997, 38, 1183-1186; R. Eritja, A. Pons, M. Escarcellar, E. Giral y F. Albericio, *Tetrahedron Lett.*, 1991, 47, 4113-4120; J. P. Bongartz, A. M. Aubertin, P. G. Milhaud y B. Lebleu, *Nucleic. Acids Res.*, 1994, 22, 4681-4688; C. H. Tung, M. J. Rudolph y S. Stein, *Bioconjugate Chem.*, 1991, 2, 461-465; J. G. Harrison y S. Balasubramanian, *Nucleic. Acids Res.*, 1998, 26, 3136-3145; S. Soukchareun, J. Haralambidis y G. Tregear, *Bioconjugate Chem.*, 1998, 9, 466-475; K. Arar, A. M. Aubertin, A.C. Roche, M. Monsigny y M. Mayer, *Bioconjugate Chem.*, 1995, 6, 573-577; y, como ejemplo del uso de la técnica de ligación nativa, véase: D. A. Stetsenko y M. J. Gait, *J. Organic Chem.*, 2000, 65, 4900-4908). Véase también la patente de los EE.UU. n.º 20006/0263816.

Los cebadores con hapteno peptídico de este método se sintetizan mediante estas químicas. Describimos aquí que estos cebadores son compatibles con los métodos de PCR y con amplificaciones de ácidos nucleicos por biología molecular en general. Para el uso en los ensayos, el producto de amplificación con el amplicón que incorpora el cebador etiquetado con el péptido se captura primero mediante un agente de captura por afinidad específico de un ligando en el segundo cebador del conjunto de cebadores de amplificación y mediante lo cual se fija a una microperla magnética. A continuación, el complejo perla-amplicón se hace interaccionar con anticuerpos específicos contra el péptido en el bloque de análisis, y sólo los complejos de perlas con el complejo molecular de amplicón con hapteno peptídico son capturados por el bloque de análisis (véanse las figuras 5 y 26 para ilustrarlo). Este método permite cribar colecciones de amplicones peptídicos mediante ensayos de fijación heterogénea con la tecnología de perlas magnéticas. Debido a la enorme variabilidad inmunitaria posible con los oligómeros etiquetados con péptidos, creemos que los métodos para interrogar colecciones de este tipo proporcionan una herramienta que no se ha reconocido previamente para utilizar en los ensayos de biología molecular, con o sin perlas magnéticas.

Estas composiciones se pueden describir de forma general como un complejo de detección molecular para la detección de un patógeno o de una afección patógena, que comprende un amplicón con dos colas con un primer extremo y un segundo extremo, comprendiendo dicho primer extremo un primer cebador conjugado covalentemente con un hapteno peptídico, y dicho segundo extremo comprende un segundo cebador conjugado covalentemente con un ligando, comprendiendo dicho primer extremo además un grupo indicador revestido con un agente de unión a un ligando unido al ligando, y dicho segundo extremo además comprende un anticuerpo contra el hapteno peptídico unido al hapteno peptídico, estando además dicho complejo inmovilizado en un bloque de análisis, en donde el bloque de análisis y el ligando se definen con amplitud.

Se debe observar que las perlas de látex coloreadas con fluoróforos se pueden utilizar como un «bloque de análisis», en una especie de matriz líquida. Poniendo un código de barras a las perlas con fluoróforos y revistiendo uniformemente las poblaciones de perlas marcadas con anticuerpos específicos contra el hapteno peptídico, se pueden sintetizar colecciones de perlas para el análisis de poblaciones mixtas de amplicones con dos colas o de colecciones de amplicones con dos colas, y los complejos de fijación por afinidad resultantes con pares de perlas sujetas por los amplicones de dos colas pueden entonces clasificarse o ensayarse cuantitativamente con la fluorometría de excitación dual.

Los dispositivos y aparatos descritos en la presente memoria se prestan por lo general para el funcionamiento en los bioensayos para las dianas de ácido nucleico, y se pueden combinar como kits para la realización de los bioensayos mediante los métodos descritos en la presente memoria.

Un método de bioensayo múltiplex general de dianas de ácido nucleico tiene las etapas siguientes:

- 1) seleccionar un primer cebador que tiene una especificidad de hibridación por el extremo 5' de una primera secuencia de ácido nucleico diana, y sintetizar un primer cebador conjugado a un hapteno peptídico;
- 2) seleccionar un segundo cebador que tiene una especificidad de hibridación por el extremo 3' de la secuencia de ácido nucleico diana, y sintetizar un segundo cebador conjugado a ligando, formando dicho primer y segundo cebadores una pareja de cebadores;
- 3) repetir las etapas a) y b) para cada una de una gran cantidad de secuencias de ácido nucleico diana, y agrupar las parejas de cebadores;
- 4) sintetizar los productos de amplicones con dos colas en presencia del grupo de parejas de cebadores;
- 5) poner en contacto los productos de la mezcla de amplificación con perlas magnéticas revestidas del agente de unión al ligando para capturar cualquier amplicón con dos colas resultante que comprenda dichos

primeros cebadores conjugados al ligando;

- 5
- 6) poner en contacto los productos de la mezcla de amplificación con una gran cantidad de bloques de análisis, en donde cada bloque de análisis comprende un anticuerpo inmovilizado contra hapteno peptídico, y capturar los amplicones con dos colas en el bloque de análisis en forma de un complejo de detección molecular;
 - 7) puntuar el ensayo como positivo para una gran cantidad de patógenos o afecciones patógenas mediante la detección de uno o más complejos de detección molecular.

10 Los métodos para la detección del ácido nucleico como se describe en la presente memoria pueden implicar la amplificación mediante varios métodos. Éstos incluyen la amplificación simple, la amplificación múltiple, la amplificación anidada, la amplificación en serie y la amplificación con «comienzo en caliente».

Ejemplos

EJEMPLO 1

A) Preparación de conjuntos de cebadores:

15 Se prepararon primero los cebadores inversos y se purificaron por HPLC. Los péptidos se modificaron con hidrazina en el extremo N antes de su utilización. Los oligonucleótidos se trataron con 4-formilbenzoato de succinimidilo en formamida y luego se hicieron reaccionar con los péptidos modificados con hidrazina para formar cebadores etiquetados con hapteno.

Se utilizaron los siguientes cebadores etiquetados con hapteno peptídico.

Oligómeros con peptidilo en 5'

Cebador	Secuencia del cebador*	Secuencia del péptido**
A	CGCCAGTACGATATTCAG	(HNA) EQKLISEEDL (NH ₂)
B	ACCTGGACATCACGGCTTTCAAC	(HNA) YPYDVPDYA (NH ₂)
C	CCTATTGCAGAGCGAATGAC	(HNA) YTDIEMNRLGK (NH ₂)
D	TGAACTCCATTAACGCCAGA	(DNA) CEEEEYMPME (NH ₂)
E	CGACCTGACCAAATGCCAG	(HNA) TDFYLK(NH ₂)
F	CCTATAACAGCACCCACTATACGG	(HNA) DTYRYI (NH ₂)
G	CTCTGCGAGCATGGTCTGG	(HNA) QPELAPEDPED (NH ₂)

20

Estos epítomos peptídicos se seleccionaron sobre la base de la disponibilidad de los anticuerpos complementarios. También se pueden utilizar químicas alternativas de conjugación de péptidos. Todos los cebadores directos se conjugaron con biotina.

B) Preparación de las microperlas paramagnéticas:

25 Se compraron perlas magnéticas revestidas con estreptavidina monodispersa (MyOne Streptavidin C1 Dynabeads) de Dynal, Carlsbad CA, y se lavaron y resuspendieron en PBS a 0,9X, SAB a 30 mg/ml y Triton X100 al 1% con 5% (v/v) de una solución de MgCl₂ a 80 mM, Triton X100 al 0,24%, SAB al 1%, en TRIS a 0,5 M, pH 8, antes de su uso.

C) Preparación de los bloques de análisis:

30 Se construyó un dispositivo microfluídico de laminados cortados con troquel que contenía varias cámaras de detección de la forma ilustrada en la figura 9. Se formó cada cámara de detección con un orificio de entrada y un orificio de salida conectados por fluidica a la cámara de detección mediante canales microfluídicos. Se construyeron suficientes cámaras de detección para el experimento.

35 Antes del montaje final, los bloques de análisis de la cámara de detección se enmascararon y se trataron con gas de oxígeno caliente ionizado. Los anticuerpos específicos contra el hapteno peptídico (Research Diagnostics, Flanders NJ) y la solución de control negativo se depositaron en los bloques de análisis, 1 µl por bloque, y se secaron en su sitio con vacío. Cada cámara de detección contenía un bloque de análisis que corresponde a cada conjunto de cebadores y un control negativo. El dispositivo completamente montado se trató con una solución de lavado/bloqueo que consistía en PBS a 0,9X, SAB a 30 mg/ml y Triton X100 al 1% para pasivar superficies de plástico sin tratar. La solución de bloqueo se retiró antes de su uso y se secaron las cámaras.

D) Protocolo de ensayo:

40

Con las muestras de ADN conocido de patógenos entéricos, la PCR se realizó con los conjuntos de cebadores preparados (véase más arriba) durante 35 ciclos. Para la amplificación se utilizaron los reactivos Platinum Quantitative RT-PCR ThermoScript One-Step System. El éxito de la amplificación se confirmó mediante electroforesis en gel de agarosa al 5%. Luego se resuspendieron 10 µl del amplicón con 5 µl de perlas (véase más arriba) en aproximadamente 20 µl de tampón que contenía MgCl₂ a 10 mM, SAB al 0,5%, Triton X100 al 0,1% y un tampón de TRIS a 5 mM, pH 8, y la mayor parte de esta solución se cargó en una cámara de detección. Cada amplicón producido correspondía a un solo conjunto de cebadores y se cargó en una cámara de detección diferente.

Primero se capturaron las perlas con un imán colocado en el fondo de la cámara de detección y se retiró el exceso de la solución. A continuación se utilizó el imán para esparcir la pasta de perlas sobre, a lo largo y a lo ancho, los bloques de análisis, y se dejó incubar la mezcla 1 min. Con el imán colocado en el fondo del pocillo, el pocillo se llenó poco a poco con la solución de bloqueo. El imán se desplazó a lo largo del flujo del tampón, creando un frente de perlas en la capa del fondo de la cámara de detección. El imán se cambió luego a la parte superior de la cámara de detección, lo que alejó las perlas sin unir de las áreas del bloque de análisis. El material sin unir se pudo resuspender en el flujo de tampón, se enjuagó, y se envió para residuo. Después, los bloques de análisis se enjuagaron con 1 volumen de tampón nuevo. Las «tiras» de color naranja brillante del bloque de análisis eran visibles inmediatamente y se determinó que reflejaban correctamente la especificidad de la fijación del amplicón etiquetado con hapteno al bloque de análisis que contenía el anticuerpo complementario. Dado que las cámaras de detección estaban alineadas en paralelo cuando se construyeron, resultaba evidente el patrón escalonado después de haber procesado todas las mezclas de perlas de amplicones porque cada amplicón etiquetado se había fijado solo a un bloque de análisis en cada cámara de detección.

Al dejarla transparente, los análisis positivos fueron inmediatamente visibles como bandas naranja brillante que correspondían a la localización de tiras de análisis particulares. Las tiras de análisis negativos y los controles negativos permanecieron transparentes e incoloros. Los resultados se podían descodificar fácilmente al emparejar la localización del bloque de análisis teñido con una clave de los anticuerpos depositados.

25 EJEMPLO 2

Se realizó la amplificación por PCR en un dispositivo microfluídico como sigue:

Se construyó un dispositivo microfluídico de laminados cortados con troquel. Antes del montaje final, las parejas de cebadores etiquetados con biotina y hapteno, dATP, dCTP, dGTP y dTTP, polimerasa Taq y una matriz que consiste en Triton X100, SAB, PEG y trehalosa más cloruro de magnesio se depositaron en el canal o cámara de amplificación y se secaron en su sitio con vacío. Las perlas magnéticas revestidas con estreptavidina (DynaL MyOne Streptavidin C1, Carlsbad CA) se depositaron y secaron en una cámara adjunta a los canales o cámaras de amplificación. Las superficies de los bloques de análisis en la cámara de detección se troquelaron (véase la figura 21 para la estrategia general) y se trataron con gas caliente ionizado, antes de que se aplicaran las soluciones de anticuerpos y se secaran en su sitio. Los puntos donde se depositó el anticuerpo se bloquearon con StabilCoat (SurModics, Eden Prairie MN). El dispositivo se trató entonces con un tampón de Triton X100:SAB para pasivar las superficies de plástico sin tratar.

