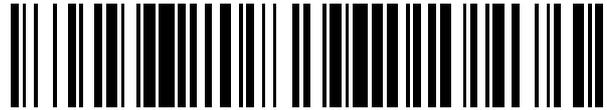


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 566 509**

51 Int. Cl.:

B01L 3/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.02.2004 E 04737303 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.01.2016 EP 1603674**

54 Título: **Procesado de muestras**

30 Prioridad:

05.02.2003 US 445304 P

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

13.04.2016

73 Titular/es:

**IQUUM, INC. (100.0%)
214 LINCOLN STREET SUITE 300
ALLSTON, MA 02134-1348, US**

72 Inventor/es:

**CHEN, SHUQI;
LEMIEUX, BERTRAND;
WANG, ZIHUA;
KOPCZYNSKI, KEVIN R. y
CHEN, LINGJUN**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 566 509 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

Procesado de muestras

5 En la realización de ensayos diagnósticos se requiere frecuentemente la preparación de las muestras, particularmente en el procesado de muestras biológicas. Una muestra biológica, por ejemplo, sufre típicamente procesos exigentes intensivos antes que estén en condición apropiada para un ensayo. La preparación de muestras apropiada requiere con frecuencia condiciones precisas, tales como temperaturas particulares, concentraciones, volúmenes de reactivo y, especialmente, la eliminación de materiales que puedan interferir con el ensayo deseado. Con frecuencia una muestra bruta debe desplazarse a una posición distante para recibir el procesado apropiado por personal altamente especializado en un puesto de laboratorio altamente controlado. Dispositivos y métodos de procesado convencionales requieren con frecuencia instrumentación amplia, altamente compleja y sofisticada. Estos factores de procesado de muestras convencional causa necesariamente una demora en el tiempo que resulta, altos costos, integridad de la muestra comprometida y limitaciones sobre la factibilidad de utilizar ensayos de diagnóstico en muchos casos.

15 La US 6.251.660 B1 se refiere a dispositivos y métodos para detectar moléculas diana en muestras biológicas. Según la US 6.251.660 B1, un ensayo de una muestra biológica se lleva a cabo en una cámara que comprende compartimentos múltiples. La cámara está construida de material flexible de modo que cada compartimiento pueda ajustarse en forma y tamaño. Cada compartimiento se separa del compartimiento adyacente mediante una barrera y puede romperse fácilmente mediante aplicación de presión hidrostática. Se proporciona un rodillo para aplicar presión progresivamente a un compartimiento dado en la dirección de un compartimiento adyacente hasta que se rompe la barrera y el contenido del compartimiento dado fluye en, y se mezcla con, el contenido del compartimiento adyacente. De este modo pueden llevarse a cabo ensayos de etapas múltiples.

20 La US 3.036.894 se refiere a túmulos de procesado de muestras (véase la figura 6) en donde los compartimientos están separados mediante abrazaderas en forma de U.

Resumen

30 El presente invento proporciona un túbulo de procesado de muestras para procesar muestras. El túbulo descrito puede facilitar la preparación de muestras a través de múltiples etapas de procesado..

35 En un aspecto un túbulo de procesado de muestras incluye las características de la reivindicación 1. En las reivindicaciones dependientes se citan modalidades preferidas adicionales.

40 El túbulo descrito puede proporcionar ventajas significantes sobre el arte existente. En ciertas modalidades puede pre-enpaquetarse un túbulo con reactivos para un protocolo de procesado de muestras deseado, proporcionando de este modo los materiales para un ensayo completo en un paquete conveniente. En ciertas modalidades se segregan productos de desecho de un objetivo de interés prematuramente en el proceso, de modo que la muestra procesada no entra en contacto con superficies que han entrado en contacto con la muestra no procesada. Por consiguiente es menos probable, que cantidades de vestigio de inhibidores de reacción presentes en la muestra sin procesar que podrían recubrir las paredes del túbulo, contaminen la muestra procesada.

Breve descripción de los dibujos

45 La figura 1A es una vista en alzado frontal de una modalidad de ejemplo de un tubo de muestra que incluye un túbulo. La figura 1B es una vista en sección transversal de un tubo de muestra dispuesto en el interior de un analizador.

50 La figura 2A es una vista en sección transversal de un tubo de muestra que incluye un túbulo. La figura 2B es una vista en perspectiva de otra modalidad de ejemplo de un tubo de muestra.

55 Las figuras 3A-B son, respectivamente vistas en alzado frontal y lateral de una modalidad de ejemplo de un tubo de muestras.

La figura 4A es una vista en sección transversal de una modalidad de ejemplo de un tubo de muestra situado en un analizador. La figura 4B es una vista de detalle esquemática de una modalidad de una muestra biológica.

60 La figura 5A-B son, respectivamente, vistas en sección transversal y perspectiva de realizaciones de tubos de ejemplo posicionados en los analizadores.

Las figuras 6A-C son vistas en sección transversal de una realización de un dispositivo de recogida de muestras que recibe una muestra.

65 Las figuras 7A-B son, respectivamente, vistas en sección transversal y en perspectiva de realizaciones de ejemplo de sistemas de molturación.

Las figuras 8-10 son gráficas de datos experimentales generados utilizando modalidades de ejemplo seleccionadas de los dispositivos y métodos descritos.

Descripción detallada

5 La presente invención describe dispositivos y métodos para el procesado de muestras. En varias modalidades túbulo segmentados proporcionan un recipiente conveniente para recibir, almacenar, procesar y/o analizar una muestra biológica. En ciertas modalidades, el túbulo segmentado facilita protocolos de procesado de muestras que implican múltiples etapas de procesado. En ciertas modalidades puede recogerse una muestra en un túbulo de muestra y luego posicionarse el túbulo en un analizador; luego el analizador puede manipular el túbulo y su contenido para procesar la muestra.

15 Una modalidad preferida incluye un túbulo flexible que se ha segmentado en compartimientos mediante sellos rompibles. Los segmentos individuales pueden contener varios reactivos y tampones para el procesado de una muestra. Pueden aplicarse abrazaderas y actuadores al túbulo en varias combinaciones y con varios tiempos para dirigir el movimiento del fluido y producir que estallen los sellos rompibles. Este estallido de los sellos rompibles puede dejar una superficie de túbulo interna que esté sustancialmente libre de obstrucciones al flujo de fluido. En modalidades preferidas el flujo de la muestra biológica puede dirigirse hacia el extremo distal del túbulo a medida que progresa el proceso, mientras que el flujo de desecho puede forzarse a moverse en la dirección opuesta, hacia la abertura del túbulo en donde entró inicialmente la muestra. Esta entrada de muestra puede sellarse, posiblemente de forma permanente, mediante una tapa con un mecanismo de cierre, y puede disponerse una cámara de desecho en la tapa para recibir el desecho para almacenamiento. Un beneficio significativo de este método es que la muestra procesada no entra en contacto con superficies que han entrado en contacto con la muestra sin procesar. Por consiguiente cantidades de vestigios de inhibidores de reacción presentes en la muestra sin procesar que podrían recubrir las paredes del túbulo es menos probable que contaminen la muestra procesada.

25 En algunas modalidades el túbulo puede ser expandible de modo a poder recibir un volumen de fluido de cada uno de los segmentos múltiples en un segmento; esto puede permitir que la muestra y reactivos sufran ciertas etapas del proceso en un segmento conduciendo a una estructura mecánica mas simple para llevar a cabo ensayos. Otro beneficio de una modalidad que utilice un túbulo que puede ser así expandible es que la misma estructura de túbulo puede ser utilizada para empaquetar diferentes volúmenes de reactivos dentro de segmentos, permitiendo que el mismo túbulo sea empaquetado en diferentes formas dependiendo del ensayo que ha de llevarse a cabo.

35 El aparato puede incluir un túbulo flexible transparente 10 (figuras 1A-B, Figuras 2A-E y Figuras 3A-B capaz de ser configurado en una pluralidad de segmentos, tales como 16, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180 y/o 190, y siendo sustancialmente aplanados mediante compresión. En una modalidad un túbulo puede tener por lo menos dos segmentos. En una modalidad un túbulo puede tener por lo menos tres segmentos. El túbulo flexible puede proporcionar funcionalidad operativa entre aproximadamente 2°C y 105°C, compatibilidad con muestras, dianas y reactivos, baja permeabilidad al gas, mínimas propiedades de fluorescencia, y/o resiliencia durante repetida compresión y ciclos de flexión. El túbulo puede obtenerse de una variedad de materiales, ejemplos de los cuales incluyen, pero sin limitación: poliolefinas tales como polipropileno o polietileno, poliuretano, co-polímeros de poliolefina y/u otros materiales que proporcionen características apropiadas. Las propiedades del túbulo, tales como transparencia, propiedades de humectación, lisura superficial, carga superficial y resiliencia térmica, pueden afectar la prestación del túbulo. Estas propiedades pueden ser mejoradas a través de procesos ejemplificativos tales como: siembra, tratamiento de plasma, adición de aditivos e irradiación. En algunas realizaciones puede añadirse un material aditivo al plástico para mejorar las características seleccionadas. Por ejemplo puede adicionarse un aditivo de deslizamiento, tal como erucamida y/u oleamida; en alguna modalidad puede adicionarse un aditivo llamado "anti-bloque". Un aditivo puede tener una concentración en el plástico en el rango de alrededor de 0,01% a alrededor de 5,0%.

50 El túbulo puede fabricarse con una amplia variedad de métodos apropiados tales como extrusión, moldeo por inyección y moldeo por soplado. En una modalidad preferida el túbulo se extruye de forma continua. Técnicas alterativas para la fabricación del túbulo incluyen, por ejemplo, colada, extrusión o películas sopladas que pueden proporcionar mediante operaciones de procesos secundarios el túbulo apropiado. El material de pared del túbulo puede incluir múltiples capas mediante co-extrusión o mediante laminación de película. Por ejemplo, una capa interna puede elegirse para alta biocompatibilidad y una capa exterior puede elegirse para baja permeabilidad de gas. Como ejemplo adicional la capa interior puede formarse fácilmente en un sello rompible 14 (Figuras 2A-B y Figuras 3A-B), tal como un sello desprendible, mientras que la capa exterior puede ser elástica y altamente impermeable. Para uso en la presente descripción se prefiere que el túbulo tenga un espesor de pared de alrededor de 0,03 mm a alrededor de 0,8 mm, de preferencia de 0,03 mm a alrededor de 0,5 mm, con el túbulo apto para aplanarse sustancialmente con la aplicación de una presión exterior del orden de 1 atmósfera.

65 En algunas modalidades el aparato puede tener paredes endurecidas en por lo menos un segmento para permitir la dislocación de masas de células de muestra sólida tales como muestras de biopsia o muestras ambientales utilizando trituraciones de molienda. Un ejemplo de estas características de pared endurecida, como se ilustra en la figura 7A, puede ser superficies internas micro-dentadas 109 en caras opuestas de la pared de túbulo, que están