También se prepararon los reactivos siguientes:

Tampón de lisis

Tiocianato de guanidinio a 4,5 M

40 Triton X100 al 5%

Sarcosina al 1%

MES a 50 mM, pH 5,5

EDTA a 20 mM

Reactivos de lavado

45 Etanol anhidro

Tampón de elución E11

Triton X100 al 1%

EDTA a 0,1 mM

TRIS a 20 mM, pH 8,0

50 50 U de ARNsina (Promega)

Tampón de rehidratación

Triton X100 al 1%

NaCl al 0,5%

Seroalbúmina bovina a 10 mg/ml

5 TRIS a 50 mM, pH 8,0

El tampón de lisis, el reactivo de lavado, el tampón de elución y el tampón de rehidratación se distribuyeron en alícuotas en envases en láminas al vacío sellados en las correspondientes cámaras del dispositivo. El dispositivo se montó totalmente entonces y se colocó en un controlador neumático con bloques calefactores por TEC a temperatura variable colocados bajo el conjunto de componentes de fluidica y de interfase térmica para PCR.

10 Las muestras de torundas clínicas de pacientes con diarrea que se sabe que contienen microorganismos patógenos se manipularon con guantes en una cabina de seguridad biológica. Cada torunda rectal se mezcló enérgicamente con 400 µl de TE para solubilizar el contenido. Con el uso de puntas de pipetas que llevan dentro un filtro se transfirieron a continuación unos 400 µl de homogeneizado al orificio de la muestra del dispositivo microfluídico y se cerró el orificio de la muestra. Las demás etapas se realizaron en un dispositivo con una única entrada, sin ninguna
15 exposición más del operario.

Las restantes etapas del ensayo estaban automatizadas.

Se utilizó una bomba de fuelle higiénica en el sistema analizador para empujar la muestra a través de un filtro previo que consiste en un elemento de filtro exhaustivo, hecho de polipropileno, por ejemplo, apoyado en rebordes de plástico cortados con láser. Luego se utilizó una válvula para cerrar el orificio de la muestra. A continuación, el
20 filtrado bruto se mezcló con el tampón de lisis y se hizo pasar a través de un filtro de fibra de vidrio para atrapar los ácidos nucleicos, y lo retenido por el filtro se enjuagó exhaustivamente con etanol. Todos los enjuagues se aislaron en un receptáculo de residuos del sistema analizador con una válvula de purga que lleva un filtro de membrana hidrófoba de 0,45 µm. Después, los ácidos nucleicos sobre la membrana de fibra de vidrio se eluyeron con el
25 tampón de elución y se transfirieron al canal de reacción que contenía cebadores, dNTP, polimerasa, magnesio, tampón y tensioactivos en forma deshidratada. La mezcla de reacción, en un volumen de unos 50 µl, se calentó entonces a 95 °C en el conjunto de componentes de fluidica y de interfase térmica para PCR durante unos 10 s para desnaturalizar las secuencias bicatenarias y la estructura secundaria en la muestra. El calentamiento y el enfriamiento los aportaron chips de Peltier externos montados en sumideros térmicos adecuados y PID controlado dentro de un margen de 1 °C desde el valor ajustado. Inmediatamente después, la temperatura volvió a llevarse a
30 unos 60 °C durante una primera ronda de hibridación y extensión, que se continuó durante unos 20 s. Se repitió el termociclado durante 40 ciclos a lo largo de 18 minutos.

Después de la extracción y de la amplificación, los amplicones producidos se transfirieron a una cámara de mezcla magnética para mezclar las perlas magnéticas marcadas con estreptavidina (Dyna, MyOne Streptavidin C1) que se habían rehidratado en el tampón de rehidratación. Esta mezcla se incubó con una mezcla suave y luego se transfirió
35 a una cámara MagnaFlow. Opcionalmente, la mezcla de la reacción se puede enjuagar para retirar el cebador conjugado con hapteno que no haya reaccionado, mientras que se mantienen las perlas magnéticas en su sitio. Mediante el uso de imanes permanentes montados en una plataforma X-Y, las perlas revestidas con el posible amplicón diana se pusieron en contacto con la matriz, o los bloques, de análisis con anticuerpo de captura en la cámara de detección, y las perlas sin unir se sacaron de los bloques de análisis con un campo magnético móvil y se
40 enviaron a los residuos. Los cebadores y los amplicones inespecíficos se enjuagaron de la cámara con un exceso del tampón de rehidratación, que de nuevo se desechó a los residuos del sistema analizador.

Al ponerse transparente, los análisis positivos eran fácilmente visibles como bandas naranja que correspondían a la localización de las tiras de análisis específicas. Las tiras de análisis negativos permanecían transparentes e
45 incoloras. El tiempo transcurrido tras la transferencia de la mezcla de amplificación a la detección fue de aproximadamente 4 min. Al conocer la identidad de cada anticuerpo inmovilizado, los resultados se pudieron descodificar con facilidad. En la mejor puesta en práctica hasta la fecha, el tiempo desde la amplificación hasta la presentación de los datos fue de menos de 4 minutos.

En un análisis de muestras clínicas de 47 heces, los patógenos de 46 se puntuaron correctamente en el escrutinio con el dispositivo MagnaFlow. Una muestra que antes se había identificado por cultivo que contenía *Salmonella*, se
50 identificó que también contenía *E. coli* O157H1 enterotoxigénica mediante MagnaFlow (a saber, doble infección). Para este ejemplo, las siguientes parejas de cebadores se obtuvieron mediante la síntesis de costumbre y se conjugaron químicamente mediante los métodos conocidos en la técnica.

Oligómeros con peptidilo en 5'

Cebador	Secuencia del cebador en 3' del gen	Hapteno conjugado
InvA	CAATGTAGAACGACCCCATAAACA	EQKLISEEDL'
Gyrase A	GCCATTCTAACCAAAGCATCATA	DTYRYI'
ipaH	ACTCCCGACACGCCATAGAA	QPELAPEDPED'
Eae	CTATCCAACAAGTTCAATTCATCC	TDFYLK'
Stx1A	AGACGTATGTAGATTCGCTGAA	YTDIEMNRLGK'
Stx2A	CTGGATGCATCTCTGGTCAT	CEEEEEYMPME'
MalB	GGCGAATACCCAGCGACAT	YPYDVPDYA'

Oligómeros biotinilados en 5'

Diana	Secuencia del cebador en 5' del gen	Conjugado del cebador
InvA	TATCTGGTTGATTCCTGATCGC	Biotina
Gyrase A	AAATGATGAGGCAAAAAGTAGAACA	Biotina
ipaH	GGACATTGCCCGGGATAAA	Biotina
Eae	TTACCCGACGCCTCAAAC	Biotina
Stx1A	AGACGTATGTAGATTCGCTGAA	Biotina
Stx2A	GGAATGCAAATCAGTCGTCA	Biotina
MalB	GCCGATGCCAAATCGTCAG	Biotina

- 5 Los cebadores directos para este ejemplo se conjugaron con biotina. Los cebadores inversos se conjugaron con haptenos peptídicos para los cuales había anticuerpos disponibles (Research Diagnostics, Flanders NJ). La unión covalente de los haptenos se encontraba en el extremo en 5' del oligómero. Los péptidos se activaron en el extremo amino para el acoplamiento.

EJEMPLO 3

- 10 En la figura 6 se muestra un resultado de un ensayo en el cual se extrajeron, se amplificaron y se detectaron las dianas del ejemplo 2.

EJEMPLO 4

- 15 Se diseñó un panel respiratorio que contenía parejas de cebadores etiquetados con hapteno y biotinilados. Los cebadores se sintetizaron y luego se depositan en canales o cámaras de amplificación independientes de un dispositivo. Se analizaron los lavados de las torundas de garganta siguiendo el procedimiento del ejemplo 2. Se utilizó una trituradora de impacto con miniperlas para preparar la muestra antes del análisis. Un resultado se muestra en la cámara de detección. El producto se envasa como un kit.

EJEMPLO 5

- 20 Se diseñó un panel para enfermedades de transmisión sexual que contiene las parejas de cebadores etiquetados con hapteno peptídico y biotinilados, y se sintetizan los cebadores. A continuación se depositan los cebadores en canales o cámaras de amplificación independientes de un dispositivo. Se analizaron los lavados de las torundas vaginales siguiendo el procedimiento del ejemplo 2. Se muestra un valor a punto final en la cámara de detección. El producto se envasa como un kit.

EJEMPLO 6

- 25 Se diseñó un panel de oncogenes que contiene parejas de cebadores etiquetados con hapteno peptídico y biotinilados, y se sintetizan los cebadores. A continuación se depositan los cebadores en un canal o cámara de amplificación común. Después de la amplificación por PCR, los productos de la amplificación se detectan en una estación de detección. El producto se empaqueta como un kit.

- 30 Aunque la descripción anterior contiene especificidades, estas especificidades no se deben considerar como limitaciones del alcance de la invención, sino más bien como ejemplos de las realizaciones de la invención. Es decir,

la descripción anterior de la invención sirve de ejemplo con el propósito de ilustración y explicación.

REIVINDICACIONES

1. Cartucho microfluídico integrado que comprende:
 - a. un medio para extraer ácidos nucleicos de una muestra biológica;
 - b. un medio para sintetizar amplicones;
 - 5 c. un medio para detectar amplicones; y,

una cámara de aislamiento de residuos,

en donde dicho medio para extraer ácidos nucleicos de una muestra biológica comprende un subcircuito fluídico para extraer ácidos nucleicos de una muestra biológica con fase sólida; dicho medio para sintetizar amplicones comprende un subcircuito fluídico para sintetizar amplicones sin un elemento de mezcla mecánica; y dicho medio para detectar amplicones comprende un subcircuito fluídico con una cámara de detección múltiplex y una ventana óptica en un miembro desechable único integrado, y los componentes fluídicos del miembro único integrado se controlan mediante una serie de elementos internos de control neumático que comprenden válvulas accionadas mediante diafragmas y cámaras de fuelle, en donde dicha serie de elementos internos de control neumático están provistos de un circuito de interconexión neumática para la conexión a un distribuidor controlable y externo de impulsión neumática.

2. Cartucho microfluídico de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho medio para sintetizar amplicones comprende además:

- a. Una primera cámara de fuelle interconectada por fluídica con una segunda cámara de fuelle;

- b. Una interfase térmica, por medio de la cual la primera y segunda cámaras de fuelle se mantienen a temperaturas fijas diferentes; y

comprendiendo además cada cámara de fuelle un diafragma para el bombeo recíproco del líquido entre la primera y la segunda cámaras de fuelle.

3. Cartucho microfluídico de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho medio para sintetizar amplicones comprende un conjunto de componentes fluídicos y de interfase térmica sellado en la parte inferior del dispositivo con una película de plástico que tiene una conductividad térmica de más de aproximadamente 1 W/m²·K.

4. Procedimiento para realizar la PCR en un cartucho microfluídico de acuerdo con la reivindicación 2, que comprende:

- a. Formar una mezcla de reacción que comprende una plantilla de ADN, cebadores, polimerasa, dNTP, tampón y una sal de magnesio en una primera cámara de fuelle interconectada por fluídica a una segunda cámara de fuelle, manteniéndose dicha primera cámara de fuelle a una temperatura fija a, o por encima de, la temperatura de desnaturalización del ADN bicatenario y manteniéndose dicha segunda cámara de fuelle a una temperatura fija a, o por debajo de, la temperatura de hibridación de la plantilla y los cebadores;

- b. Introducir una secuencia diana de ácido nucleico dentro de dicha primera cámara de fuelle;

- c. Aplicar presión neumática a un diafragma para que se efectúe la transferencia de la mezcla de reacción desde dicha primera cámara de fuelle a dicha segunda cámara de fuelle e incubar;

- d. Aplicar presión neumática a un diafragma para que se efectúe la transferencia de la mezcla de reacción desde dicha segunda cámara de fuelle a dicha primera cámara de fuelle;

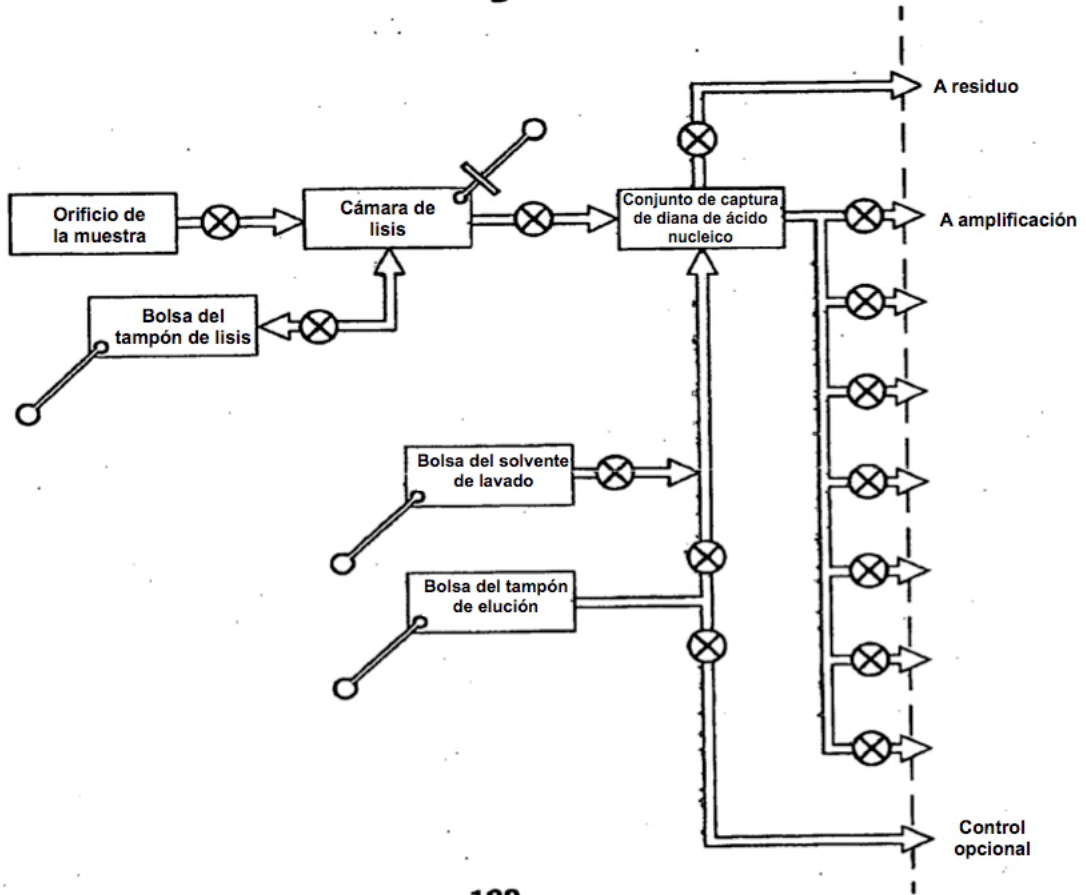
- e. Repetir las etapas b y c durante un determinado número de termociclos;

- f. Retirar los productos de amplificación.

5. Aparato para realizar una prueba biológica, que comprende un cartucho microfluídico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

6. Aparato de acuerdo con la reivindicación 5, que comprende adicionalmente un distribuidor de impulsión neumática fuera del cartucho con orificios de interconexión neumática y circuitería para conectarse a, y controlar, los numerosos elementos con válvulas y diafragmas de fuelle de dicho cartucho microfluídico, así como comprender adicionalmente un microprocesador con programación lógica de las válvulas configurado para controlar la impulsión neumática de los elementos de válvulas y de diafragmas.

Fig. 1



100

Fig. 2

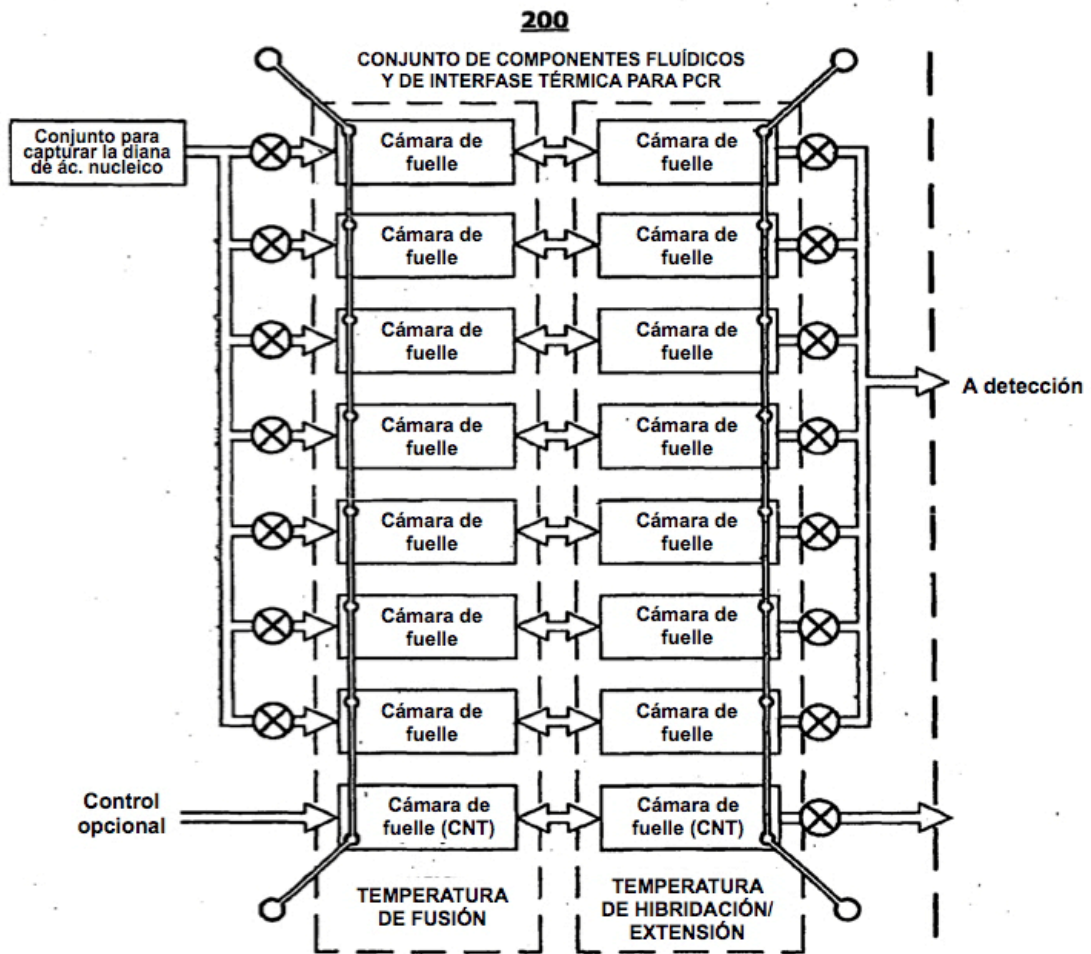


Fig. 3

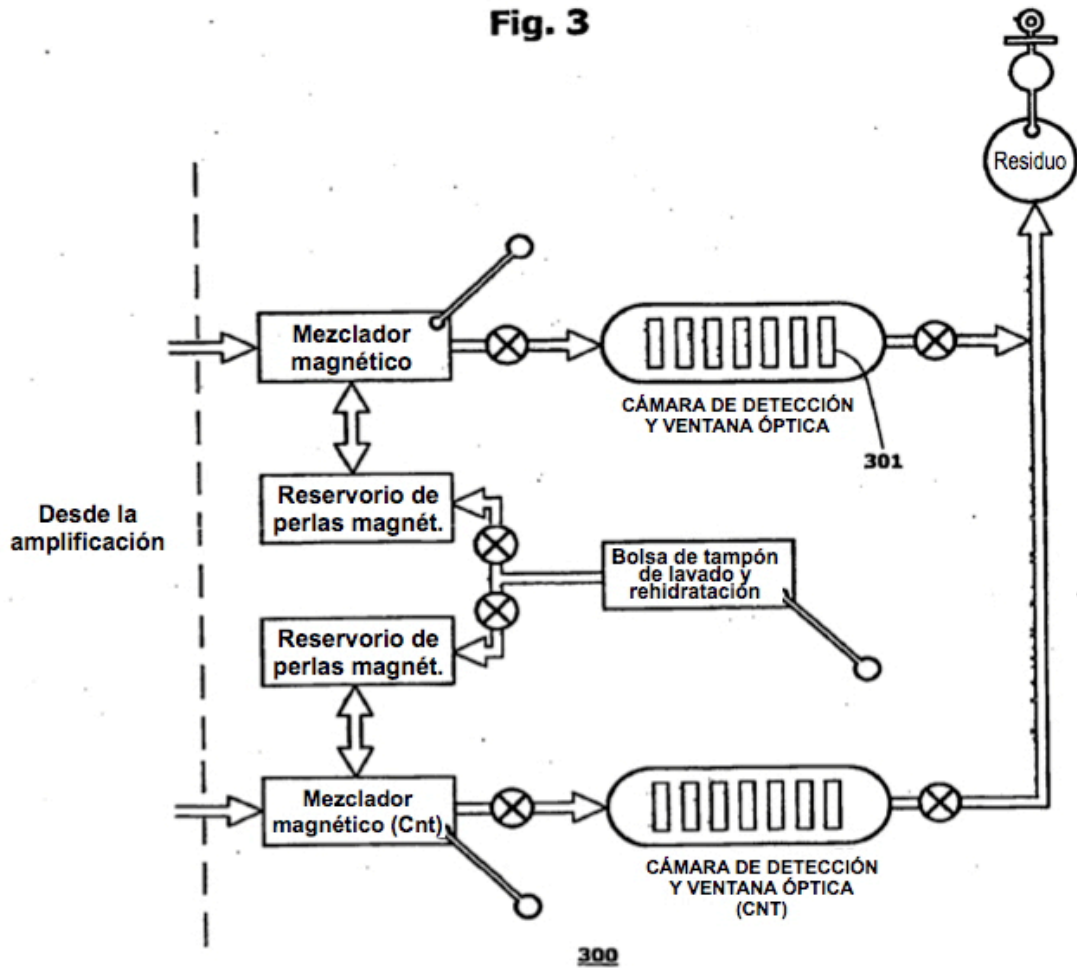
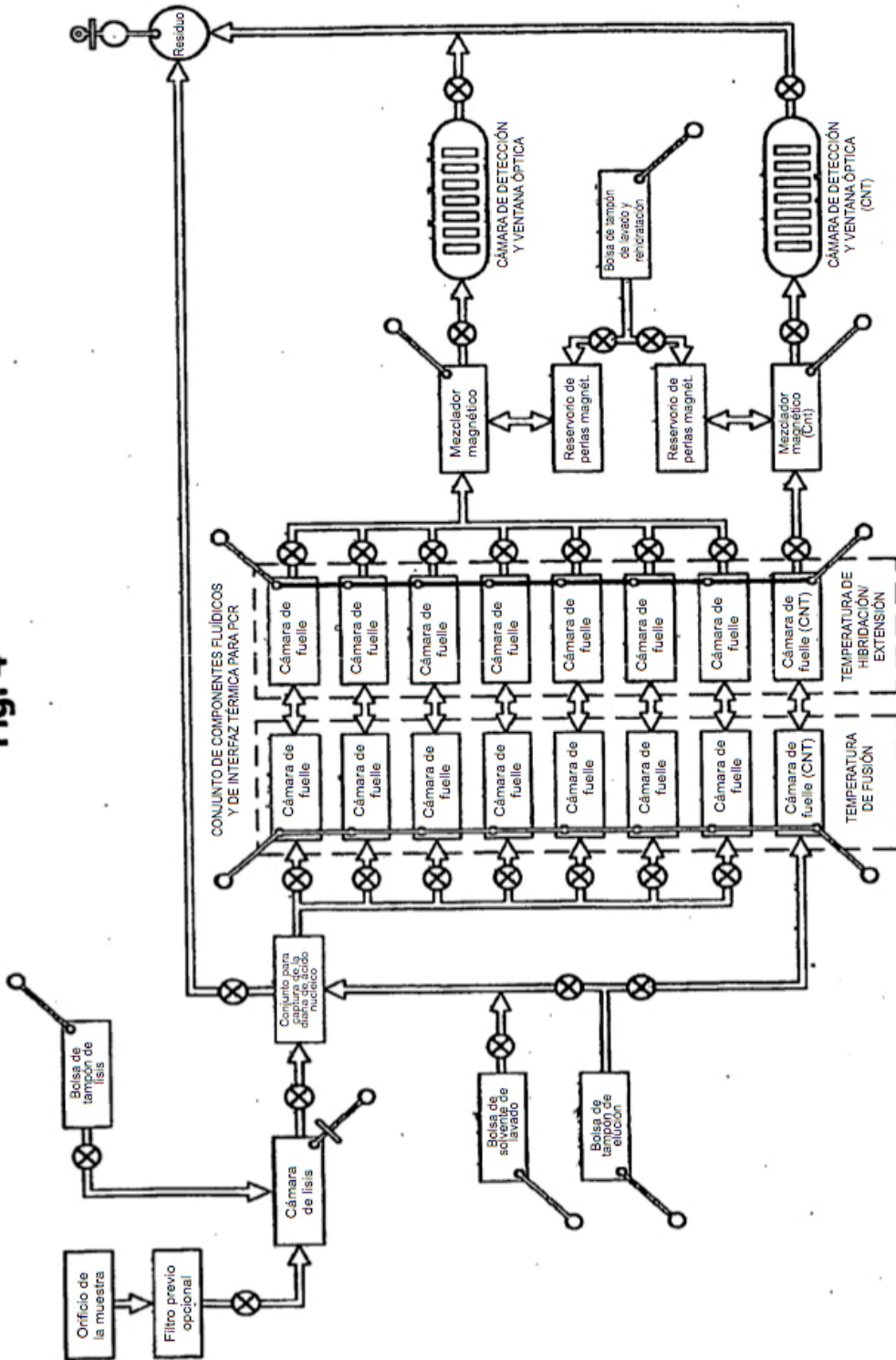