- defasadas de modo que comprimiendo el túbulo se produce un movimiento deslizante a lo largo del eje del túbulo. La pared del túbulo en la proximidad de estas superficies molidas 109 puede ser fortificada utilizando parches de refuerzo obtenidos de un plástico apropiadamente elástico tal como policarbonato o polietilentereftalato. Las superficies internas dentadas pueden obtenerse con materiales similarmente apropiados. En otra modalidad una almohadilla como 214 ilustrada en las figuras 5A-B, que tiene característica de superficie de molienda puede unirse a la pared interna del túbulo. La almohadilla puede obtenerse de material endurecido y la característica superficial puede crearse utilizando métodos mecánicos, electroquímicos o microelectromecánicos convencionales, de modo que la almohadilla pueda soportar la compresión.
- El túbulo de muestra 10 puede dividirse en uno o mas segmentos, 16, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180 y/o 190, y/o sub-segmentos 18, 121, 122. En modalidades preferidas los segmentos se definen mediante sellos rompibles 14 para aislar fluidamente segmentos adyacentes. Esta característica de sello puede ser útil en la separación, por ejemplo, de un reactivo seco de un reactivo líquido hasta que los dos puedan reconstituirse para desempeñar un ensayo específico, o para separar químicamente especies reactivas hasta la reacción deseada. Como se ilustra en las figuras 3A-B puede formarse un sello rompible 14 en una región del túbulo 10 en donde se han unido sustancialmente paredes opuestas, pero no tan fuertemente como para impedir que las paredes se separen por pelado luego sin estropear de modo significativo el túbulo o las superficies previamente selladas. Un sello de esta índole puede denominarse un sello "removible". En una modalidad preferida, la región de sello desprendible puede ser una banda ortogonal al eje del túbulo. Esta puede abarcar una longitud de túbulo en el rango de alrededor de 0,5 mm a 5 mm, de preferencia alrededor de 1 mm a alrededor de 3 mm, mas preferentemente alrededor de 1 mm. El sello abarca de preferencia el ancho total del túbulo de modo que selle el segmento. En algunas modalidades la banda de sello puede variar en altura o forma y/u orientarse en un ángulo transversal al eje del túbulo; estas variaciones pueden cambiar las características de pelado.
- Los sellos rompibles 14 pueden crearse entre paredes opuestas del túbulo aplicando una cantidad controlada de energía al túbulo en la posición en donde se desea el sello desprendible. Por ejemplo, una cabeza sellante de temperatura controlada puede presionar el túbulo a una presión específica contra un yunque fijo durante un intervalo de tiempo específico. Pueden elegirse varias combinaciones de temperatura, presión y tiempo para formar un sello de tamaño deseado y resistencia al pelado. Puede suministrarse energía por ejemplo mediante una cabeza sellante de temperatura controlada mantenida a una temperatura constante entre 105°C y 140°C para calentar un material en tubo de polipropileno; un actuador apto para suministrar una presión precisa entre 3 y 100 atmósferas sobre la región de sello deseada; y un sistema de control para impulsar la secuencia del actuador a un tiempo de ciclo específico entre 1 y 30 segundos. Utilizando este método se han creado sellos satisfactorios en túbulos de polipropileno para abrirse por pelado cuando se someten a una presión interna del orden de 1 atmósfera. Técnicas alternas para suministrar la energía de sellado al túbulo incluyen RF y soldadura ultrasónica.
- En otras realizaciones pueden utilizarse materiales de túbulo alternos y mezclas de materiales para optimizar la prestación del sello desprendible. Por ejemplo puede mezclarse dos polímeros de polipropileno de diferente temperatura de fusión en una relación tal que la composición y características de fusión se optimicen para la formación del sello desprendible. En adición a o en lugar de sellos rompibles 14, el túbulo flexible puede tener además una o mas puertas de presión 194, que son capaces de abrir reversiblemente y cerrarse durante la operación de una prueba aplicando una fuerza controlada a un segmento del túbulo flexible.
- En un segmento de túbulo puede embeberse un filtro. Ejemplos de filtros 206 y 216 se muestran en la figura 4A y figuras 5A-B, respectivamente. En una modalidad preferida puede formarse un filtro mediante apilado de capas multiples de material de filtro flexible. La capa superior del filtro que contacta directamente una muestra puede tener un tamaño de poro seleccionado para filtración; la capa de fondo del filtro puede incluir un material con tamaño de poro mucho mayor para proporcionar una estructura de soporte para la capa mas superior cuando se aplica una presión durante la filtración. En esta modalidad preferida el filtro puede ser doblado para formar una bolsa, con los bordes de su extremo abierto unidos firmemente a la pared del túbulo. El segmento con la bolsa de filtro puede ser capaz de aplanarse sustancialmente mediante compresión del exterior del túbulo.
- En modalidades de ejemplo puede almacenarse uno o mas reactivos como sustancia seca y/o como soluciones líquidas en segmentos de túbulo. En modalidades en donde pueden almacenarse reactivos en formato seco, soluciones líquidas pueden almacenarse en segmentos adyacentes para facilitar la reconstitución de la solución de reactivo. Ejemplos de reactivos típicos incluyen: reactivo de lisis, tampón de elusión, tampón de lavado, inhibidor de DNase, inhibidor de RNase, inhibidor de proteinasa, agente quelante, reactivo neutralizante, solución de sal catrónica, detergente, tensoactivo, anticoagulante, solución germinante, isopropanol, solución de etanol, anticuerpo, sondas de ácido nucleico, sondas de ácido nucleico peptídico, y sondas de ácido nucleico fosfotioato. En modalidades en donde uno de los reactivos es una solución de sal caotrópica, un componente preferido es isocianato de guanidinio o clorhidrato de guanidinio o una combinación de los mismos. En algunas modalidades el orden en el que los reactivos puede almacenarse en el túbulo respecto a la abertura a través de la cual se introduce una muestra, refleja el orden en donde los reactivos pueden utilizarse en métodos que utilizan el tubo. En modalidades preferidas un reactivo incluye una sustancia capaz de ligazón específica a un componente preseleccionado de una muestra. Por ejemplo una sustancia puede ligarse específicamente a ácido nucleico, o una sonda de ácido nucleico puede ligarse específicamente a ácidos nucleicos con secuencias de base particulares.

En otras modalidades de ejemplo puede contenerse un sustrato de fase sólida en un segmento de túbulo utilizado para capturar uno o mas componentes seleccionados de una muestra (si este componente está presente en una muestra), tal como un microorganismo objetivo o ácidos nucleicos. La capturan puede ayudar a enriquecer el componente objetivo y separar los inhibidores de reacción de una muestra. Los sustratos pueden ser material de fase sólida que puede capturar células objetivo, viriones, ácidos nucleicos u otros componentes seleccionados bajo condiciones químicas y de temperatura definidas, y puede liberar los componentes bajo diferentes condiciones químicas y de temperatura.

En algunas modalidades un reactivo puede ser recubierto sobre el sustrato. Ejemplos de reactivo recubrible son: receptores, ligandos, anticuerpos, antígenos, sondas de ácidos nucleico, sondas de ácido nucleico peptídico, sondas de ácido nucleico fosforilado, bacteriofagos, sílice, sales caotrópicas, proteinasas, inhibidores de DNAsas, RNAsas, DNasa, inhibidores de RNasa, y soluciones germinantes. En algunas modalidades el sustrato puede almacenarse en un segmento seco del túbulo mientras que en otras modalidades puede almacenarse sumergido en un líquido. En algunas modalidades el orden en el que los reactivos pueden almacenarse en el túbulo respecto al sustrato y la abertura a través de la cual se introduce una muestra, refleja el orden en el que los reactivos y el sustrato pueden utilizarse en métodos que utilizan el aparato.

El sustrato puede ser: perlas, almohadillas, filtros, láminas, y/o una porción de superficie de pared de túbulo o una herramienta de recogida. En modalidades en donde el sustrato es una pluralidad de perlas, dichas perlas pueden ser perlas de sílice, perlas magnéticas, perlas magnéticas de sílice, perlas de vidrio, perlas coloidales de nitrocelulosa y perlas coloidales de nitrocelulosa magnetizadas. En algunas modalidades en donde las perlas pueden ser paramagnéticas, las perlas pueden ser capturadas mediante un campo magnético. Ejemplos de reactivos que pueden permitir la adsorción selectiva de moléculas de ácido nucleico a una superficie recubierta grupo-funcional se describen, por ejemplo en las patentes U.S. núms.: 5.705.628; 5.898.071 y 6.534.262. La separación puede llevarse a cabo manipulando la resistencia iónica y concentración de polialquilenglicol de la solución para precipitar selectivamente, y absorber de forma reversible, los ácidos nucleicos a una superficie de fase sólida.

Cuando estas superficies de fase sólida son micropartículas paramagnéticas, las perlas magnéticas, a las que se han adsorbido las moléculas de ácido nucleico diana, pueden lavarse bajo condiciones que retengan los ácidos nucleicos pero no otras moléculas. Las moléculas de ácido nucleico aisladas a través de este procedimiento son apropiadas para: electroforesis capilar, secuenciación nucleótida, transcripción inversa, colación, transfección, transducción, microinyección de células mamarias, protocolos de terapia de genes, la síntesis in vitro de sondas de ARN, construcción de librería CADN, amplificación de reacción por cadena de polimerasa (PCR). Varias compañías ofrecen sistemas de purificación de base magnética, tales como QIAGEN's MagAttract™, Cortex Biochem's MagaZorb[®], Roche Applied Science's MagNA Pure LC[®], y MagPrep[®] Silica de Merck & Co. Todos estos kits utilizan partículas cargadas negativamente y manipulan condiciones de tampón para ligar selectivamente una variedad de ácidos nucleicos a las perlas, lavan las perlas y eluyen las perlas en tampones acuosos. Muchos de los productos utilizados por estas compañías utilizan sales caotrópicas para ayudar en la precipitación de ácidos nucleicos sobre las perlas magnéticas. Ejemplos se describen en las patentes U.S. núms. 4.427.580, 4.483.920 y 5.234.809.

En algunas modalidades el sustrato puede ser una almohadilla 214 o 30 (figuras 5A-B, Figuras 6A-C). En otras realizaciones la almohadilla de sustrato puede incluir el papel 35, capas alternas de papeles 34 con diferentes propiedades hidrofóbicas, filtros de fibra de vidrio, o filtros de policarbonato con tamaños de poro definidos. En algunas modalidades la almohadilla puede ser un filtro o lámina impermeable 38 para cubrir porción seleccionada de las superficies de la almohadilla, teniendo dicho filtro un tamaño de poro predeterminado. Un dispositivo de filtración de esta índole puede utilizarse para la separación de glóbulos blancos 32 y glóbulos rojos 33 (u otras partículas, tales como virus o microorganismos) de sangre entera 31 y/u otras muestras. La almohadilla 214 puede montarse sobre la pared del túbulo (figuras 5A-B) y/o sobre una herramienta de recogida de muestras 26. En algunas realizaciones la almohadilla puede empaparse con una solución reactiva mientras que en otras modalidades puede recubrirse con reactivos secos.

Modalidades de ejemplo preferidas pueden incluir una disposición lineal de 2 o mas segmentos de túbulo 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, y/o 190 (figura 1B). Una disposición lineal facilita mover la muestra y el desecho resultante y apuntar a través del tubo en una forma controlada. Una muestra biológica bruta puede entrar a través de una primera abertura 12 (Figura 2B) en un segmento 110 (Figura 1B) del túbulo. Luego, el desecho de la muestra procesada puede moverse de retorno hacia la primera abertura mientras que la diana se empuja hacia el extremo opuesto, minimizando de este modo la contaminación de la diana mediante inhibidores de reacción que pueden haberse unido a la pared del túbulo, y confinando la diana a un segmento limpio del túbulo que puede contener reactivos apropiados para posteriores operaciones de la diana. Algunas modalidades pueden utilizar una pluralidad de por lo menos tres segmentos, conteniendo cada uno por lo menos un reactivo. En algunas modalidades estos segmentos pueden contener reactivos en el orden siguiente: el reactivo en el segundo segmento puede ser un reactivo de lisis, una dilución o tampón de lavado, o un sustrato; el reactivo en el tercer segmento puede ser un sustrato, un reactivo de lisis, un tampón de lavado o un reactivo de neutralización; el reactivo en cuarto segmento puede ser un tampón de lavado, un tampón de suspensión, un reactivo de elución, o reactivos de amplificación y detección de ácido nucleico. En algunas modalidades los tres segmentos pueden disponerse

continuamente, mientras que en otras modalidades estos tres segmentos pueden separarse por otro segmento o segmentos intermedios.

5 En algunas modalidades puede incorporarse una puerta de presión 194 para cerrar y abrir de modo selectivo una segunda abertura, situada en el extremo distal del túbulo, para recoger los productos generados durante una prueba del túbulo para ulterior procesamiento, fuera del túbulo. En algunas modalidades esta segunda abertura puede situarse en un segmento 198 definido por dos puertas de presión 194 y 196, para almacenar un producto de los segmentos de procesamiento de muestras. En algunas modalidades puede proporcionarse una combinación de un sello rompible y una puerta de presión para transferir el contenido del túbulo a una segunda abertura.

10 En algunas modalidades un dispositivo de cierre de tubo para cerrar el tubo después de la entrada de muestra puede incluir una tapa 20 (figura 1B) y/o abrazadera 310. Una interfase o adaptador 52 entre la tapa y la primera abertura del túbulo flexible puede utilizarse para asegurar un sello seguro hermético. En una modalidad de ejemplo esta interfase puede ser fileteada y puede incluir características ahusadas 62 sobre la tapa y/o un armazón de tubo apropiadamente rígido 50 de modo que, cuando se sujetan entre sí, los filetes 64 pueden empeñar para coincidir las características ahusadas 62 entre el armazón de tubo y tapa para proporcionar un cierre apropiado. En esta modalidad de ejemplo la tapa puede requerir de $\frac{1}{2}$ a 1 giro completo para extraerse totalmente o unirse respecto al portatubo. La combinación de paso de rosca y ángulo ahusado en la junta puede seleccionarse para que ambos sean fácilmente manufacturados y proporcionen resistencia de retroalimentación para informar al usuario que se ha creado un sello efectivo. En otras modalidades el dispositivo de cierre de tapa puede incluir acoples de encaje acoples por presión y/o otros tipos de mecanismo de "giro y bloqueo" entre la etapa y el portatubo, y organizaciones similares en donde la tapa esté permanentemente unida al túbulo, tal como mediante abisagrado o atado de la tapa.

25 Tanto la tapa 20 como el armazón de tubo 50 pueden obtenerse de un plástico moldeado por inyección tal como polipropileno. El armazón de tubo 50 puede, a su vez, sujetarse al tubo flexible mediante un sello hermético permanente. La porción exterior de la tapa puede cubrirse con resaltes o sujeciones de dedos para facilitar su manipulación. Además, la tapa 20 puede incluir un área para unión de una marca o etiqueta de identificación de muestra. Como una alternativa adicional la tapa puede unirse directamente al primer tubo flexible de abertura a través de un encaje a presión o un collar que comprima la abertura del tubo flexible contra un saliente en la tapa para crear un sello hermético. El cierre entre la tapa de tubo y el portatubo puede ser anclado o guiado de modo que una herramienta de recogida 36 o características integradas en la tapa pueda orientarse de forma definitiva con respecto al tubo para facilitar el procesamiento de muestra y el aplanamiento del túbulo flexible. Además, la tapa puede incorporar características tales como un trinquete o mecanismo de seguridad similar para impedir que la tapa se extraiga después de haberse instalado en la abertura del tubo flexible.