Fig. 4



400

Fig. 5

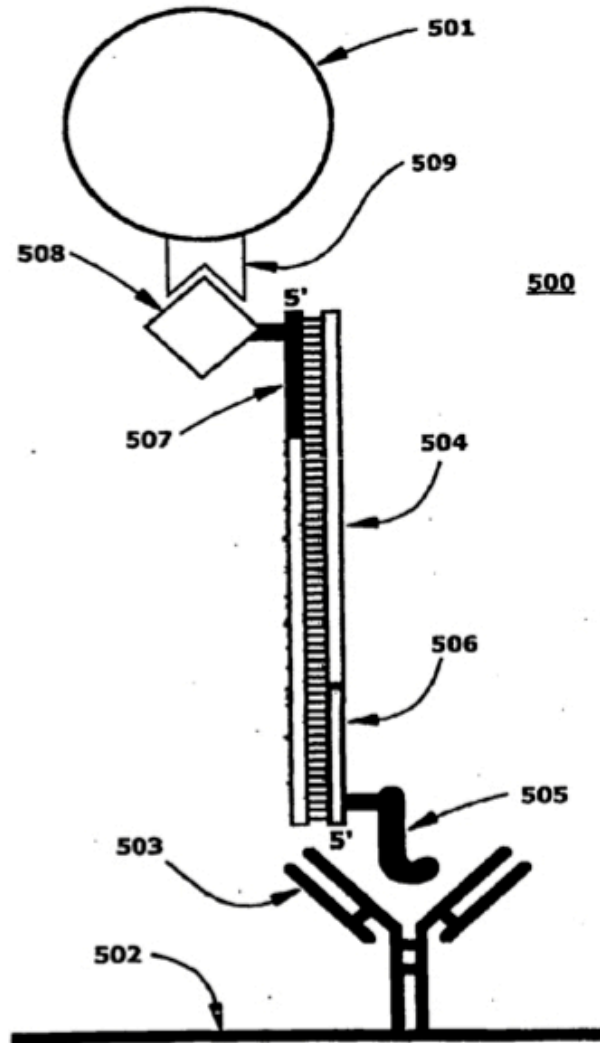


Fig. 6

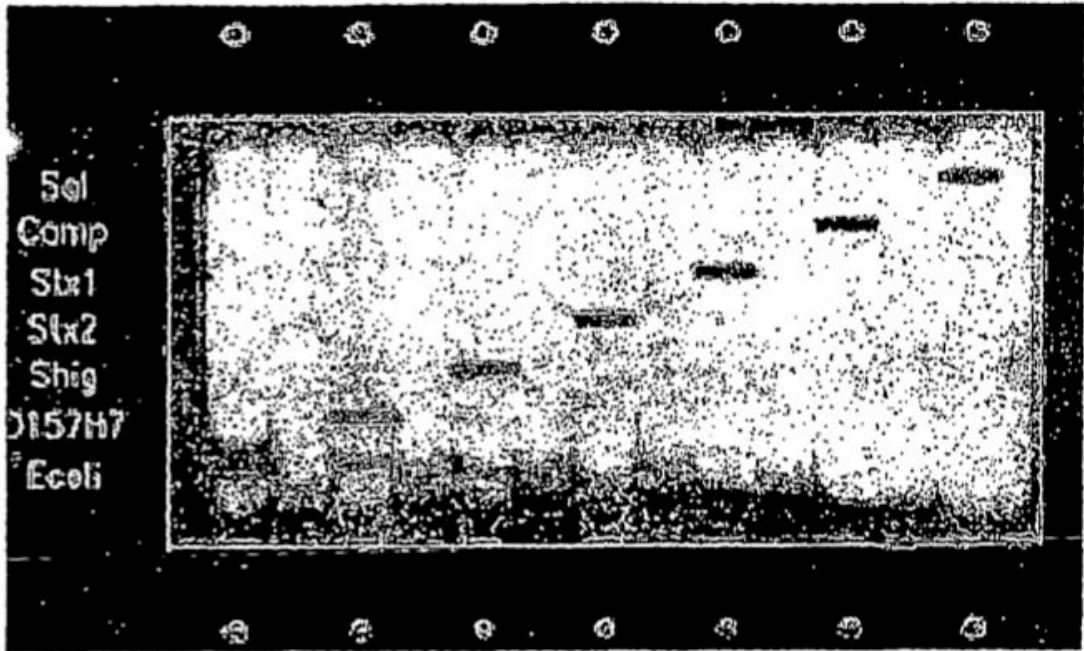


Fig. 7A

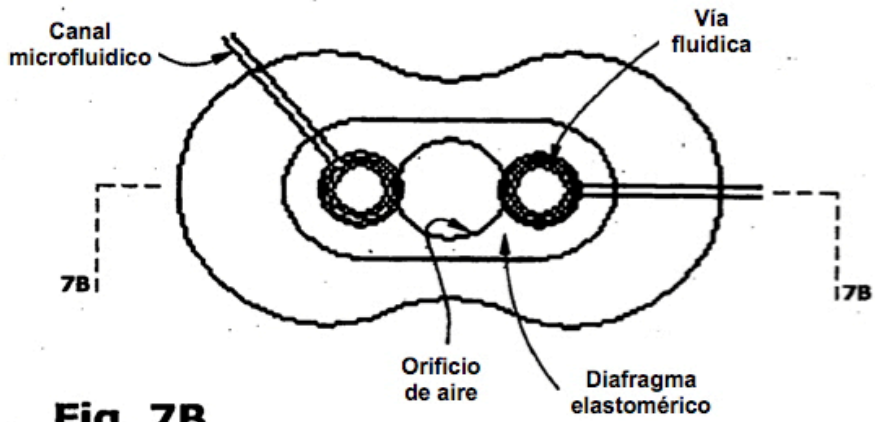


Fig. 7B

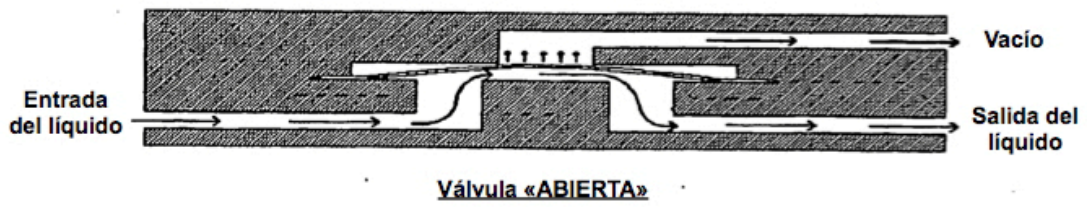


Fig. 7C

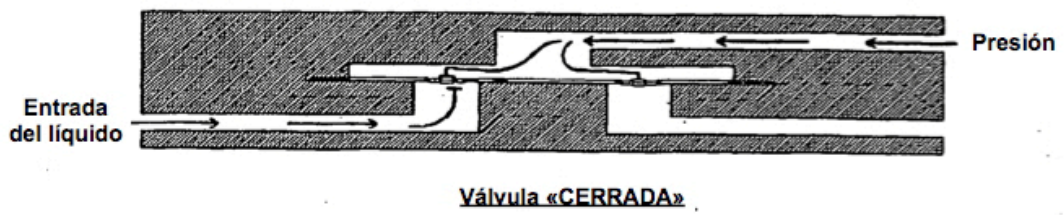


Fig. 8

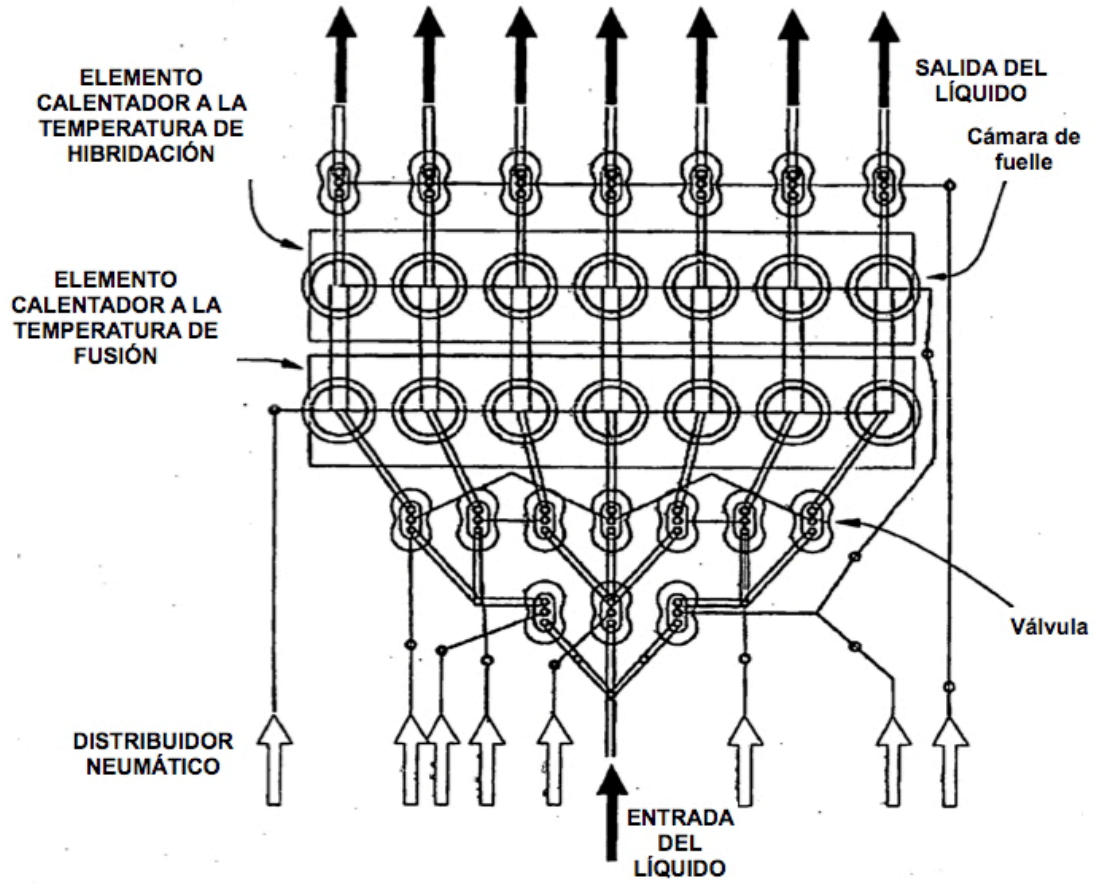


Fig. 9A

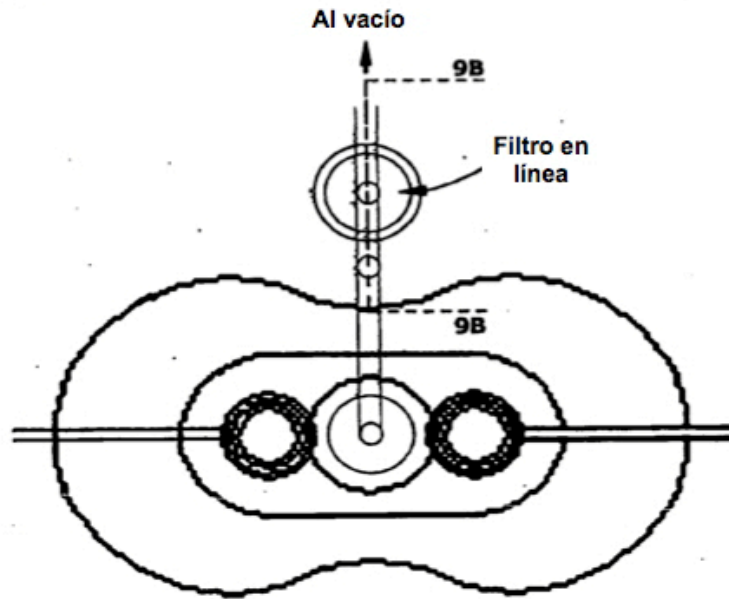
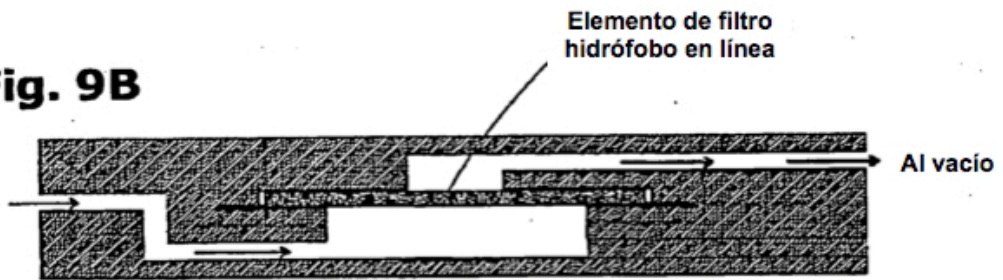