35 La tapa 20 utilizada para cerrar el túbulo en algunas modalidades puede contener una cavidad 22 en su interior haciendo que el cuerpo de la tapa sea sustancialmente hueco. En algunas modalidades la porción hueca se extiende desde la parte superior del cuerpo de tapa hasta un orificio en la base del cuerpo de tapa. Para formar una cámara la parte superior de la cavidad puede ser cerrada fijando una cubrición sobre el cuerpo de tapa. La cubrición puede ser construida a partir de la misma pieza que el cuerpo de tapa. La tapa puede incorporar un orificio de aireación 26 o puede incorporar además una barrera de microbios, filtro o un material que se expande para cerrar el orificio de aireación cuando se expone a un líquido o temperatura específica. El fondo de la cámara puede ser abierta de izquierda o cerrada por un septo o válvula rompible. La cámara hueca puede incorporar además una membrana o septo flexible 24. Este septo flexible puede fabricarse utilizando moldeo por inmersión, moldeo de silicona de inyección líquida, moldeo por soplado, y/u otros métodos apropiados para la creación de estructuras elastoméricas delgadas. El septo flexible puede insertarse en el conjunto de la cavidad del cuerpo de tapa 22 para aislar de modo efectivo la porción interna del tubo del ambiente exterior después de disponer la tapa en posición sobre el tubo. El septo flexible puede diseñarse de modo que, en ausencia de presiones aplicadas exteriormente, su rigidez inherente asegura estar en un estado de deformación conocida preferido. Como modalidad adicional el septo flexible puede sustituirse por un embolo. En una modalidad de ejemplo un cuerpo de tapa de aproximadamente 30 mm de alto por 14 mm de diámetro puede moldearse por inyección de un termoplástico apropiado y contener una cavidad interna con por lo menos 500 μ L de volumen disponible. La cámara en el cuerpo de tapa puede adaptarse para fines útiles tales como retener o dispensar un reactivo, servir como un depósito para retener fluidos de desecho, servir como un espacio de retracción para una herramienta de recogida integrada, o una combinación de estos.

60 La tapa 20 puede tener una herramienta de recogida integrada 30 (figura 2B) tal como un hisopo, tubo capilar, gotero de líquidos, bucle de inoculación, jeringa, almohadilla absorbente, forceps, pala o stick para facilitar la recogida de líquido y muestras sólidas y su inserción en el túbulo. La herramienta de recogida se diseña para recoger y depositar una cantidad predeterminada de material en el tubo. Los reactivos pueden almacenarse sobre la propia herramienta de recogida. Por ejemplo, la herramienta de recogida puede incluir un hisopo impregnado con una sal seca de modo que cuando el hisopo se hidrata suspendería la sal fuera del hisopo en solución. Además la herramienta de recogida y tapa pueden diseñarse de modo que la porción de herramienta de recogida se retraiga en el cuerpo de tapa después de depositar la muestra en el túbulo para dejar los segmentos de túbulo sustancialmente desahogados.

La cámara 22 en la tapa puede configurarse para almacenar un reactivo. Para llevarlo a cabo, por ejemplo, la base de la cámara puede ser cerrada por un septo o válvula rompible (no mostrado) de modo que cuando se exprime la tapa, el septo se rompe para liberar el reactivo. Una característica de este tipo sería útil, por ejemplo, si la tapa se formara integralmente con una herramienta de recogida tal como un hisopo o stick. En este caso el reactivo liberado de la cámara de tapa podría utilizarse para lavar una muestra fuera de la herramienta de recogida a un segmento de tubo o disolver la muestra contenida sobre la herramienta de recogida. Los reactivos pueden también desprenderse de la cámara de tapa abriendo el septo rompible con el empleo de presión generada por la compresión de un segmento de tubo flexible para forzar fluido del tubo a la cámara de tapa. La cámara en la tapa puede configurarse para almacenar fluidos de desecho derivados del procesado dentro del túbulo. En una modalidad preferida la base de la cámara puede dejarse abierta de modo que cuando se conecta a la primera abertura del túbulo flexible se forma un paso de fluido entre el túbulo y la cámara. Cuando se mueve fluido en la cámara de tapa el septo flexible 24 contenido dentro puede moverse desde una posición inicial en ascenso de modo a acomodar el influjo de nuevo fluido. Este movimiento de septo puede facilitarse mediante la incorporación de un orificio de aireación 26 sobre la cubrición de cuerpo de tapa.

Después que se ha transferido fluido en la cámara de tapa una abrazadera 310 o actuador 312 puede actuar para comprimir el túbulo y sellar de modo efectivo el volumen de la cámara de tapa de los segmentos de túbulo. Como una modalidad alternativa, la cámara de tapa puede incorporar una puerta de presión o válvula de retención (no mostrada) para prohibir que flujo de fluido procedente de la cámara de tapa vuelva a los segmentos de tubo. Como una alternativa adicional el septo flexible puede omitirse incluyendo la cubrición de cámara de tapa una barrera de microbios para permitir el escape libre de gases contenidos pero que retenga todos los volúmenes de líquido y agentes infecciosos en el tubo. Como alternativa adicional el septo flexible puede sustituirse por un émbolo que se desplace axialmente en sentido ascendente para acomodar volúmenes de fluido adicionales transferidos desde los segmentos de tubo a la cámara de tapa. Otros métodos para acomodar desecho fluido dentro de la cámara de tapa pueden imaginarse fácilmente sin apartarse del alcance del presente invento.

Puede proporcionarse un armazón sustancialmente rígido 50 para soportar el túbulo flexible 10 apropiadamente diseñado constreñiendo por lo menos dos extremos distales del túbulo. En una modalidad de ejemplo puede proporcionarse un primer constreñimiento para unir permanentemente y sellar el túbulo al armazón entorno de la primera abertura del tubo. Este sello puede crearse soldando el túbulo flexible al armazón utilizando fuentes térmicas y/o ultrasónicas. Alternativamente el sello puede crearse utilizando una junta adhesiva fundible por calor con acetato de etilenvinilo, o formando una junta utilizando un epoxi curado por UV u otros adhesivos. En otras modalidades el túbulo puede sellarse mecánicamente o el inserto moldeado con el armazón. Una segunda limitación puede proporcionarse para unir y sellar el túbulo a la base del armazón. En una modalidad de ejemplo de esta segunda limitación este extremo del túbulo puede sellarse plano y unirse al armazón rígido mediante técnicas de soldadura térmicas y/o ultrasónicas. Alternativamente esta unión y sello puede formarse también utilizando adhesivo o medios mecánicos. En una modalidad alternativa el segundo sello puede ser similar al primer sello, estando sustancialmente abierto para facilitar el acceso al contenido del túbulo flexible desde la segunda abertura. Los materiales de túbulo y armazón pueden optimizarse para manufactura de juntas. Por ejemplo, el armazón puede obtenerse de polipropileno que tenga un punto de fusión inferior al del túbulo mas delgado para asegurar una fusión mas uniforme a través de una o mas zonas soldadas. Para facilitar la soldadura entre el túbulo y el armazón el área de unión puede ahusarse o de otro modo configurarse para incluir directores de energía u otras características comúnmente utilizadas para mejorar la prestación de la soldadura. En una modalidad de ejemplo el armazón rígido puede obtenerse de cualquier plástico apropiado mediante moldeo por inyección siendo sus dimensiones aproximadas de 150 mm de alto por 25 m de ancho.

El armazón rígido 50 puede incorporar varias características para facilitar la compresión y aplanamiento del tubo flexible. Por ejemplo, en una modalidad de ejemplo, el tubo flexible 10 puede ser constreñido solo en sus dos extremidades axiales para permitir la máxima libertad radial para evitar que dificulte del movimiento radial del túbulo cuando es comprimido. En otra modalidad la compresión puede ser facilitada incluyendo un área de desahogo en el armazón, cerca de la primera abertura del tubo. Esta área de desahogo puede utilizarse para facilitar la transición del túbulo flexible desde una forma sustancialmente comprimida en los segmentos de túbulo a una forma sustancialmente abierta en la primera apertura. Otras características útiles del armazón rígido que pueden facilitar la compresión del túbulo flexible pueden incluir un mecanismo de tensionado del túbulo integral. En una modalidad de ejemplo este mecanismo de tensión puede fabricarse mediante características de moldeo tal como resortes de tipo ballesta directamente en el armazón rígido para atraer el túbulo a uno de sus puntos de unión con el armazón.

El armazón rígido 50 puede facilitar la identificación del tubo, manipulación, carga de muestra e interactuar con la tapa de tubo. Por ejemplo, el armazón puede proporcionar área adicional para identificar el tubo a través de etiquetas o escritura 80 fijada a este. Los materiales plásticos del armazón pueden ser de color codificado con los materiales de la tapa para ayudar la identificación del aparato y su función. El armazón puede incorporar características especiales tales como cambios de espesor o claves para guiar su orientación en un instrumento receptor o durante la fabricación. El armazón puede interactuar con un manguito 90 o embalaje que cubra o proteja el túbulo flexible de daño por manipulación accidental, exposición a la luz y/o exposición al calor. El cuerpo del armazón rígido puede proporcionar también una estructura conveniente para soportar el tubo. El armazón puede tener una herramienta de recogida integral 32 tal como un deflector o deflector o pala para facilitar la recogida de

muestras en el aparato. El extremo receptor de muestras del armazón puede también incorporar una superficie interior ahusada o en forma de embudo para guiar la muestra recogida en el tubo flexible.

En algunas modalidades se contempla un método de extracción de ácidos nucleicos de muestras biológicas utilizando el aparato descrito en los párrafos precedentes. En ciertas modalidades la secuencia de eventos en un test de esta índole puede incluir: 1) una muestra biológica recogida con una herramienta de recogida, 2) un túbulo flexible, que puede incluir una pluralidad de segmentos que pueden contener los reactivos requeridos durante el test, y en donde la muestra recogida puede disponerse utilizando una primera abertura en el túbulo, 3) por lo menos un substrato que puede disponerse a una temperatura controlada y/u otras condiciones para capturar organismos diana o ácidos nucleicos durante un período de incubación fijado, 4) organismos o moléculas, en la muestra sin procesar que pueden no ligarse al substrato y de este modo pueden extraerse transfiriendo líquido a un depósito de desechos, 5) almacenar desechos, en un depósito de desechos, que puede segregarse de la diana mediante una abrazadera y/o actuador comprimido contra el túbulo, 6) un tampón de lavado, liberado de otro segmento del túbulo, que puede extraer inhibidores de reacción, 7) un reactivo de elución, de otro segmento, que puede liberar la diana unida al substrato después de incubación a una temperatura controlada, y 8) ácidos nucleicos que pueden detectarse mediante técnicas bien conocidas por los familiarizados en el arte o recogerse a través de una segunda abertura en el túbulo. En modalidades de ejemplo el flujo de la muestra puede ser desde la primera abertura hacia el extremo distal del túbulo a medida que progresa el test mientras que el flujo de desecho puede realizarse hacia la abertura de entrada de muestra cerrada del túbulo, en donde una cámara de desecho en la tapa del túbulo recibe el desecho para almacenamiento. Por consiguiente, se evita el contacto indeseable entre la muestra procesada y las superficies en un recipiente de reacción que ha sido tocado por la muestra sin procesar, impidiendo así la inhibición de reacción debido a cantidades de vestigio de inhibidores de reacción presentes en la muestra sin procesar y que podrían recubrir las paredes del recipiente de reacción.

Algunas modalidades pueden incorporar el uso de un tubo de ensayo 1, con un túbulo flexible dividido en una pluralidad de segmentos 16, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180 y/o 190, que pueden ser transversales al eje longitudinal del túbulo, y que pueden contener reactivos, tales como los reactivos 210, 221, 230, 240, 250, 260, 270, 280 y/o 290; así como un analizador, que puede tener una pluralidad de actuadores, tales como los actuadores 312, 322, 332, 342, 352, 3362, 372, 382 y/o 392, abrazaderas tales como las abrazaderas 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380 y/o 390, y bloques, por ejemplo 314, 344 y/o 394 (otros sin numerar para simplificar); oponiéndose los actuadores y abrazaderas, para procesar una muestra.

Se pueden utilizar varias combinaciones de estos actuadores, abrazaderas, y/o bloques para abrazar de modo efectivo el túbulo cerrado segregando por tanto fluido. En modalidades de ejemplo, por lo menos uno de los actuadores o bloques puede tener un elemento de control térmico para control de la temperatura del segmento de túbulo para procesado de muestras. El aparato de procesado de muestras puede tener además una fuente de campo magnético 430 apta para aplicar un campo magnético a un segmento. El aparato de procesado de muestras puede tener además un dispositivo de detección 492, tal como fotómetro o un CCD, para controlar una reacción que tenga lugar o se complete dentro del túbulo.

El uso combinado del tubo y el analizador puede facilitar muchas operaciones de procesado de muestras. La recogida de una muestra, tal como sangre, saliva, suero, tierra, biopsia de tejido, heces u otras muestras sólidas o líquidas, puede llevarse a cabo utilizando un utensilio de recogida de muestras 30 que puede ser incorporado en la tapa 20, o aspectos 32 sobre el armazón de tubo 50. Después de haberse recogido una cantidad apropiada de la muestra la tapa puede disponerse sobre la primera abertura del tubo para cerrar el tubo y depositar la muestra en el primer segmento. Después de esta etapa la muestra contenida en la herramienta de recogida puede separarse por lavado o resuspenderse con reactivos contenidos en cámaras separadas dentro de la tapa mediante compresión de una porción de la tapa. Luego el tubo puede cargarse en el analizador para ulterior procesado. Características de identificación, tales como código de barras o etiqueta RF pueden estar presentes sobre el tubo para designar la identidad de la muestra en forma que pueda leerse por el analizador y/o un usuario.