Fig. 9B



ELEMENTO DE FILTRO EN LÍNEA PARA EL DISTRIBUIDOR NEUMÁTICO

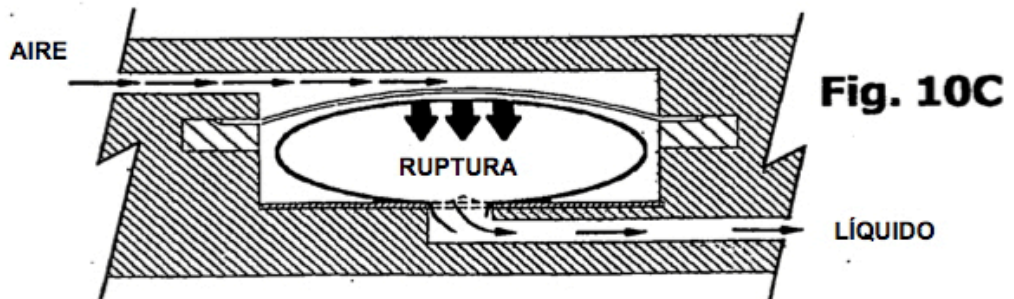
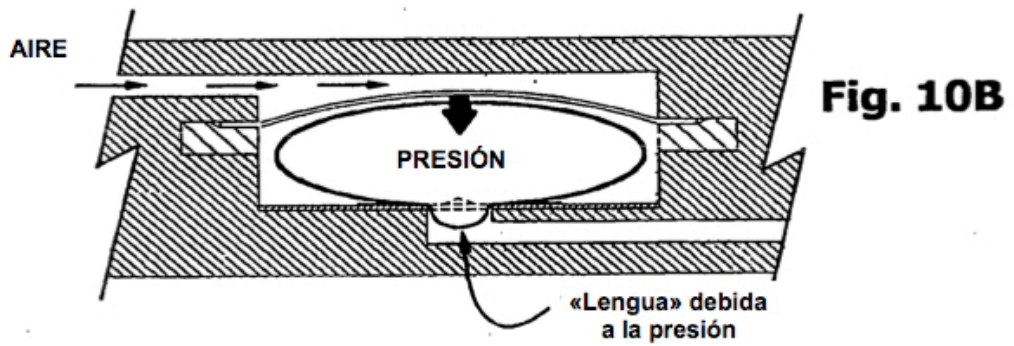
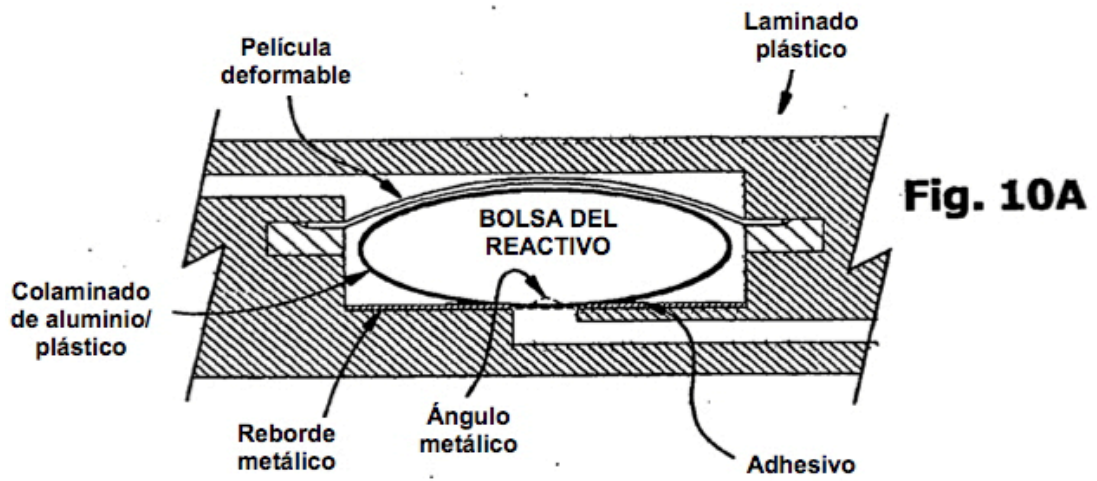
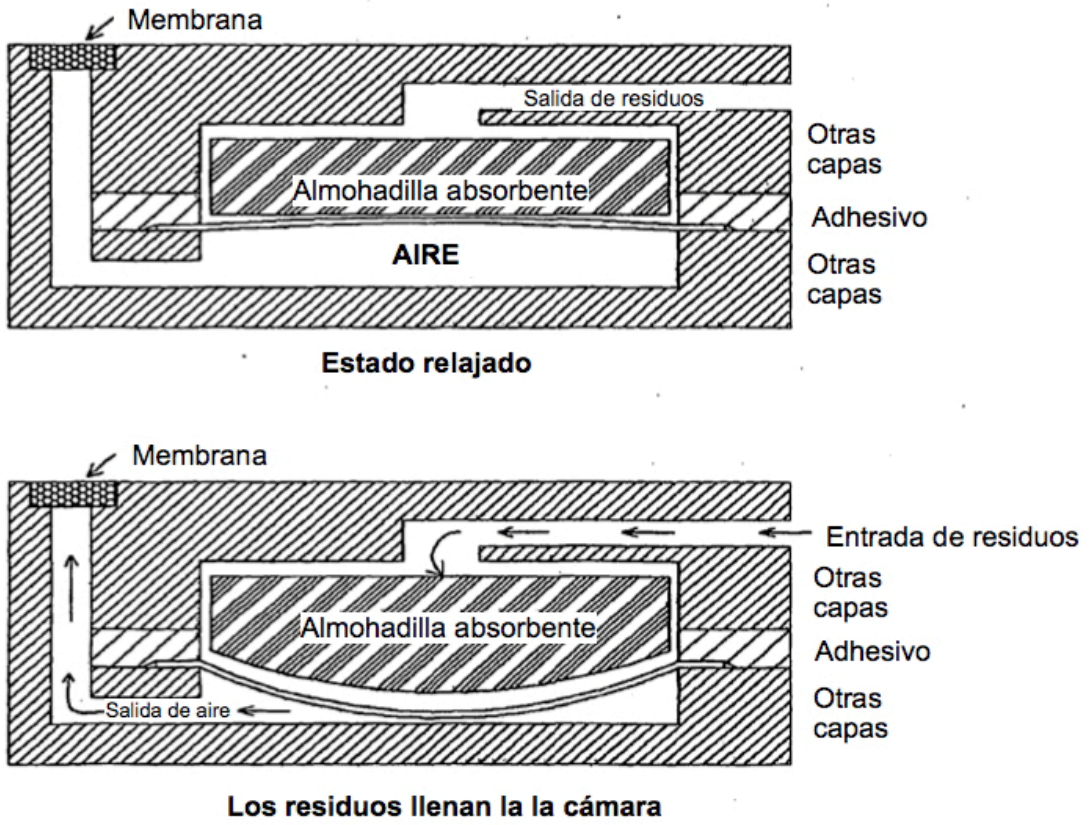