La apertura de un sello rompible de un segmento del túbulo puede llevarse a cabo aplicando presión al túbulo flexible para separar de forma irreversible las superficies unidas de la pared del túbulo. Puede utilizarse un actuador para aplicar la presión requerida para comprimir los segmentos de túbulo que contienen fluido para abrir un sello rompible. En modalidades en donde el segmento es delimitado por dos sellos rompibles, A y B. El analizador puede de preferencia romper el sello A protegiendo físicamente la región de sello B con un actuador o abrazadera para impedir que el sello B se rompa mientras se aplica presión al segmento para romper el sello A. Alternativamente, el sello A puede abrirse de preferencia aplicando presión al segmento adyacente al sello A en una forma precisa de modo que; el sello A se abre primero por la presión creada en el segmento adyacente; después que el sello A se rompe, la presión entre los dos segmentos cae sustancialmente debido al volumen adicional, combinado del segmento; la presión reducida en el segmento combinado es insuficiente para romper el sello B. Este método puede utilizarse para abrir sellos rompibles uno cada vez sin utilizar actuador protector y/o abrazadera. Como alternativa adicional la adherencia del sello A puede ser inferior a la del sello B de modo que el sello A puede romperse a una presión inferior que el sello B.

5 Un proceso para mover fluido de un segmento a otro segmento puede incluir, por ejemplo, liberar una abrazadera en un extremo del primer segmento, que comprende una abrazadera en el otro extremo del primer segmento, liberar un actuador en el segundo segmento y que comprende un actuador en el primer segmento para mover el líquido del primer segmento al segundo segmento. Alternativamente la abrazadera puede omitirse o abrirse después de liberar el actuador del segundo segmento.

10 Un proceso de mezcla de dos sustancias, en donde por lo menos uno es líquido, dispuesto en segmentos adyacentes puede llevarse a cabo: liberando la abrazadera entre los dos segmentos, moviendo el líquido contenido en el primer segmento, a través de un sello rompible abierto al segundo segmento; y comprendiendo alternativamente el segundo segmento y el primer segmento para fluir el líquido entre los segmentos.

15 Puede llevarse a cabo una agitación comprimiendo y descomprimiendo alternativamente un segmento tubular con un actuador, mientras que ambas abrazaderas que flanquean el actuador están comprimiendo el túbulo. En otra modalidad la agitación puede obtenerse moviendo alternativamente líquido entre por lo menos dos segmentos.

20 En realizaciones en donde un segmento de túbulo puede contener un líquido que tiene un volumen que excede el volumen requerido para un protocolo, un procedimiento de ajustar el volumen del líquido en el segmento puede ejecutarse: comprimiendo el segmento de túbulo para reducir el huelgo entre las paredes del túbulo para fijar el volumen del segmento hasta un nivel deseado y permitir que el líquido excedente fluya al segmento adyacente, pasando una abrazadera en el extremo del segmento o actuador adyacente; cierre del segmento de túbulo con la abrazadera o actuador, resultando en un volumen ajustado de líquido que queda en el segmento.

25 Un procedimiento para eliminar burbujas de aire puede incluir la agitación de un segmento que contiene líquido burbujeante. Otro procedimiento de suprimir burbujas de aire puede incluir agitar un primer segmento que contiene líquido mientras se cierra un segundo segmento; apertura del segundo segmento y mover el líquido del primer segmento al segundo segmento; agitar el segundo segmento y ajustar una posición del segundo actuador para mover la interfase líquido-aire en la proximidad o por encima del extremo superior del segundo segmento, abrazando luego el extremo superior del segundo segmento para formar un segmento totalmente líquido infundido sin burbujas de aire.

30 Un proceso de dilución puede llevarse a cabo utilizando el proceso de movimiento de líquido en donde uno de los segmentos incluye un diluyente y el otro incluye una sustancia que ha de diluirse.

35 Un proceso de reconstitución de un reactivo a partir de componentes secos y líquidos almacenados por separado en diferentes segmentos o sub-segmentos de túbulo puede incluir comprimir el segmento o sub-segmento de túbulo que contiene los componentes líquidos para abrir el sello rompible que conecta con el segmento de reactivo seco, mover el líquido en el segmento o sub-segmento de reactivo seco y mezclar el reactivo seco y componentes líquidos utilizando el proceso de mezclado.

40 La filtración puede llevarse a cabo utilizando un filtro 206 (figura 4^a) dispuesto entre dos segmentos o dos sub-segmentos. Por ejemplo, una muestra de sangre entera puede depositarse en un primer segmento con una bolsa de filtro. Puede seleccionarse un tamaño de poro del filtro para la filtración de células de sangre. Una abrazadera 300 puede luego cerrar el extremo del segmento opuesto a la bolsa de filtro y un actuador 302 puede comprimir el primer segmento para generar presión para conducir el flujo de plasma a través del filtro a un segundo segmento.

45 En otra modalidad, un reactivo de coagulación, agregación o aglutinación, tal como anticuerpo 204 contra antígenos superficiales de glóbulos rojos 202, un coagulado de glóbulos rojos, puede utilizarse para inducir la ligazón de glóbulos rojos-glóbulos rojos para formar grupos antes de la filtración. El tamaño de poro del filtro puede seleccionarse para bloquear los grupos mientras que permite que células no agregadas fluyan a su través. La aplicación de presión sobre el primer segmento que contiene grupos de glóbulos rojos y sangre puede enriquecer los

50 glóbulos blancos 208 en el segundo segmento.

55 En ciertas modalidades puede llevarse a cabo un proceso de molturación utilizando un actuador para comprimir y descomprimir alternativamente un segmento de túbulo que tiene una pared endurecida con una superficie interna a modo de microdientes 109 (figura 7A) y de este modo romper una muestra sólida, tal como muestra de tejido de biopsia, dentro del segmento de túbulo. En otra modalidad puede utilizarse pequeñas perlas de vidrio con la muestra sólida para mejorar la prestación de molturación. En otra modalidad una rueda de molturación 450 accionada por un motor 452 puede utilizarse para formar una molturación rotacional sobre la muestra en el segmento de túbulo y accionar el movimiento de perlas de vidrio y una muestra biológica 200 para mejorar la prestación de molturación. La temperatura de un reactivo líquido en el segmento puede seleccionarse de modo que

60 mejore el resultado de molturación.

65 La incubación del contenido en un segmento puede obtenerse ajustando el actuador correspondiente y/o temperatura de bloque y aplicando presión al segmento para asegurar un suficiente contacto superficial entre la pared del túbulo del segmento y el actuador y el bloque, y llevando el contenido del segmento de túbulo a sustancialmente la misma temperatura que la temperatura del actuador circundante y/o bloque. La incubación

puede conducirse en todas las condiciones del proceso mientras que las temperaturas de todos los segmentos implicados se fijen según se requiera.

5 La rápida rampa de temperatura para incubación puede obtenerse incubando un fluido en un primer segmento a una primera temperatura y fijando una segunda temperatura para un segundo segmento adjuntando el primer segmento, después flanqueantes de existir, para formar un canal para formar un canal de capa fina con un huelgo de alrededor de 1 a alrededor de 500 de terminar la incubación a la primera temperatura, se mueve rápidamente el líquido del primer segmento al segundo segmento y se incuba a la segunda temperatura.

10 Puede producirse un flujo que se conduce a través de un proceso de canal de flujo comprimiendo el túbulo con un actuador posicionado centralmente, y sus abrazaderas flanqueantes, de existir, para formar un canal de flujo de capa delgada con un huelgo de alrededor de 1 a alrededor de 500 μm , de preferencia de alrededor de 5 a alrededor de 500 μm a través del segmento. Los actuadores adyacentes comprimen suavemente sobre los segmentos adyacentes en comunicación de líquido con el canal de flujo para generar una presión interna defasada para asegurar un huelgo sustancialmente uniforme del canal de flujo de capa delgada. Los dos actuadores flanqueantes pueden luego comprimir alternativamente y liberar presión sobre el túbulo sobre sus respectivos segmentos para generar flujo a un ratio de flujo controlado. Puede incorporarse sensores de flujo opcional, presión y/o fuerza para facultar el control de bucle cerrado del comportamiento de flujo. El proceso de flujo-canal puede utilizarse en lavado, mejora de la eficiencia de ligazón del sustrato y detección.

20 Puede utilizarse un proceso de inmovilización de perla magnética y re-suspensión para separar las perlas del líquido de muestra. El campo magnético generado por una fuente magnética 430 (Figura 1B) puede aplicarse a un segmento 130 que contiene una suspensión de perlas magnéticas 230 para capturar e inmovilizar las perlas hacia la pared del tubo. Puede utilizarse un proceso de agitación durante el proceso de captura. En otra modalidad puede formarse un canal de flujo sobre el segmento con el campo magnético aplicado, y pueden capturarse perlas magnéticas bajo flujo para aumentar la eficacia de captura. Para la re-suspensión de perlas inmovilizadas, puede desconectarse el campo magnético o apagarse y puede utilizarse para re-suspensión un proceso de agitación o de canal de flujo.

30 Un proceso de lavado para eliminar desechos residuales e inhibidores de reacción de un sustrato puede llevarse a cabo utilizando tres etapas básicas primero un actuador puede comprimir un segmento que contiene el sustrato, tal como perlas inmovilizadas o una lámina, para eliminar sustancialmente líquido de este segmento. Segundo, puede moverse un tampón de lavado al segmento utilizando un proceso similar al de reconstitución de un reactivo a partir de componentes secos y líquidos. Para sustratos a base de perlas puede utilizarse un proceso de re-suspensión de perlas seguido de recaptura de perlas sobre la pared del túbulo. Tercero, después de un proceso de mezcla o agitación el actuador puede comprimir el segmento para eliminar el líquido de lavado utilizado del segmento. En otra modalidad puede formarse un canal de flujo en el segmento que contiene un sustrato, que puede ser perlas inmovilizadas o una lámina. Se genera a través del canal de flujo con el sustrato un lavado de flujo unidireccional, que tiene características laminares. Por último todos los actuadores y abrazaderas, de existir, pueden cerrarse para eliminar sustancialmente todo el líquido de los segmentos. En una modalidad adicional puede utilizarse una combinación del lavado basado en dilución y el lavado basado en flujo laminar para la mejora adicional de la eficacia del lavado.

45 La lisis puede obtenerse calentando una muestra a una temperatura fijada o utilizando una combinación de calor ya gentes químicos para romper membranas de células abiertas, paredes de célula o partículas de virus sin recubrir. En otra modalidad la lisis puede obtenerse utilizando un reactivo químico, tal como proteinasa K, y una solución de sal caotrópica. Dichos reactivos químicos pueden almacenarse en uno o más segmentos de túbulo y combinarse con la muestra utilizando los procesos antes descritos. En algunas modalidades pueden combinarse procesos múltiples tales como lisis de células químicas, molturación mecánica y calentamiento, para romper muestra sólida, por ejemplo tejido recogido de biopsia, para maximizar la prestación.

50 La captura de micro-organismos diana puede obtenerse utilizando un sustrato. En una modalidad la superficie del sustrato puede recubrirse con por lo menos un reactivo de unión, tal como un anticuerpo, ligando o receptor contra un antígeno, receptor o ligando sobre la superficie del organismo diana (ASA), un ácido nucleico (NA), un ácido nucleico peptídico (PNA) y fosfotioato (PT) sonda de ácido nucleico para capturar una secuencia diana de ácido nucleico específica complementaria a la sonda o un organismo diana. En otra modalidad la superficie puede seleccionarse para que tenga, o se recubre para formar, una superficie cargada electrostáticamente (CE), tal como superficie recubierta de resina de intercambio de sílice o iones, para capturar de forma reversible sustancialmente solo ácidos nucleicos. En algunas modalidades el sustrato puede pre-embalsarse en un segmento tubular o sub-segmento en formato seco, y puede empaquetarse en otro segmento un tampón de ligazón de líquido. El sustrato y el tampón puede reconstituirse utilizando los procesos antes citados.

65 En algunas modalidades puede utilizarse un reactivo de un segmento contiguo para diluir la muestra antes de incubación con el sustrato. En algunas modalidades el organismo diana puede capturarse por el sustrato antes del lavado de los microorganismos; mientras que en otras modalidades puede llevarse a cabo una etapa de lisis antes de la etapa de captura de dianas. En modalidades preferidas la incubación del sustrato en agitación puede

llevarse a cabo a una temperatura deseada, por ejemplo, a 4°C para captura de bacterias vivas, o temperatura ambiente para captura viral. La captura puede ser seguida de un proceso de lavado para eliminar los residuos y componentes indeseados de la muestra del segmento de túbulo.

5 En algunas modalidades pueden utilizarse perlas magnéticas como el sustrato para la captura de dianas y puede utilizarse un proceso de inmovilización de perlas magnéticas y re-suspensión para separar las perlas del líquido de muestra. En otras modalidades en donde el sustrato puede ser una almohadilla 30 o una lámina 214 (Figuras 5A-B), el sustrato 30 y 214 puede incorporarse en la herramienta de recogida 36 y/o puede adherirse sobre la pared del túbulo en un segmento.

10 La elución puede obtenerse mediante calentamiento y/o incubación del sustrato en una solución en un segmento de túbulo a una temperatura elevada. Las temperaturas preferidas para elución son de 50°C a 95°C. En otra modalidad la elución puede obtenerse cambiando el pH de la solución en donde se suspende o embebe el sustrato. Por ejemplo, en una modalidad de ejemplo el pH de la solución de lavado puede estar comprendida entre 4 y 5,5 mientras la del tampón de elución puede estar entre 8 y 9.

15 Un proceso de germinación de esporas puede conducirse mezclando una muestra que contiene esporas bacterianas con solución de germinación e incubando la mezcla a una condición apropiada. La solución germinante puede contener por lo menos una de L-alanina, inosina, L-fenilalanina, y/o L-prolina así como cierto medio de crecimiento rico para permitir crecimiento parcial de las células pre-vegetativas liberadas de las esporas. Las temperaturas de incubación preferidas para la germinación oscilan entre 20°C y 37°C. Con el recubrimiento del sustrato con un anticuerpo anti-esporas, pueden enriquecerse selectivamente células vegetativas a partir de una muestra que contiene esporas vivas y/o muertas. Las esporas vivas pueden liberar una pluralidad de células vegetativas del sustrato, que puede luego procesarse para detectar secuencias de ácido nucleico características de las especies bacterianas. En algunas modalidades la solución germinante puede absorberse en una almohadilla.

20 En ciertas modalidades pueden procesarse adicionalmente ácidos nucleicos extraídos de muestras biológicas amplificando los ácidos nucleicos con el empleo de por lo menos un método del grupo reacción de cadena de polimerasa (RCP), replicación en círculo rodante (RCA), reacción de cadena de ligasa (LCR), amplificación mediada por transcripción (AMT), amplificación basada en secuencia de ácido nucleico (ABSAN) y reacción de amplificación de desplazamiento filamentos (SDAR). En algunas modalidades los ácidos nucleicos extraídos del organismo pueden ser ácidos ribonucleicos (ARN) y su procesamiento puede incluir una transcripción inversa acoplada y reacción de cadena de polimerasa (RT-PCR) utilizando combinaciones de enzimas tales como *Tth* polimerasa y *Taq* polimerasa o transcriptasa inversa y *Taq* polimerasa. En algunas modalidades sondas de ácido nucleico de mella circular pueden circularizarse utilizando T4 ADN ligasa o Ampligase^R y ácidos nucleicos de guía, tales como objetivos ADN o ARN, seguido de la detección de la formación de sondas circularizadas cerradas después de un proceso de sección *in Vitro*. Esta detección puede realizarse a través de PCR, TMA, RCA, LCR, NASBA o SDAR utilizando enzimas conocidas por los familiares con el arte. En modalidades de ejemplo la amplificación de los ácidos nucleicos puede detectarse en tiempo real utilizando sondas de ácido nucleico con etiquetado fluorescente o ADN intercalando colorantes así como un fotómetro o dispositivo acoplado con carga en el analizador molecular para detectar el aumento en fluorescencia durante la amplificación de ácido nucleico. Estas sondas etiquetadas fluorescentemente usan esquemas de detección bien conocidos por lo familiarizados con el arte (o sea, TaqMan^R, molecular beacons^R sondas de transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET), sondas scorpion^R) y generalmente uso de atrapamiento de fluorescencia así como la liberación de transferencia de energía de atrapamiento o fluorescencia de un reportero a otro para detectar la síntesis o presencia de ácidos nucleicos específicos.

40 Una detección en tiempo real de una señal procedente de un segmento de túbulo puede obtenerse utilizando un sensor 492 (Figura 1B), tal como un fotómetro, un espectrómetro, un CCD, conectado a un bloque, tal como el bloque 490. En modalidades de ejemplo puede aplicarse presión mediante un actuador 392 sobre el segmento de túbulo 190 para definir apropiadamente la forma del segmento de túbulo. El formato de la señal puede ser una intensidad de una luz en cierta longitud de onda, tal como una luz fluorescente, un espectro, y/o una imagen de células o elementos sintéticos tal como puntos cuánticos. Para la detección fluorescente puede utilizarse una excitación de luz del sistema óptico para iluminar una reacción, y puede detectarse mediante el fotómetro una emisión de luz. Para detectar una pluralidad de señales que tengan longitudes de onda específicas, pueden detectarse en serie o en paralelo señales de longitud de onda diferentes mediante canales de detección dedicada o un espectrómetro.

50 Los dispositivos y métodos descritos pueden aplicarse ampliamente como muchas otras aplicaciones de prueba de muestras biológicas. Ácidos nucleicos aislados de muestras de biopsia de tejido que circundan tumores extraídos mediante un cirujano pueden utilizarse para detectar tejidos pre-cancerosos. En estas aplicaciones pueden detectarse mutaciones de puntos calientes en genes supresores de tumor y proto-oncogenes utilizando técnicas de genotipos bien conocidas por los familiarizados con el arte. Los tejidos precancerosos tienen con frecuencia mutaciones somáticas que puede identificarse fácilmente comparando el resultado de la prueba de genotipo con la muestra de la biopsia para el genotipo del paciente utilizando sangre entera como fuente de ácidos nucleicos. Pueden utilizarse ácidos nucleicos aislados de glóbulos blancos para detectar variantes genéticas y mutaciones de

línea germinal utilizando técnicas genéticas bien conocidas con los familiarizados con el arte. Ejemplos de estas mutaciones son los aproximadamente 25 mutantes conocidos del gen CFTR recomendado para la diagnosis prenatal por el American College of Medical Genetics y el American College of Obstetricians and Gynecologists. Ejemplos de variantes genéticas son alelos de alta frecuencia en dehidrogenasa de glucosa-6-fosfato que influencia sensibilidad para agentes terapéuticos, como el medicamento antimaliárico Primaquine.

Otro ejemplo de variaciones genéticas con relevancia clínica son alelos que pertenecen a riesgos incrementados de condiciones patológicas, como el alelo de Factor V Leiden y el riesgo incrementado de trombosis venosa. Ácidos nucleicos aislados de bacterias pueden utilizarse para detectar secuencias que codifican genes para evaluar la patogenicidad de una cepa bacteriana. Ejemplos de estos genes son el Factor Letal, el Antígeno Protector A, y los genes de factor de Edema sobre el plásmido PXO1 de *Bacillus anthracis* y el antígeno Capsular A, B, y C sobre el plásmido PXO2 del *B. Anthracis*. La presencia de estas secuencias permite que los investigadores distingan entre *B. Anthracis* y bacterias inofensivas de la tierra. Los ácidos nucleicos aislados de virus ARN pueden utilizarse para detectar genes que codifican secuencias para detectar la presencia o ausencia de un virus o cuantificar un virus para guiar el tratamiento terapéutico de individuos infectados.

Una utilidad particularmente significativa de estos ensayos es la detección del virus de inmunodeficiencia humano (VIH), para guiar terapia anti-retroviral. Los ácidos nucleicos aislados de virus de ADN pueden utilizarse para detectar secuencias que codifican genes para detectar la presencia o ausencia de un virus en la sangre antes de su empleo en la fabricación de productos derivados de la sangre. La detección del virus de hepatitis B en piletas de muestras de sangre es un ejemplo bien conocido de esta utilidad para los familiares en el arte. La presencia de verotoxina *Escherichia coli* en carne molida de vacuno es un buen ejemplo del potencial de usos agrícolas del aparato. La detección del virus Norwalk sobre superficies es un ejemplo de una aplicación de control del ambiente de salud pública.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Aislamiento de ADN genómico y detección de sangre completa

El aislamiento de ADN y detección de secuencia de ADN puede llevarse a cabo en un tubo 1 (figura 1b), que incluye un túbulo flexible 10 que tiene nueve segmentos separados por sellos removibles y que contienen reactivos pre-empaquetados, y una tapa 20, que tiene un depósito de desecho 22 alojado en esta. El primer segmento 110 del túbulo puede recibir la muestra de sangre completa. El segundo segmento puede contener tampón de dilución con 40 μ l de solución salina fosfatada (SSF) 221 (que puede contener 137 mM de NaCl, 2,7 mM DE KCL, 4,3 mM de Na_2HPO_4 , 1,4 mM de KH_2PO_4 , PH 7,3) y 250 μ g de proteinasa seca K 222, que puede alojarse en un sub-segmento 121 y dos 122 respectivamente, separado por un sello desprendible 125. El tercer segmento 130 puede contener 50 μ l de tampón de lisis 230 que puede contener sales caotrópicas que pueden contener 4,7 M de clorhidrato de guanidinio, 10 mM de urea, 10mM de GTris HCl, pH 5,7, y 2% de tritón X-100. El cuarto segmento 140 puede contener 500 mg de perlas de sílice magnéticas 240, tales como perlas MagPrep^R (Merck & Co), suspendidas en 80 μ l de isopropanol. Estas perlas pueden ligar DNA en presencia de sales caotrópicas y alcohol. El quinto segmento 150 puede contener 80 μ l de tampón de lavado 250 (que puede contener etanol al 50%, 20 mM de NaCl, 10 mM de Tris HCl, pH7,5). El sexto segmento 160 puede contener 80 μ l 20mM de ácido 2-morfolinoetansulfónico (MES) tampón 260, PH 5,3. El pH del tampón MES puede ajustarse de modo que pueda ser lo suficientemente bajo para evitar la elución del ADN de las perlas. El séptimo segmento 170 puede contener 80 μ l de tampón de elución 270 (10 mM de Tris HCl, pH 8,5: un ejemplo de un tampón apropiado para PCR). El pH del tampón de elución puede ajustarse de modo que pueda ser lo suficientemente alto para eluir el DNA de la superficie de las perlas en el tampón. El octavo segmento 180 puede contener uracil-N-glicosilasa seca (ING) 280. El noveno segmento 190 puede contener reactivos PCR secos 290 (que pueden contener 10 mmol de cada uno de los trifosfatos deoxinucleótidos (dNTPs): trifosfato de deoxiadenosina (dATP), trifosfato de deoxicitosina (dCTP) y trifosfato de deoxiguanosina (dGTP); 20 nmol de trifosfato de deoxiuridina (dUTP), 2,5 μ mol de KCl, 200 nmol de MgCl_2 , 1-5 unidades de polimerasa de ADN Taq, y 20-100 pmol de cada uno de los cebadores oligonucleótidos, y 6-25 pmol de sonda TaqMan). El extremo 194 del segmento 190 puede sellarse de forma permanente o contener una puerta de presión para recoger los productos de la reacción de amplificación para confirmar los resultados de una prueba de genotipado mediante secuenciación de ADN o alguna otra prueba conocida por los expertos en el arte.

1. *Lisis de muestra.* Todas las abrazaderas, excepto la primera abrazadera 310, pueden cerrarse sobre el túbulo. El primer actuador 312 puede comprender el primer segmento 110 para ajustar el volumen de sangre 210 para retener alrededor de 10 μ l en el segmento, y luego la primera abrazadera 310 puede comprimir el túbulo para cerrar el segmento. El segundo actuador 322 puede luego comprimir el segundo segmento 120 (subsegmentos 121 y 122) para romper el sello desprendible 125 y mezcla PBS 221 con proteinasa K 222. La segunda abrazadera 320 puede luego abrirse y el segundo actuador puede comprimir el segundo segmento para abrir el sello desprendible. El primer y segundo actuadores pueden además comprimir alternativamente los segmentos para mezclar el tampón de dilución con la muestra de sangre. El analizador puede cerrar el primer actuador 312 y la segunda abrazadera 320 para mover la muestra diluida al segundo segmento 120, y mover la tercera abrazadera 330 para abrir el actuador 322 y 332 para comprimir alternativamente los segmentos de túbulo 130 y 120 para abrir el sello desprendible entre

los segmentos para mezclar el tampón de lisis 230 con la muestra diluida, e incubar la mezclas a 50°C durante 5 minutos. La temperatura de incubación puede mantenerse mediante contacto entre el túbulo y los elementos térmicos incorporados dentro de los actuadores y/o bloques opuestos a los actuadores.

5 2. *Captura de ácido nucleico.* Después de incubación la cuarta abrazadera 340 puede abrirse y el cuarto actuador 342 puede comprimir el cuarto segmento 140 para abrir el sello removible y mezclar las perlas de sílice magnéticas suspendidas en isopropanol 240 con el lisado en los segmentos 130 y 120. Los actuadores 322 y 332 con un actuador adyacente 312 o 342 pueden comprimir alternativamente sus segmentos respectivos para agitar e incubar la mezcla durante 5 minutos a temperatura ambiente para facilitar que el ADN se ligue a las perlas de sílice magnéticas. Luego puede generarse un campo magnético mediante una fuente magnética 430 cerca del segmento 10 130 para capturar las perlas en suspensión. El actuador 322 y 332 puede comprimir alternadamente el segmento 120 y 130 para capturar perlas. Como alternativa el actuador 332 puede comprimir el segmento 130 para formar un canal de flujo, y dos actuador flanqueantes 322 y 342 pueden comprimir sus respectivos segmentos alternadamente para aumentar la eficacia de captura. Sustancialmente todas las perlas pueden inmovilizarse sobre la pared del 15 segmento 130, luego los actuadores y abrazaderas del actuador 342 a la abrazadera 310 pueden abrirse y cerrarse de forma secuencial para mover la muestra no ligada y desecho al depósito de desecho 22.