Fig. 11



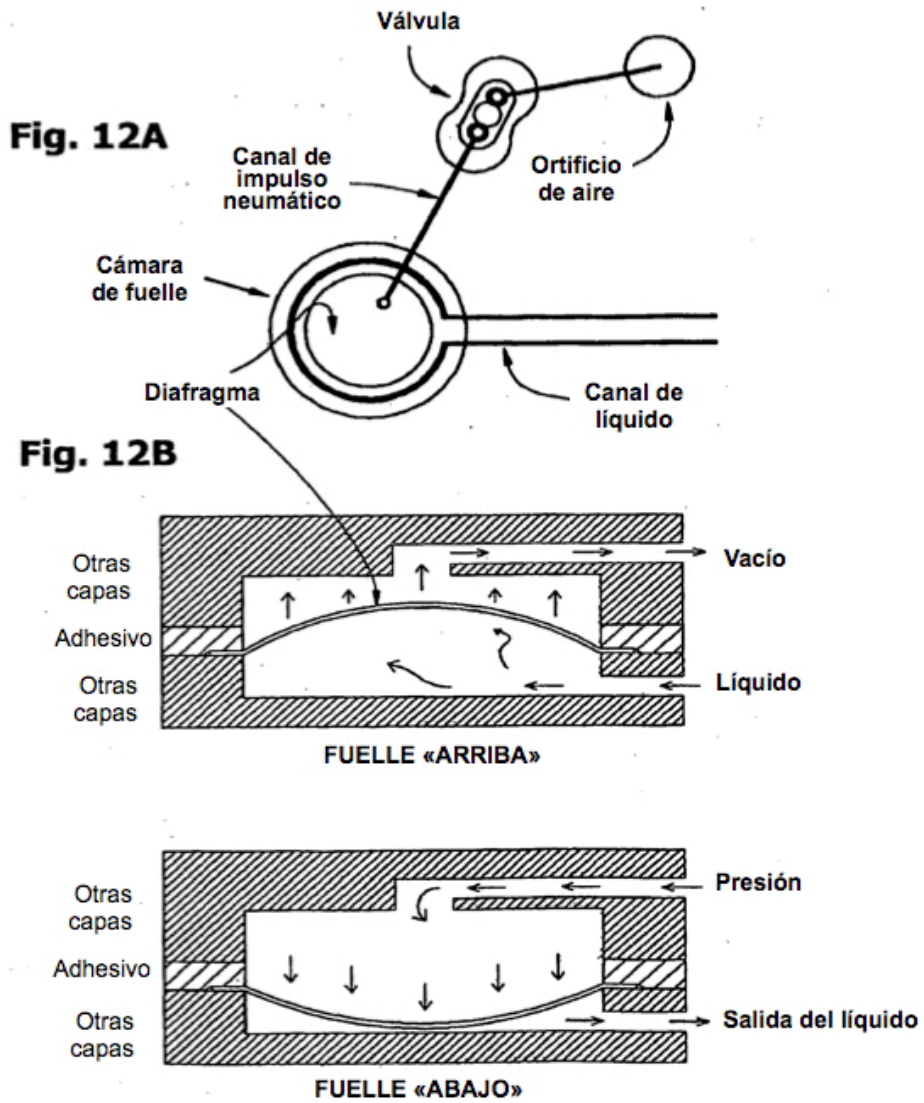


Fig. 13

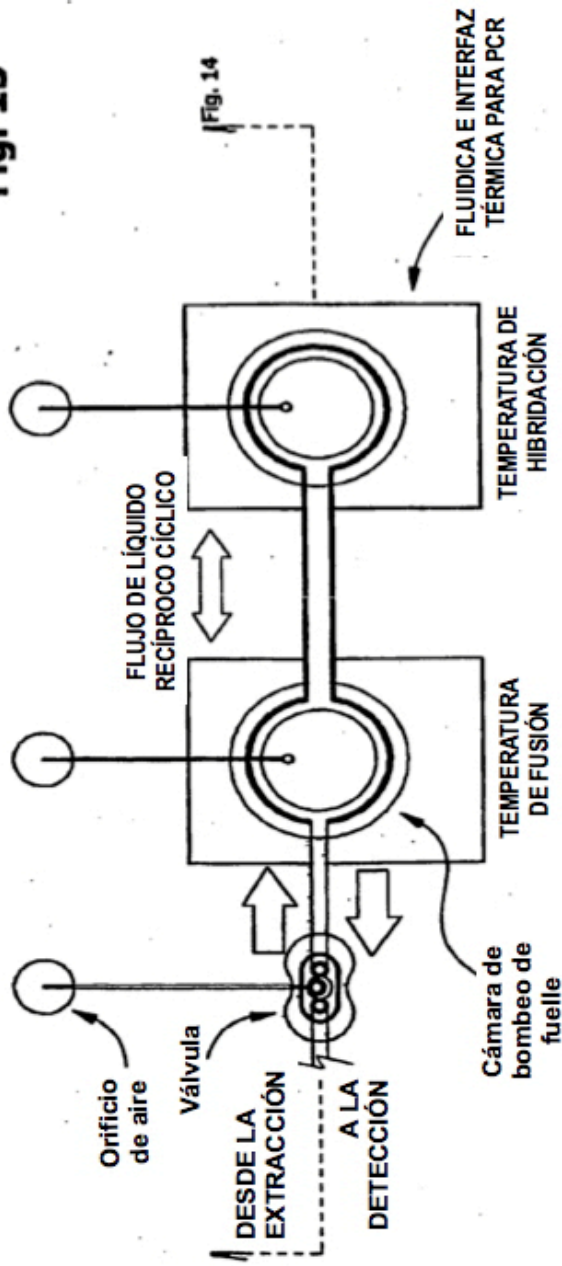


Fig. 14A

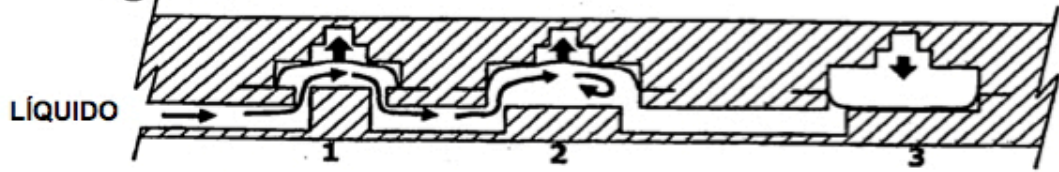


Fig. 14B

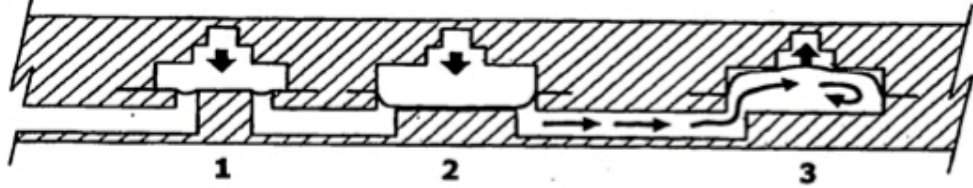


Fig. 14C

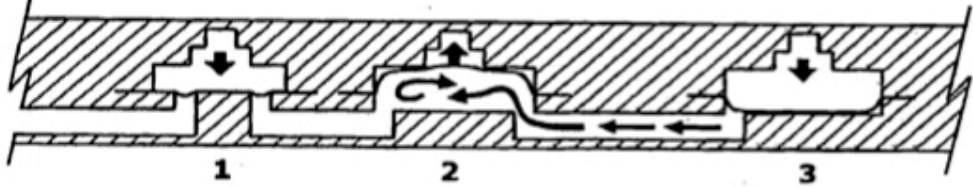


Fig. 14D

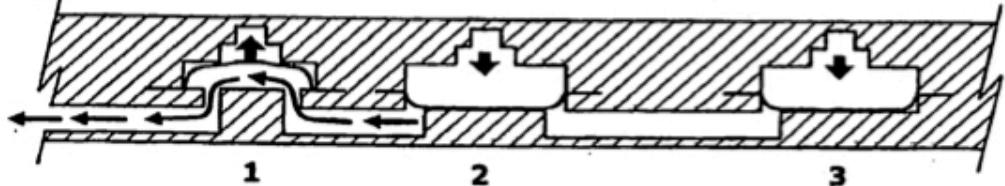


Fig. 15

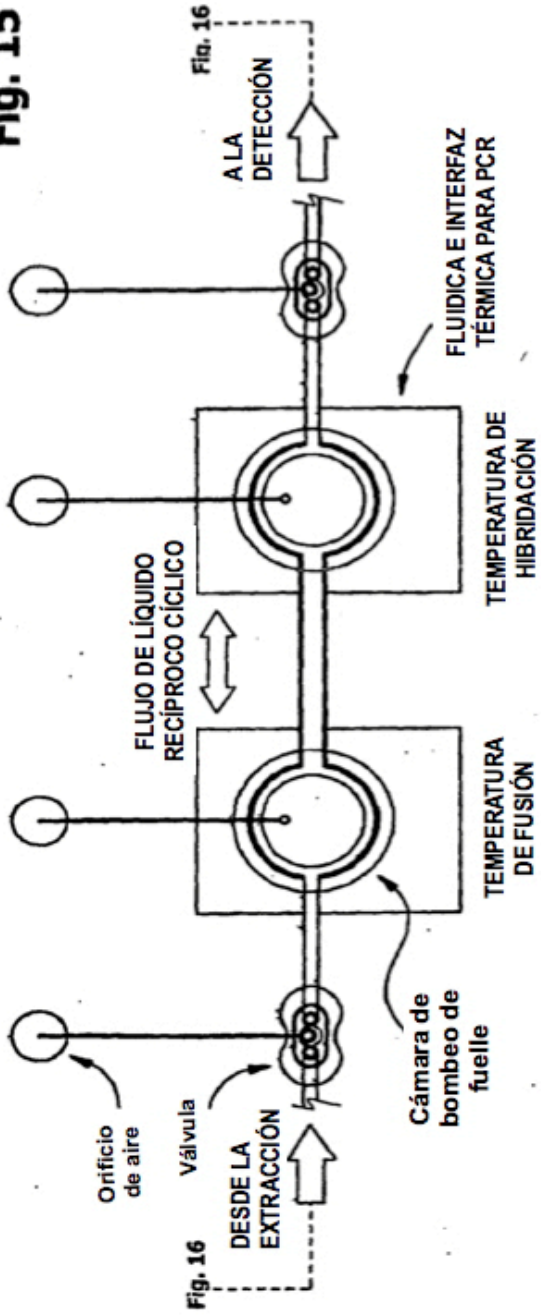


Fig. 16A

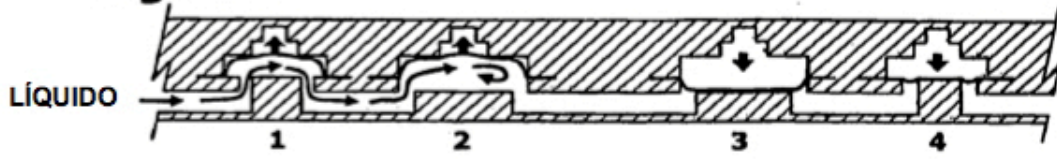


Fig. 16B

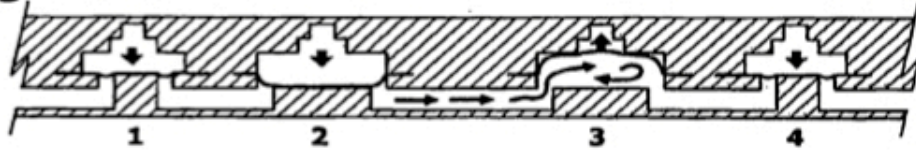


Fig. 16C

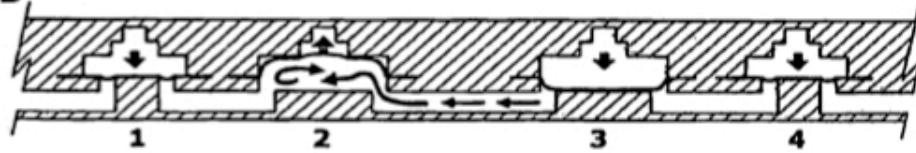


Fig. 16D

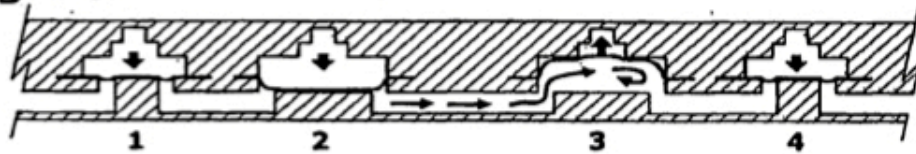


Fig. 16E

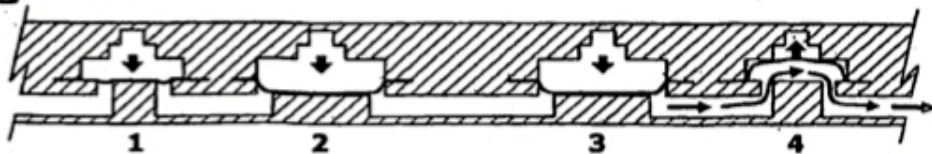
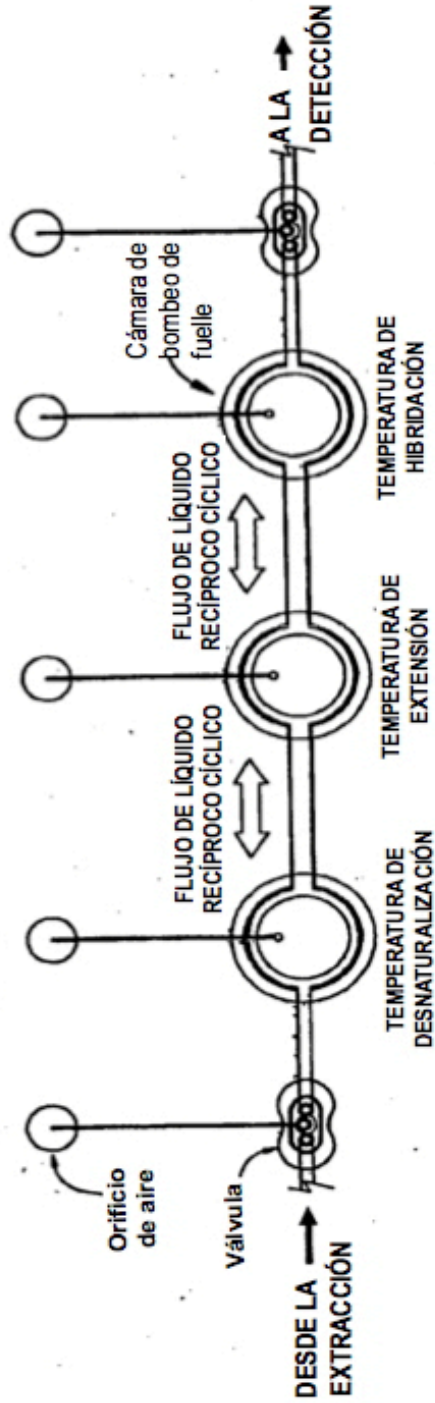
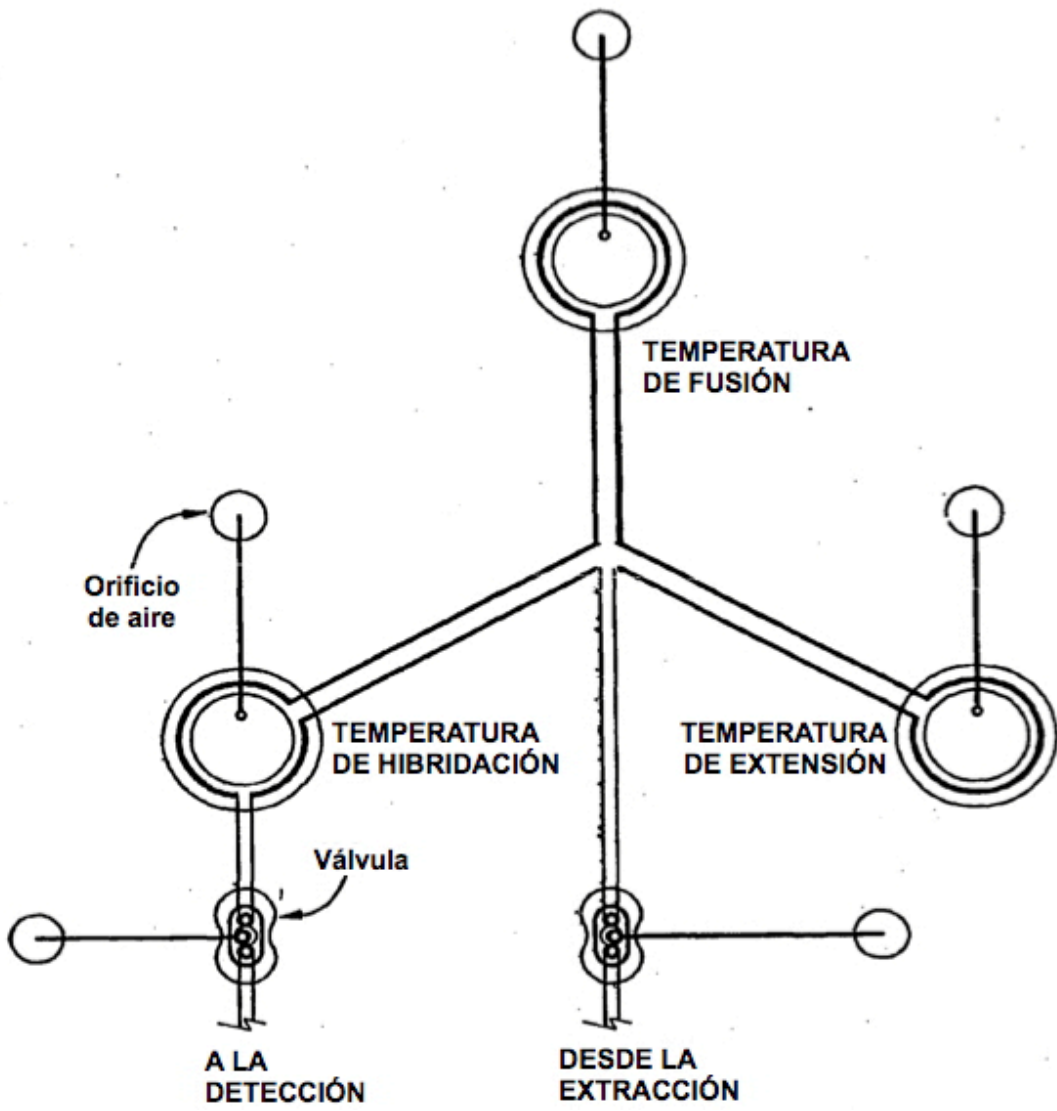