3. *Lavado.* Un proceso de lavado puede seguir al proceso de captura con el fin de eliminar desechos residuales e inhibidores de reacción de las perlas y los segmentos debieran utilizarse para ulterior procesado de muestras. En esta modalidad puede utilizarse un lavado a base de dilución con el tampón de lavado de etanol y puede utilizarse un lavado a base de flujo de capa delgada con el tampón de lavado MES. Las abrazaderas 350 y el actuador 342 pueden abrirse primero y luego el actuador 352 puede cerrarse para mover el tampón de etanol 250 al segmento 20 240, seguido del cierre de la abrazadera 350. Con el empleo del mismo procedimiento sobre los segmentos 140 y 130, puede moverse el tampón de etanol al segmento 130. Puede eliminarse el campo magnético; el actuador 332 y por lo menos un actuador adyacente pueden comprimirse alternadamente contra sus respectivos segmentos para generar flujo para resuspender las perlas. El campo magnético puede luego activarse para capturar sustancialmente todas las perlas y el líquido puede llevarse al depósito de desechos utilizando los procesos antes indicados. Después de completar el primer lavado puede moverse el tampón de lavado MES del segmento 160 al 140. El actuador 332 y abrazadera 340 y 330 pueden soltarse suavemente para formar un canal de flujo de capa delgada a través del segmento 130. El actuador 342 puede comprimirse suavemente sobre el segmento 140 para generar cierta presión interna para asegurar un huelgo sustancialmente uniforme del canal de flujo de capa delgada. El actuador 342 puede luego comprimir suavemente el túbulo, y el actuador 322 puede liberar el túbulo para asegurar un flujo esencialmente laminar del tampón de lavado a través del canal de flujo. Cuando se completa el lavado pueden cerrarse los actuadores y mordazas y moverse todo el desecho al depósito de desechos 22. 25 30 35

4. *Elución de ácido nucleico.* El tampón de elución 270 puede luego moverse del segmento 170 al 130 utilizando un procedimiento similar al antes indicado. El campo magnético puede eliminarse y las perlas pueden resuspenderse en el tampón de elución y bajo flujo entre los segmentos 130 y 140. La suspensión de perlas puede incubarse a 40 95°C bajo flujo estacionario o condiciones de agitación durante 2 minutos. El campo magnético puede activarse y sustancialmente todas las perlas pueden inmovilizarse, y la solución de ácido nucleico eluido puede moverse al segmento 170 mediante abertura secuencial y cierre de los actuadores y abrazaderas. El actuador 372 puede comprimir el segmento 170 para ajustar el volumen de la solución de ácido nucleico a 50 µl y luego puede cerrarse la abrazadera 370 contra el túbulo para completar el proceso de extracción de ADN.

5. *Amplificación y detección de ácido nucleico.* La solución de ácido nucleico puede luego transferirse al segmento 45 180, se mezcla y se incuba con UNG 280 a 37° durante 5 minutos para degradar cualquier producto PCR contaminante que pueda haber estado presente en la muestra biológica. Después de la incubación la temperatura puede aumentarse hasta 95°C para desnaturalizar ADN y UNG durante 2 minutos. La solución de ácido nucleico puede luego ser transferida al segmento 190, y se mezcla con reactivo PCR 290 a 60° C para iniciar el comienzo en caliente de PCR. Un ensayo de amplificación típico de temperatura-2 de 50 ciclos de 95°C durante 2 segundos y 60°C durante 15 segundos puede llevarse a cabo fijando el segmento 180 a 95°C y el segmento 190 a 60°C, y transfiriendo la mezcla reaccional entre los segmentos de forma alternativa cerrando y abriendo el actuador 382 y 392. Un ensayo de amplificación de temperatura-3 típico de 50 ciclos de 95°C durante 2 segundos, 60°C durante 10 segundos y 72°C durante 10 segundos puede conducirse fijando el segmento 170 a 95C, el segmento 180 a 72°C y el segmento 190 a 60°C, y transfiriendo alternativamente la mezcla reaccional entre los segmentos cerrando y abriendo los actuadores 372, 382 y 392. Puede montarse un sensor de detección 492, tal como un fotómetro, sobre el bloque 394 para controlar la emisión de fluorescencia en tiempo real procedente del colorante reportero a través de una porción de la pared del túbulo. Después de completar un ensayo los resultados de prueba pueden ser reportados y la muestra puede transferirse al segmento 198 a través de la puerta de presión 194 mediante la 50 55 60 compresión del segmento 190 para ulterior procesado.

Se cargaron diez microlitros de sangre entera humana tratado con ácido tetraacético de etilendiamina (EDTA) recién preparado en un tubo de muestras pre-empaquetado y se procesó en un analizador como se describe en el texto. La detección se llevó a cabo con una sonda TaqMan Minor Groove Binder etiquetada VIC^R complementaria al gen hemocromatosis (HFE) de tipo salvaje y una sonda de ligante TaqMan Minor Groove etiquetada FAM complementaria al mutante C282Y. La figura 8 muestra los resultados de tres experimentos independientes y un 65

control negativo en donde se omitió el ADN molde. Como estas muestras contuvieron solo alelos HFE de tipo salvaje solo se muestran vestigios de fluorescencia VIC.

Ejemplo 2. Aislamiento de ADN genómico y detección de muestra de hisopo

El aislamiento de ADN y la detección de la secuencia de ADN puede llevarse a cabo en un tubo 1, incluyendo un túbulo flexible 10 que tiene nueve segmentos separados mediante sellos removibles y conteniendo reactivos preenvasados, y una tapa 20, que tiene un depósito de desechos 22 alojado en esta y adicionalmente un hisopo que sobresale de la abertura de la tapa. Todos los reactivos pre-empaquetados pueden ser idénticos a los del ejemplo 1, a excepción de que un sub-segmento 121 del segundo segmento 120 puede contener 50µl de tampón de dilución PBS.

El hisopo de la tapa 20 puede utilizarse para recoger una muestra de la cavidad oral, una superficie, u otras muestras desinfectables conocidas por el experto en el arte. Después de la recogida la tapa puede casar con el túbulo, introduciendo la muestra del hisopo en el primer segmento 110. El túbulo puede luego insertarse en un analizador. Todas las abrazaderas, excepto la primera abrazadera 310 pueden cerrarse sobre el túbulo. El segundo actuador 322 puede comprimir el segundo segmento 120 (subsegmentos 121 y 122) para romper el sello desprendible 125 y mezclar PBS 221 con proteinasa K 222. Luego puede abrirse la segunda abrazadera 320 y el segundo actuador comprime el segundo segmento para abrir el sello removible y mover el PBS y los reactivos de proteinasa K al primer segmento 110. La abrazadera 320 puede cerrarse y el primer actuador 312 se comprime y libera alternadamente para eluir la muestra del hisopo de la punta del hisopo. Después de eluirse la muestra el primer actuador 312 puede comprimir el primer segmento 110 y la abrazadera 320 y segundo actuador 322 pueden abrirse para permitir la transferencia de la muestra eluída al segundo segmento. El segundo actuador 322 puede luego comprimir el segundo segmento 120 para ajustar el volumen de muestra eluída hasta alrededor de 50 µl, y la segunda abrazadera 320 puede luego comprimir el túbulo para cerrar el segmento. Todas las etapas de procesado de muestra subsiguientes son similares a las descritos en el ejemplo 1.

Un hisopo estéril con punta de rayón (Copan Italia) se raspó contra el interior de la mejilla de donador para recoger células epiteliales bucales. El hisopo se sumergió en 20µl de PBS y se agitó enérgicamente para suspender células. Se cargaron diez microlitros de células suspendidas en túbulo de muestra pre-empaquetado y se procesó en un analizador como se describe en el texto. La detección se llevó a cabo con sonda TaqMan Minor Groove Binder etiquetada VIC complementaria con el gen HFE tipo salvaje, y una sonda etiquetada FAM complementaria con el mutante 282Y del gen HFE (figura 9).

Ejemplo 3. Aislamiento de ADN bacteriano de plasma

El aislamiento de ADN y detección de secuencia de ADN de plasma puede llevarse a cabo en un tubo 1, incluyendo un túbulo flexible 10 que tiene nueve segmentos separados por sellos removibles y que contienen reactivos pre-empaquetados, y una tapa 20, que tiene un depósito de desechos 22 alojado en ésta. Todos los reactivos pre-empaquetados pueden ser idénticos a los del ejemplo 1, excepto que el sub-segmento 121 del segundo segmento 120 puede contener 50µl de tampón de dilución PBS, el tercer segmento 130 puede contener 100µl de tampón de lisis 230, y el cuarto segmento 140 puede contener 500 µg de perlas magnéticas de sílice suspendidas en 130 µl de isopropanol. Para detección de ADN bacteriano, sobre 10 µl de plasma puede cargarse dentro el primer segmento 110. La muestra puede procesarse utilizando los reactivos pre-empasados con los pasos de procesado de muestras descritos en el ejemplo 1.

Se diluyen aproximadamente 10⁵ células de *E. coli* 0157:H7 hasta un volumen de 10 µl en plasma humano utilizado para el ensayo. La extracción y detección de ADN se llevó a cabo en el analizador como se ha descrito. Se utilizó para la detección una sonda etiquetada FAM que reconoce el gen *Stx1* de 0157:H7. La figura 19 muestra los resultados con un control negativo en donde se omitió *E. Coli* 0157:H7 ADN.

Ejemplo 4. Aislamiento de ARN viral y detección de plasma

El aislamiento de ARN y detección de la secuencia de ARN de plasma puede llevarse a cabo en un tubo 1, incluyendo un túbulo flexible 10 que tiene nueve segmentos separados por sellos removibles y que contienen reactivos pre-empaquetados, y una tapa 20 que tiene un depósito de desechos 22 alojado en ésta. Todos los reactivos pre-empaquetados pueden ser idénticos a los del ejemplo 3, a excepción de que el cuarto segmento 140 puede contener una membrana de sílice, lámina de sílice, malla de fibra de sílice dimensionado para acoplarse enteramente dentro del segmento, así como 130 µl de isopropanol; y el noveno segmento 190 puede contener reactivos de RT-PCR 290 que pueden incluir 10 nmol de cada uno de; dATP, dCTP y dGTP; 20 nmol dUTP, 2,5 µmol de KCl, 200 nmol de MgCl₂, 1-5 unidades de *Tth* ADN polimerasa, y 20-100 pmol de cada uno de los oligonucleótidos cebador, y 6-25 pmol de sonda TaqMan, con o sin 1-5 unidades de Taq ADN polimerasa.

Para aislamiento y detección de ácido nucleico viral, sobre 50 µl de plasma puede cargarse el primer segmento 110. La muestra puede luego procesarse utilizando los reactivos pre-empaquetados con las etapas de procesado de

muestras descritas en el ejemplo 1, con la excepción de una etapa de captura de ácido nucleico modificado y una etapa de transcripción inversa adicional. Para la etapa de captura de ácido nucleico puede abrirse la abrazadera 340 y el cuarto actuador 342 puede comprimir el cuarto segmento 140 para abrir el sello desprendible y dejar que el lisado 230 entre en contacto con la membrana de sílice en isopropanol 240 en el segmento 130. Los actuadores 332 y 342 pueden comprimir alternadamente sus segmentos respectivos para agitar e incubar la mezcla durante 5 minutos a temperatura ambiente para facilitar la ligazón de ácido nucleico a la membrana de sílice. Después de la captura de ácido nucleico el actuador 342 puede comprimir el segmento 140 y el desecho líquido puede moverse al depósito de desechos. La abrazadera 330 puede cerrarse y los actuadores 332, 342 y 352 pueden formar un canal de flujo en los segmentos 130, 140 y 150 para permitir que el etanol lave el tampón para lavar el sustrato. Todas las etapas de procesamiento de muestras subsiguientes pueden ser las mismas que en el ejemplo 3. La etapa de transcripción inversa adicional puede producirse antes de la amplificación de PCR e incluye incubación del ARN extraído con reactivos RT-PCR en el noveno segmento 190 a 65°C durante 10 minutos.

Ejemplo 5. Aislamiento de ADN bacterial y detección de sangre entera

El aislamiento de ADN y detección de secuencia de ADN de sangre entera puede llevarse a cabo en un tubo 1, incluyendo un tubo flexible 10 que tiene nueve segmentos separados por sellos desprendibles y que contiene reactivos pre-empaquetados y una tapa 20 que tiene un depósito de desechos 22 alojado. El sub-segmento 21 del segundo segmento 120 puede contener 50 µl de tampón de dilución PBS, el tercer segmento 130 puede contener 100 µl de tampón de lisis 230, y el cuarto segmento 140 puede contener 10 µl de perlas magnéticas tales como Dynabeads^R (DynaL Biotech), conjugado para 10⁴ a 10⁷ copias de una sonda de ácido nucleico peptídico (APN), suspendido en tampón de hibridación (100 µl) de SXSSC/0,1 M EDTA. Todos los otros reactivos pre-empaquetados pueden ser los mismos que se ha descrito en el ejemplo 1.

Para aislamiento y detección de ácido nucleico bacteriano puede cargarse, en el primer segmento 110, 50 µl de sangre entera. La muestra puede luego procesarse utilizando los reactivos pre-empaquetados con las etapas de procesamiento de muestras descritas en el ejemplo 1, con la excepción de una etapa de captura de ácido nucleico modificado. Para la etapa de captura de ácido nucleico se abre la cuarta abrazadera 340 y el cuarto actuador puede comprimir el cuarto segmento 140 para abrir el sello desprendible y mezclar las perlas magnéticas acopladas a PNA suspendidas en tampón de hibridación 240 con el lisado en el segmento 130. Los actuadores 322 y 332 con un actuador adyacente 312 o 342 pueden comprimir alternadamente sus respectivos segmentos para agitar e incubar la mezcla durante 15 minutos a temperatura ambiente para facilitar la hibridación del ADN a las sondas de PNA acopladas a las perlas magnéticas. La muestra puede luego procesarse utilizando los reactivos preempaquetados con las etapas de procesamiento de muestras descritas en el ejemplo 1.

Ejemplo 6. Aislamiento de ARN viral y detección de sangre entera.

El aislamiento de ARN viral y detección de secuencia de ARN de plasma puede llevarse a cabo en un tubo 1, incluyendo un tubo flexible 10 que tiene nueve segmentos separados por sellos desprendibles y conteniendo reactivos pre-empaquetados, y una tapa 20 que tiene un depósito de desechos 22 alojado. Todos los reactivos pre-empaquetados pueden ser idénticos a los del ejemplo 5, excepto que el noveno segmento 190 puede contener reactivos RT-PCR secados 290 que pueden incluir 10 mmol de cada uno de dATP, dCTP y dGTP, 20 mmol de dUTP, 25 µmol de KCl, 200 nmol de MgCl₂, 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa, 1-5 unidades de *Tth* ADN polimerasa, y 20-100 pmol de cada uno de los cebadores oligonucleótidos, y 6-25 pmol de sonda Taq-Man. Para aislamiento y detección de ARN viral se carga sobre 50 µl de sangre entera en el primer segmento 110. La muestra puede luego procesarse utilizando los reactivos preempaquetados con las etapas de procesamiento de muestras descrito en el ejemplo 1, con la excepción de una etapa de transcripción inversa adicional, antes de amplificación, en donde se incuba el ARN extraído con reactivos de RT-PCR en el noveno segmento 190 a 65°C durante 10 minutos.

Ejemplo 7. Aislamiento bacteriológico utilizando enriquecimiento inmunomagnético de sangre entera

El aislamiento de ADN bacterial y detección de secuencia de ADN de sangre entera puede llevarse a cabo en el tubo 1, incluyendo un tubo flexible 10 que tiene nueve segmentos separados por sellos desprendibles y que contienen reactivos pre-empaquetados, y una tapa 20, que tiene un depósito de desechos 22 alojado. El segundo segmento 120 puede contener perlas magnéticas, tales como Dynabeads, revestidas con un anticuerpo de captura específico para epítipo bacteriano. El tercer segmento 130 puede contener 100 µl de tampón PBS 230 utilizado para controlar el pH de la muestra y diluir la concentración de glóbulos rojos para asegurar la ligazón eficiente por el anticuerpo de captura. El cuarto segmento 140 puede contener amortiguador de lisis de glóbulos rojos incluyendo sales secas (1 µmol de KHCO₃, 15 µmol de NH₄Cl) y 100 µl de 0,1 mM de EDTA, tampón de pH 8,0 alojado en dos subsegmentos separados por sello desprendible. El quinto segmento 150 y sexto segmento 160 puede contener 80 µl de tampón de lavado PBS, respectivamente. Todos los otros reactivos pre-empaquetados son idénticos a los del ejemplo 1.

Para detección de bacterias en sangre entera puede cargarse en el primer segmento 110 más de 50 µl de sangre entera. Luego se cierra el túbulo mediante una tapa 20 y se inserta en un analizador. El procesamiento de muestras incluye las etapas siguientes.

5 1. *Captura de células diana.* Pueden cerrarse sobre el túbulo todas las abrazaderas, exceptuando la primera abrazadera 310. El primer actuador 312 puede comprimir el primer segmento 110 para ajustar el volumen de sangre 210 a alrededor de 50 µl restantes en el segmento, y luego la primera abrazadera 310 puede comprimir el túbulo para cerrar el segmento. El tercer actuador 332 puede luego comprimir el tercer segmento 130 para romper el sello desprendible entre el segmento 130 y el segmento 120 para mezclar el tampón PBS con el anticuerpo acoplado a perlas magnéticas para reconstituir una solución de captura. La segunda mordaza 320 puede luego abrirse y el primer actuador 312 puede comprimir el segmento 110 para mover la muestra de sangre al segundo segmento 120 y tercer segmento 130. Los segundos actuadores 322 y tercer actuador 332 pueden luego comprimir alternadamente los segmentos para mezclar la solución de captura con muestras de sangre mientras que se incuba la mezcla a 4°C durante 15-30 minutos para facilitar la unión del anticuerpo a las células diana. Luego puede aplicarse un campo magnético generado por una fuente magnética 430 sobre el segmento 130 para capturar las perlas en suspensión. El actuador 322 y 332 pueden comprimir alternadamente el segmento 120 y 130 para capturar perlas. Después que se han inmovilizado sustancialmente todas las perlas sobre la pared del segmento 130, los actuadores y abrazaderas del actuador 332 a la abrazadera 310 pueden abrirse y cerrar secuencialmente para mover la muestra no ligada y desecho al depósito de desechos 22.

10 2. *Lisis de células de sangre roja.* Después de captura diana, se abre la cuarta abrazadera 340 y el cuarto actuador puede comprimir el cuarto segmento 140 para reconstituir el tampón de lisis de glóbulos rojos y mover el tampón al segmento 230. El campo magnético generado por una fuente magnética 430 puede eliminarse para permitir la resuspensión de perlas. El actuador 322 y 332 puede comprimir alternadamente sus segmentos respectivos para agitar e incubar la mezcla durante 5 minutos a temperatura ambiente para facilitar la lisis de células de sangre roja restante en la muestra. Luego puede aplicarse el campo magnético al segmento 130 para capturar las perlas en suspensión. Después que se han inmovilizado sustancialmente todas las perlas sobre la pared del segmento 130, la muestra sin ligar y desecho pueden llevarse al depósito de desechos 22.

15 3. *Lavado.* Después de la etapa de ligazón pueden seguir dos procesos de lavado. Ambos pueden utilizarse tampón de lavado PBS pre-empacado en segmentos 150 y 160. El lavado puede producirse mediante lavado de dilución de base utilizando el proceso antes descrito.

20 4. *Elución de ácido nucleico.* La elución puede producirse con el procedimiento descrito en el ejemplo 1. La suspensión de perlas puede incubarse a 95°C bajo condiciones estacionarias, de flujo o agitación durante 2-5 minutos para lisar las células diana capturadas y liberar ADN.

25 5. *Amplificación y detección de ácido nucleico.* La detección de PCR en tiempo real puede ocurrir mediante el mismo proceso que se ha descrito en el ejemplo 1.

30 **Ejemplo 8. Aislamiento de ARN viral utilizando enriquecimiento inmunomagnético de sangre entera**

35 El aislamiento de ARN viral y detección secuencial a partir de sangre entera puede llevarse a cabo en un tubo 1, que incluye un túbulo flexible 10 que tiene nueve segmentos separados por sellos desprendibles y que contienen reactivos pre-empacados y una tapa 20 que tiene un depósito de desechos 22 alojada en esta. Todos los reactivos pre-empacados pueden ser idénticos a los del ejemplo 5, a excepción de que el segundo segmento 120 puede contener perlas magnéticas secas, tal como Dynabeads recubiertas con un anticuerpo de captura específico para un epitopo viral, y el noveno segmento 190 puede contener reactivos de RT-PCR 290 que pueden incluir 10 mmol de MgCl₂, 1,54 unidades de polimerasa de ADN Taq, 1-5 unidades de polimerasa de ADN *Tth*, y 20-100 pmol de cada uno de los cebadores oligonucleótidos, y 6-26 pmol de sonda TaqMan. Para aislamiento de ARN viral y detección de secuencia, sobre 50 µl de sangre entera puede cargarse en el primer segmento 110. La muestra puede luego procesarse utilizando los reactivos pre-empacados con las etapas de procesamiento de muestras descrito en el ejemplo 7, con la excepción de una etapa de captura de diana modificada y una etapa de transcripción inversa adicional. Para la etapa de captura de diana puede llevarse a cabo a temperatura ambiente durante 5 minutos en los segmentos 120 y 130 captura de virión mediante perlas magnéticas acopladas a anticuerpo. La etapa transcripción inversa puede producirse antes de la amplificación e incluye la incubación del ARN extraído con los reactivos RT-PCR en el noveno segmento 190 a 65°C durante 10 minutos.

40 **Ejemplo 9. Genotipado multiplex de ADN humano con sondas candado y análisis de curva de fusión**

45 El aislamiento de ADN y detección de secuencia de ADN de sangre entera puede llevarse a cabo en un tubo 1, que incluye un túbulo flexible 10 que tiene nueve segmentos separados por sellos desprendibles y conteniendo reactivos pre-empacados, y una tapa 20, que tiene un depósito de desechos 22 alojado en ésta. Todos los reactivos pre-empacados pueden ser idénticos a los expuestos en el ejemplo 1, con la excepción del octavo segmento 180 y el noveno segmento 190. El octavo segmento 180 puede incluir dos sub-segmentos separados por sello desprendible; el primer sub-segmento puede contener sondas candado secas y ligasa de ADN T4, y el segundo sub-segmento

puede contener exonucleasa seca I y exonucleasa III. El noveno segmento 190 puede contener reactivos UNG y PCR secos 290 (que pueden incluir 200 μmol de cada uno de los 3 dNTPs, 100 pmol de cada uno de los oligonucleótidos utilizados mediante PCR, 400 μmol de dUTP, 1 nmol de KCl, 0,1 nmol de MgCl_2 , 5 unidades de polimerasa de Taq ADN y opcionalmente 12,5 pmol de sonda TaqMan o baliza molecular).

5 Para genotipado, puede cargarse sobre 10 μl de entero en el primer segmento 110. La muestra puede luego procesarse utilizando los reactivos pre-empaquetados con las etapas de procesamiento de muestras descritas en el ejemplo 1, con la excepción de la amplificación de ácido nucleico y etapa de detección. Después de completarse la extracción de ácido nucleico en el séptimo segmento 170, el actuador 372 puede ajustar el volumen de solución de ácido nucleico en el segmento 170 a aproximadamente 5-15 μl , mientras que el resto de la solución de ácido nucleico se mantiene en el segmento 160, segregado del segmento 170 mediante la abrazadera 370. El actuador 372 puede luego comprimir el segmento 170 para romper el sello desprendible entre el segmento 170 y 180, mientras que mantiene el sello desprendible entre el primer y segundo sub-segmentos del segmento 180. Los ácidos nucleicos extraídos pueden mezclarse con ligasa de DNA T4 y sondas candado en el primer sub-segmento del segmento 180, y la mezcla puede moverse al segmento 170. La solución de ácido nucleico, sonda candado y ligasa T4 pueden incubarse en el segmento 170 a 37°C durante 15 minutos. La mezcla puede luego moverse al octavo segmento 180 para romper el sello desprendible del segundo sub-segmento del segmento 180 para incubar los ácidos nucleicos con Exonucleasa I y Exonucleasa III a 37°C durante 5 minutos para degradar todos los fragmentos de ADN lineal. Después de incubación la solución puede calentarse hasta 95°C en el octavo segmento 180 para inactivar las exonucleasas y ligasa T4. La solución puede luego transferirse al noveno segmento 190 para mezclarse con reactivos UNG y PCR secos. El UNG degrada cualquier producto PCR contaminante que pueda haber estado presente cuando se introdujo la muestra, y lineariza las sondas candado circularizadas para facilitar la amplificación de las secuencias reporteras. La amplificación de PCR puede llevarse a cabo como se ha descrito en el ejemplo 1. Un sensor de detección 492 montado sobre el bloque 394 puede controlar la emisión de fluorescencia en tiempo real del colorante reportero a través de una porción de la pared de túbulo. El análisis de curva de fusión puede llevarse a cabo para identificar los objetivos. Alternativamente la muestra puede transferirse al segmento 198 a través de la puerta de presión 194 para ulterior detección sobre una microdisposición de ácido nucleico u otras técnicas de detección conocidas por el experto en el arte.