Fig. 17



FLUIDICA E INTERSASE TÉRMICA PARA PCR CON TRES CÁMARAS DE FUELLE

Fig. 18



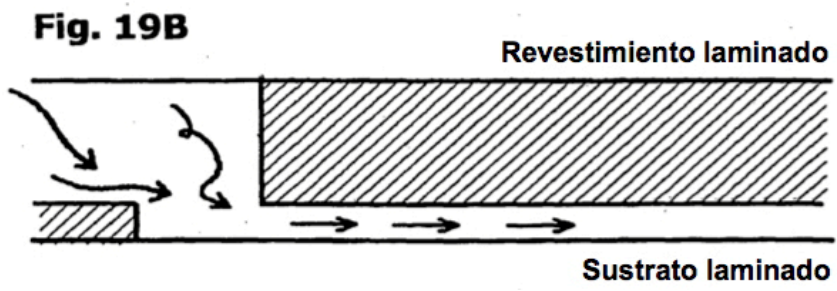
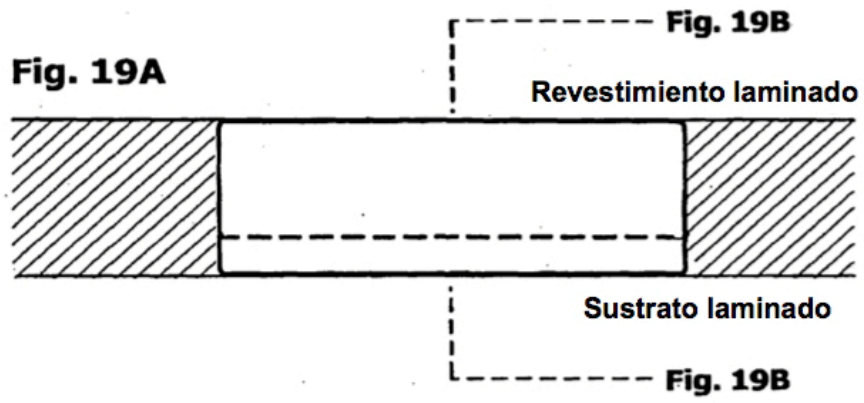


Fig. 20A
Canal microfluidico

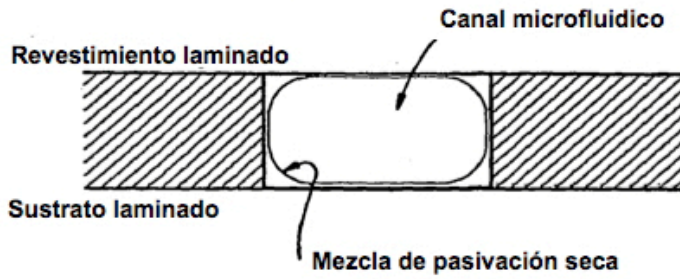


Fig. 20B
Reservorio de perlas magnéticas

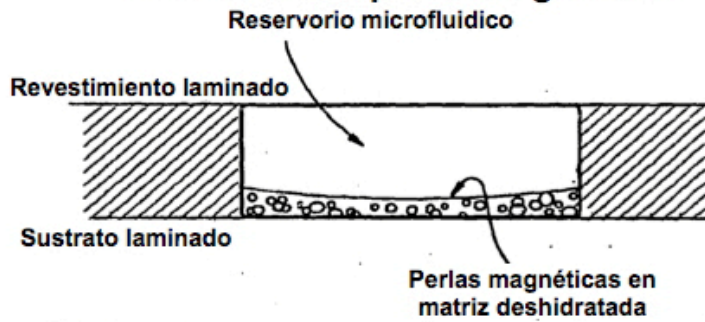


Fig. 20C
Cámara de amplificación

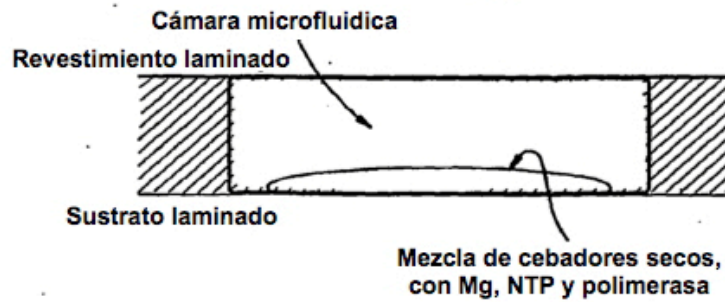


Fig. 21

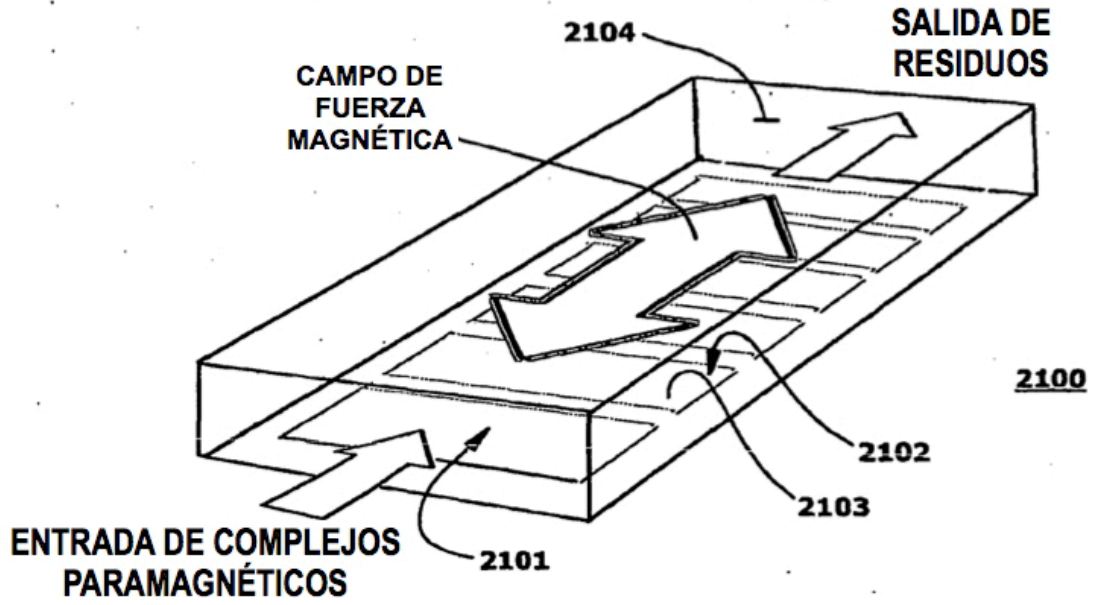
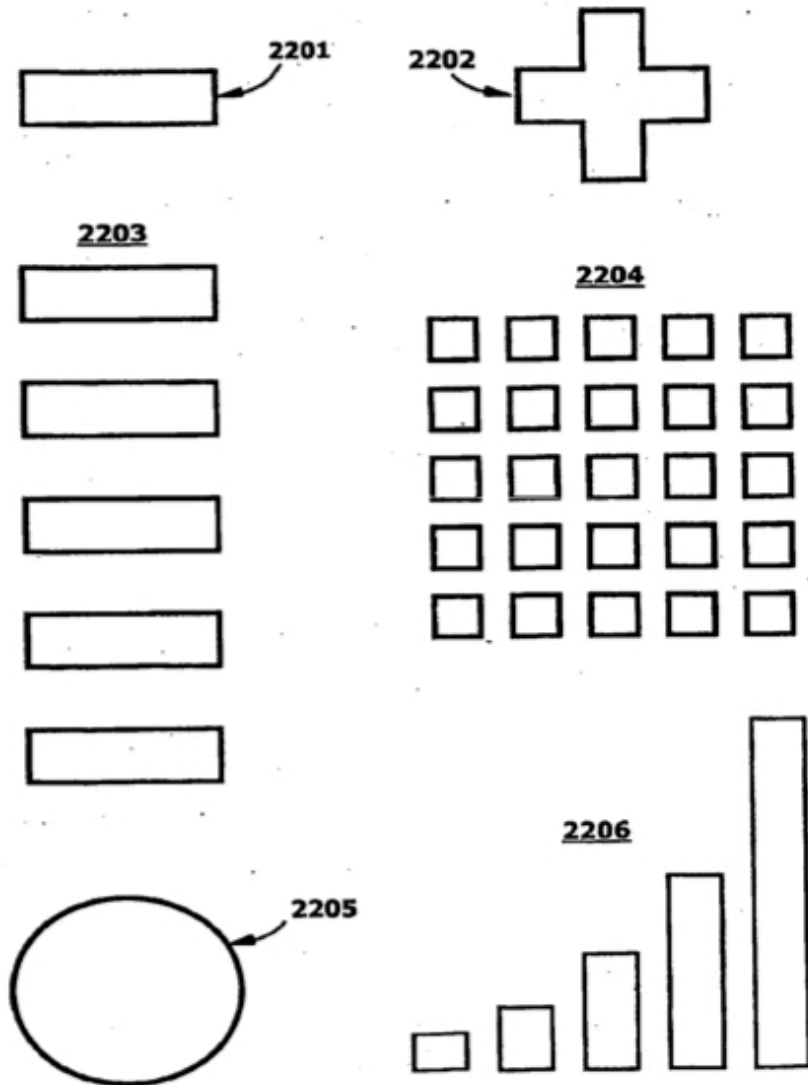


Fig. 22



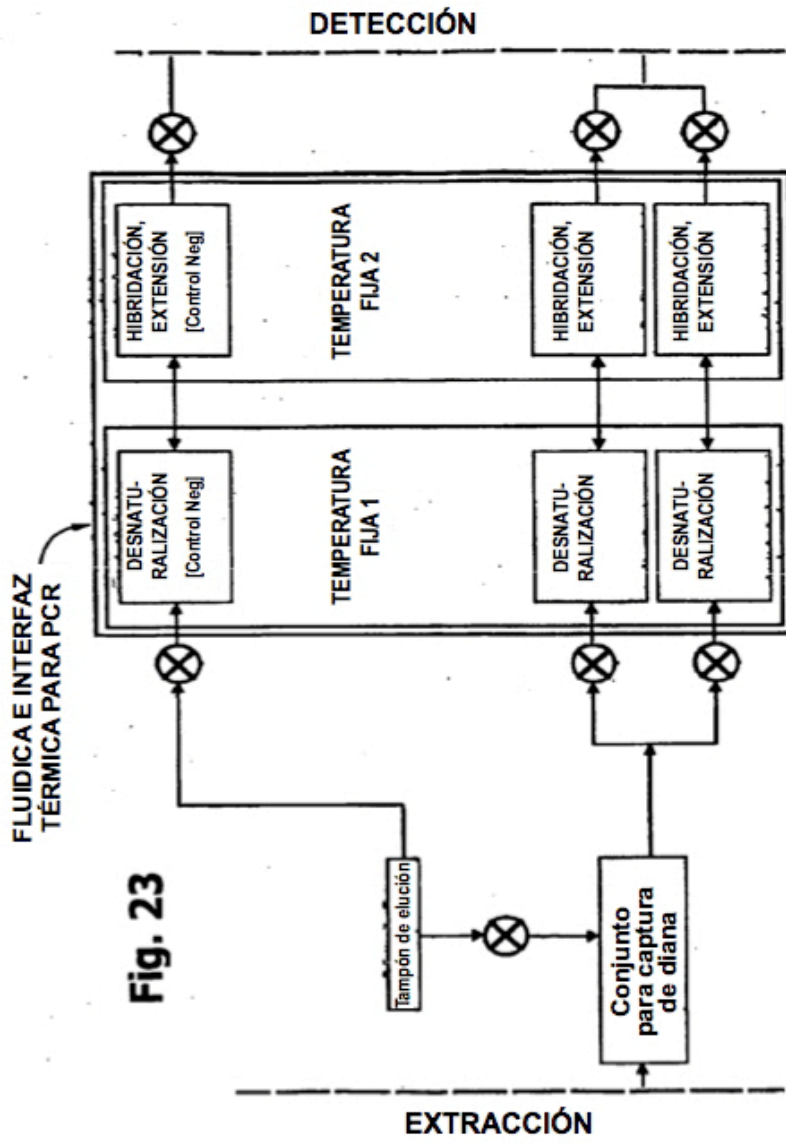


Fig. 23

AMPLIFICACIÓN CON DOBLE ELEMENTO DE CALENTAMIENTO

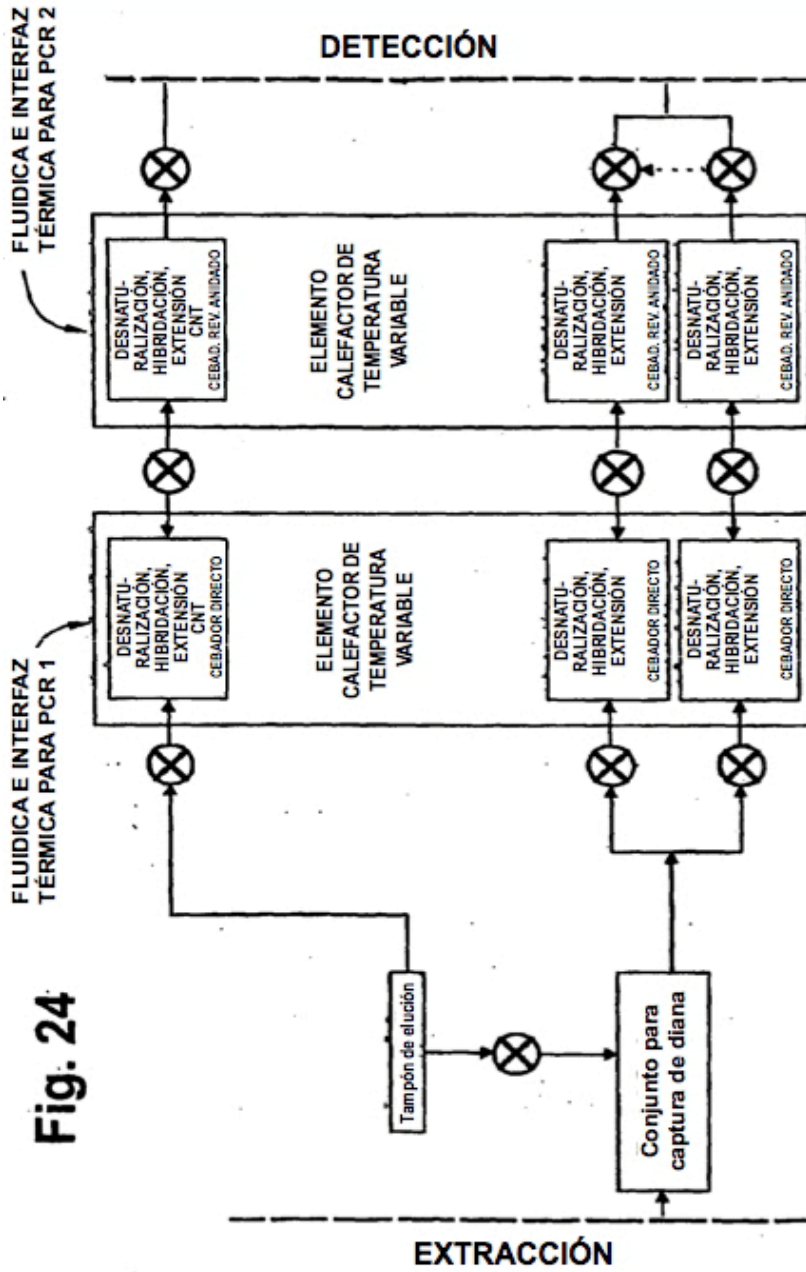


Fig. 24

DISPOSITIVO DE PCR EN SERIE

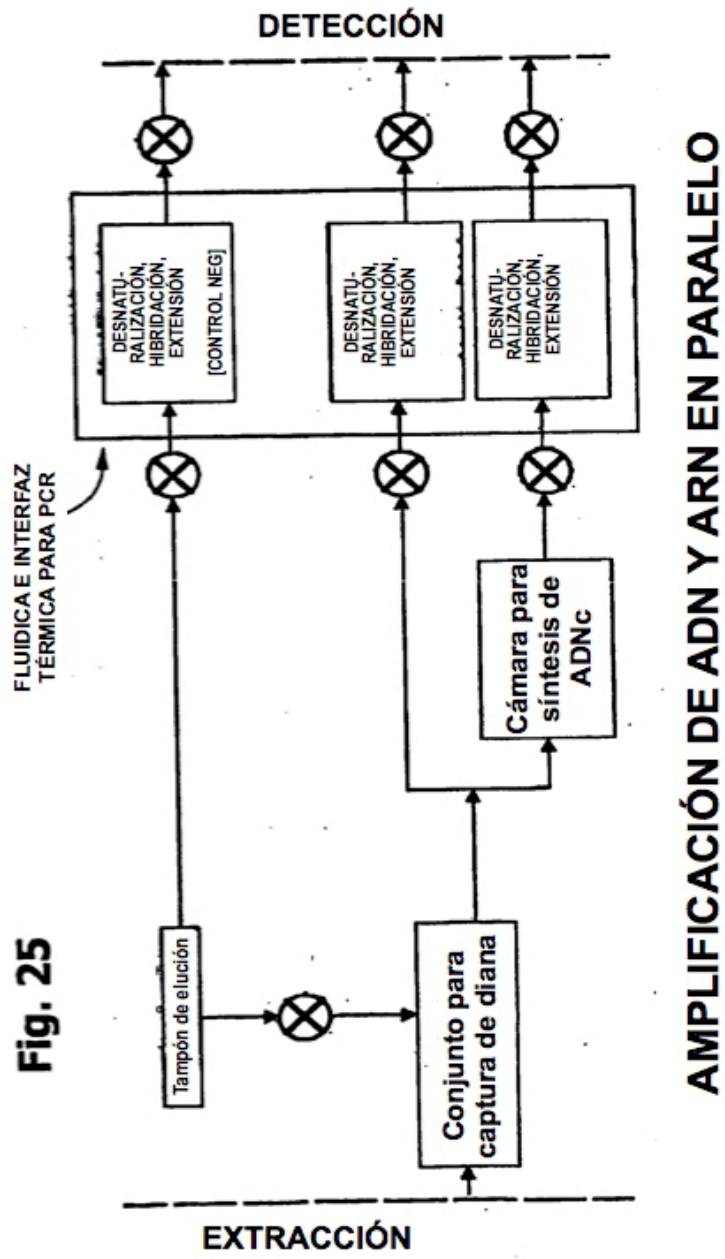


Fig. 25

Fig. 26

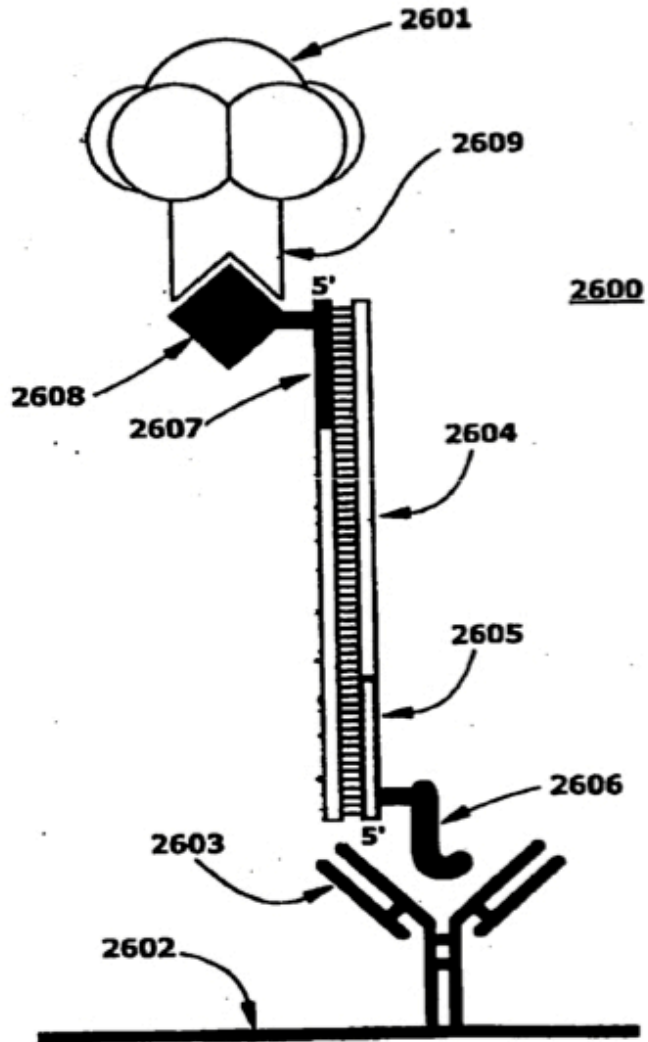


Fig. 27

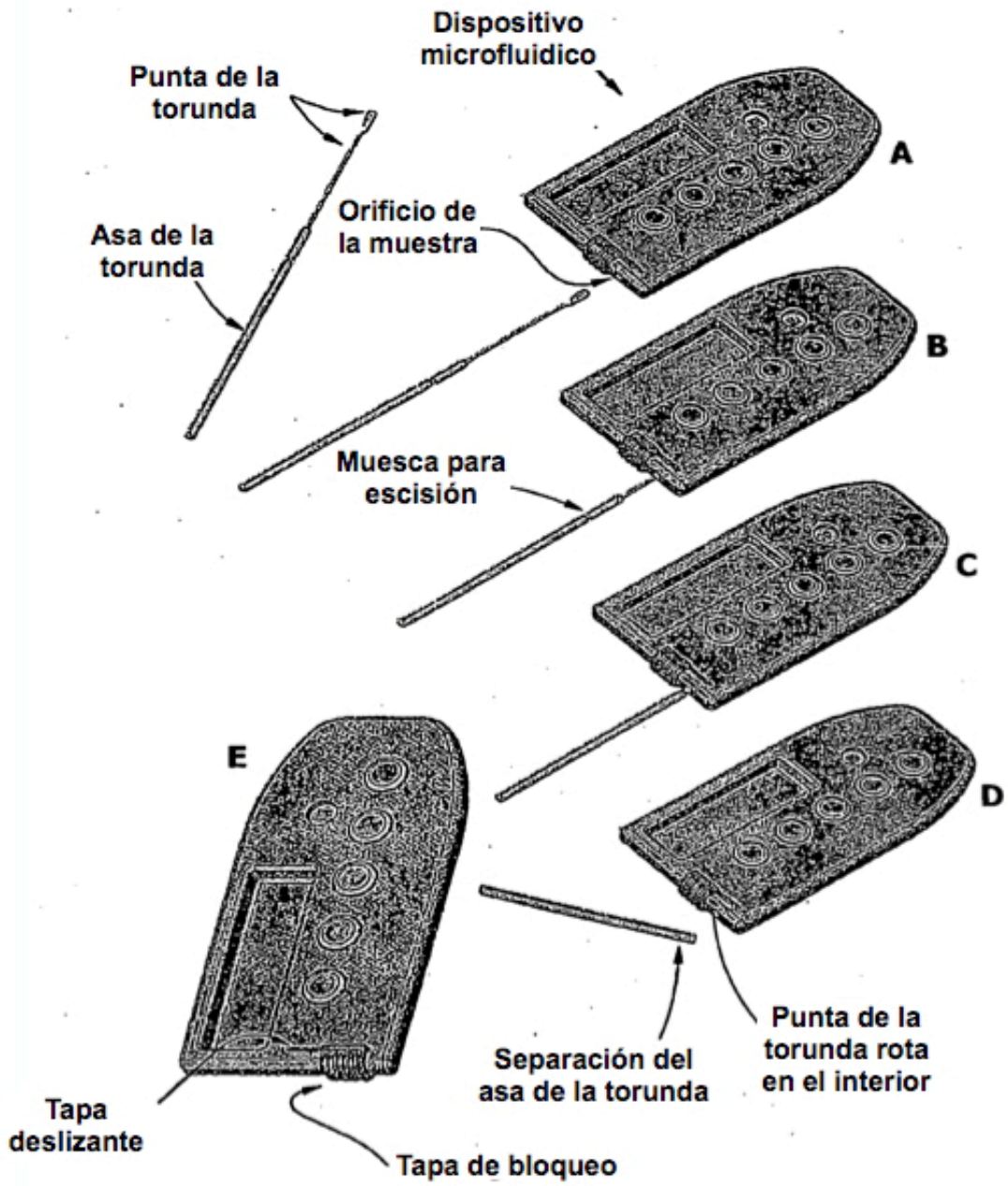



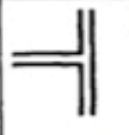

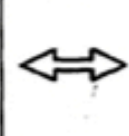




Fig. 28

Símbolos usados en las figuras

	Canal del flujo microfluidico		Orificio de aire del distribuidor neumático
	Paso de flujo con válvula		Orificio de aire del distribuidor neumático con filtro de aislamiento hidrófobo
	Válvula hidráulica		Respiradero higiénico con trampa y filtro hidrófobo de aislamiento
	T en canal microfluidico		Respiradero con válvula de purga
	Paso de flujo recíproco		Reacción, reactivo o cámara de fuelle
	Paso unidireccional del flujo		Receptáculo de residuos
	Cámara de detección con bloques de análisis y ventana óptica		Cámara de detección con ventana óptica