30 **Ejemplo 10. Aislamiento de esporas bacterianas vivas y germinación**

El aislamiento de ADN y detección de la secuencia de ADN de muestra de esporas de torunda superficiales puede llevarse a cabo en un tubo 1, incluyendo un túbulo flexible 10 que tiene nueve segmentos separados por sellos desprendibles y conteniendo reactivos pre-empaquetados, y una tapa 20 que tiene un depósito de desechos 22 alojado en ésta y adicionalmente una torunda que sobresale de la abertura de la tapa. El primer segmento 110 del túbulo puede incluir dos sub-segmentos separados por un sello desprendible; el primer sub-segmento puede adaptarse para alojar una muestra de torunda, y el segundo sub-segmento puede contener 80 μl de tampón de lavado PBS que tiene un pH apropiado para permitir la ligazón eficiente de las esporas mediante el anticuerpo de captura. El segundo segmento 120 puede contener sustrato sólido sobre donde puede recubrirse anticuerpos antiesporas; en donde los anticuerpos tienen una alta afinidad para epitopos sobre la espora y baja afinidad para epitopos sobre la célula germinada. El segundo segmento puede pre-empaquetarse adicionalmente con un volumen de gas para facilitar la rotura del sello desprendible entre los segmentos 120 y 110. El tercer segmento 130 puede contener 50 μl de reactivos de germinación de esporas 230 que pueden incluir medio de infusión Brain Heart (Difco), His 50 mM, Tyr 1 mM, Inosina 2mM, Ala 200 mM y Ser 200 mM. El cuarto segmento 140 puede contener 50 μl de tampón de lisis 240 conteniendo sales caotrópicas que incluyen 4,7 M de clorhidrato de guanidinio, 10 mM de urea, 10 mM de Tris HCL, pH 5,7, y 2% de triton X-100. El quinto segmento 150 puede contener 500 μg de perlas de sílice magnéticas 240, tal como perlas MagPrep^R (Merck & Co), suspendidas de 80 μl de isopropanol. El sexto segmento 160 puede contener 80 μl de tampón de lavado (etanol 250 al 50%, 20 mM de NaCl, 10 mM de tris HCl, pH 7,5). El séptimo segmento 170 puede contener 80 μl de tampón MES 20 mM, pH 5,3. El octavo segmento 180 puede contener 80 μl de tampón de elución 280 (10 mM de Tris HCl, pH 8,5). El noveno elemento 190 puede contener reactivos de UNG seco y PCR secado 290 (que puede incluir 10 nmol de cada uno de dATP, dCTP, y dGTP, y dGTP; 20 nmol de dUTP, 2,5 μmol de KCl, 200 nmol de MgCl_2 , 1,5 unidades de polimerasa de ADN Taq y 20-100 pmol de cada uno de los cebadores oligonucleótidos, y 6-25 pmol de sonda TaqMan).

55 Para detección esporas vivas, la torunda integrada en la capa 20 puede utilizarse para recoger una muestra. Después de la recogida la tapa puede hacerse coincidir con el túbulo, introduciendo la muestra de torunda en el primer segmento 110. El túbulo puede luego insertarse en un analizador. El procesamiento de muestras puede incluir los pasos siguientes.

60 1. *Germinación de esporas* Todas las abrazaderas, excepto la primera abrazadera 310 pueden cerrarse sobre el túbulo. El primer actuador 312 se comprime sobre el primer segmento 110 para romper el sello desprendible entre el primer y segundo sub-siguiente del segmento 110 para liberar el tampón de lavado PBS. El primer actuador 310 puede luego comprimir y descomprimir alternadamente el segmento 110 para lavar esporas de la cabeza de torunda utilizando el tampón PBS. Después de suspensión de las esporas en PBS, el actuador 322 puede comprimir el segmento 120 para reventar el sello desprendible entre los segmentos 110 y 120 y permitir que la suspensión de

5 esporas se mueva al segmento 120. La abrazadera 320 puede cerrarse y el actuador 322 puede comprimir alternadamente el segmento 120 para facilitar la ligazón de la espora al anticuerpo. Después de incubación el desecho líquido puede llevarse al depósito de desechos. Luego el actuador 332 puede comprimir el segmento 130 para reventar el sello desprendible entre los segmentos 120 y 130 para permitir que se incube la solución de germinación con las esporas capturadas a 37°C durante 13 minutos con agitación en el segmento 120. Las células germinadas no se ligarán mediante el anticuerpo de esporas específico y se suspenderán en la solución.

10 2. *Captura de ácido nucleico.* Después de germinación puede abrirse la cuarta abrazadera 340 y comprimir el cuarto actuador 342 el cuarto segmento 140 para abrir el sello desprendible y mezclar el tampón de lisis con las células germinadas. Luego la quinta abrazadera 350 puede abrirse y el quinto actuador 352 comprimir el segmento 150 para mover las perlas de sílice magnéticas suspendidas en isopropanol 240 al segmento 130 para mezclarse con el lisado. Los actuadores 332 y 342 pueden comprimir alternativamente sus respectivos segmentos para agitar e incubar la mezcla durante 5 minutos a temperatura ambiente para facilitar la ligazón de ADN a las perlas de sílice magnéticas. Luego el campo magnético generado por una fuente magnética 430 puede aplicarse sobre el segmento 150 para capturar las perlas en suspensión. El actuador 332 y 342 pueden comprimir alternadamente el segmento 130 y 140 para capturar perlas. Después que sustancialmente todas las perlas se inmovilizan sobre la pared del segmento 130, la muestra desligada y desecho pueden moverse al depósito de desechos 22.

20 3. *Lavado.* El tampón de lavado de etanol en el segmento 160 y el tampón MES en el segmento 170 puede utilizarse para lavar las perlas inmovilizadas. En los segmentos 120 y 130 puede llevarse a cabo un lavado a base de dilución mediante los actuadores 322 y 332 como se describe en el ejemplo 1. Alternativamente puede llevarse a cabo en los segmentos 120, 130 y 140 un lavado basado en flujo de capa delgada mediante los actuadores 322, 332 y 342 como se describe en el ejemplo 1.

25 4. *Elución de ácido nucleico.* El tampón de elución 270 puede moverse del segmento 180 a 130 para elución de ADN como se describe en el ejemplo 1.

30 5. *Amplificación y detección de ácido nucleico.* La solución de ácido nucleico puede luego transferirse al segmento 190 y mezclarse con reactivos UNG y PCR secos. La incubación de la mezcla reaccional a 37°C durante 5 minutos permite que UNG degrade cualquier producto de PCR contaminante. Después la incubación de la mezcla reaccional puede transferirse al segmento 180 para desnaturalización a 95°C durante 2 minutos. La solución de ácido nucleico puede luego transferirse al segmento 190 para incubación a 60°C para iniciar PCR de arranque en caliente. Un ensayo de amplificación típico de 2-temperatura de 50 ciclos de 95°C durante 2 segundos y 60°C durante 15 segundos puede conducirse fijando el segmento 180 a 95°C y el segmento 190 a 60°C, y transfiriendo la mezcla reaccional entre los segmentos alternadamente cerrando y abriendo el actuador 382 y 392. Un ensayo de amplificación típico de 3-temperatura de 50 ciclos de 95°C durante 2 segundos, 60°C durante 10 segundos, y 72°C durante 10 segundos puede llevarse a cabo fijando el segmento 170 a 95°C, el segmento 180 a 72°C y el segmento 190 a 60°C, y transfiriendo alternadamente la mezcla reaccional entre los segmentos cerrando y abriendo los actuadores 372 y 392. Un sensor de detección 492, tal como un fotómetro puede montarse sobre el bloque 394 para controlar la emisión de fluorescencia en tiempo real procedente del colorante reportero a través de la pared del 35 40 túbulo. Después de completado un ensayo los resultados de prueba pueden ser reportados y la muestra puede ser transferida al segmento 198 a través de la puerta de presión 194 comprimiendo el segmento 190 para procesamiento siguiente.

45 **Ejemplo 11. Genotipado multiplex de ADN humano de muestra de tejido sólida.**

50 En una onceava modalidad el aislamiento de ADN y detección de secuencia de ADN de muestra de tejido sólida puede llevarse a cabo en un tubo 1, incluyendo un túbulo flexible 10 que tiene nueve segmentos separados por sellos desprendibles y conteniendo reactivos pre-empaquetados, y una tapa 20, que tiene un depósito de desechos 22 alojado en ésta. El primer segmento 1210 del túbulo puede adaptarse para recibir una muestra de tejido sólida y tiene paredes resistentes con superficies internas a modo de microdientes para facilitar la molturación del tejido. El segundo segmento 120 puede contener 250 µg de proteinasa seca K 222. El tercer segmento 130 puede contener 100 µl de tampón de lisis 230 conteniendo sales caotrópicas que incluyen 4,7 M de clorhidrato de guanidinio, 10 mM de urea, 10 mM de HCl Tris, pH 5,7, y 2% de triton X-100. Los segmentos cuarto 140, quinto 150, sexto 160 y 55 séptimo 170 pueden contener los mismos reactivos que en el ejemplo 1. El octavo segmento 180 puede incluir dos sub-segmentos separados por un sello desprendible, el primer sub-segmento puede contener sondas candado y ligasa de ADN T4 280, y el segundo sub-segmento puede contener exonucleasa seca I y exonucleasa III. El noveno segmento 190 puede contener reactivos UNG y PCR secos 290 (que pueden incluir 200 µmol de cada uno de los 3 dNTPs, 100 pmol de cada uno de los oligonucleótidos utilizados mediante PCR, 400 µmol de dUTP, 1nmol de KCl, 60 0,1 nmol de MgCl₂, 5 unidades de polimerasa de ADN Taq y opcionalmente 12,5 pmol de sonda TaqMan).

65 Para un ensayo de detección de mutación puede cargarse en el primer segmento de 1 mg a 50 mg de muestra de tejido sólida. Luego puede cerrarse el túbulo mediante una tapa 20 e insertarse en un analizador. A continuación pueden cerrarse todas las abrazaderas sobre el túbulo. La abrazadera 330 puede abrirse y el tercer actuador 332 comprimir el tercer segmento 130 para romper el sello desprendible entre el segmento 120 y 130 para mezclar el tampón de lisis 230 con proteinasa K. La segunda abrazadera 320 puede abrirse luego y el segundo actuador

puede comprimir el segundo segmento para abrir el sello desprendible e introducir solución de lisis en la muestra de tejido sólida en el segmento 110. La segunda abrazadera 320 puede cerrarse y el primer actuador 312 puede comprimir y descomprimir el segmento 110, facilitando la homogeneización de la muestra de tejido sólida con los microdientes sobre la superficie de la pared del túbulo. El elemento térmico que contacta el segmento 110 puede fijarse a 50-68°C para aumentar la eficacia de digestión de proteinasa. Después que la muestra de tejido se ha homogeneizado suficientemente puede moverse el homogeneizado al segmento 120 y las perlas de sílice magnéticas suspendidas en isopropanol del segmento 140 puede moverse al segmento 130. Los actuadores 322 y 332 pueden comprimir alternadamente sus segmentos respectivos para mezclar el homogeneizado con la suspensión de perlas para facilitar la ligazón del ADN a las perlas de sílice magnéticas. Luego el campo magnético generado por una fuente magnética 430 puede aplicarse al segmento 130 para capturar las perlas en suspensión. Los actuadores 322 y 332 pueden comprimir alternadamente los segmentos 120 y 130 para capturar perlas en el campo magnético. Como alternativa, el actuador 332 puede comprimir el segmento 130 para formar un canal de flujo y dos actuadores flanqueantes 322 y 342 pueden comprimir los segmentos respectivos alternadamente para aumentar la eficiencia de captura. Después que se han inmobilizado sustancialmente todas las perlas sobre la pared del segmento 130, los actuadores y abrazaderas del actuador 342 a la abrazadera 310 pueden abrirse y cerrarse secuencialmente para mover la muestra no ligada y desecharla al depósito de desechos 22. Las etapas de lavado subsiguiente y elución de ácido nucleico pueden producirse con el procedimiento descrito en el ejemplo 1. La amplificación y detección de ácido nucleico puede producirse mediante el proceso de ensayo de sonda candado como se describe en el ejemplo 9.

Ejemplo 12. Separación de plasma y detección de virus de sangre entera

En una quinta modalidad el aislamiento de ARN y detección de secuencia de sangre entera puede llevarse a cabo en un tubo 1, incluyendo un túbulo flexible 10 que tiene nueve segmentos separados por sellos desprendibles y conteniendo reactivos pre-empaquetados, y una tapa 20 que tiene un depósito de desechos 22 alojado en ésta. El primer segmento 110 del túbulo puede incluir dos sub-segmentos separados por un sello desprendible; el primer sub-segmento puede adaptarse para recibir una muestra de sangre entera, y el segundo sub-segmento puede contener un coagulante, tal como trombina, o un anticuerpo de glóbulos rojos multivalente. El primer segmento puede contener además en su base en el segundo sub-segmento una o una pluralidad de bolsas de filtro embebidos de tamaño de poro preferentemente entre 1 μm y 10 μm . El tamaño de poro del filtro puede ser de modo que no puedan pasar sustancialmente glóbulos rojos y solo pueda pasar plasma. El segundo segmento 120 puede contener 80 μl de tampón de dilución PBS. El tercer segmento 130 puede contener 250 μg de proteinasa seca K y 60 μl de tampón de lisis (4,7 M de clorhidrato de guanidinio, 10 mM de urea, 10 mM de HCl Tris, pH 5,7 y 2% de triton X-100) alojado en dos sub-segmentos separados por un sello desprendible. Los segmentos cuarto 140, quinto 150, sexto 160, séptimo 170 y octavo 180 pueden contener los mismos reactivos que en el ejemplo 1. El noveno segmento 190 puede contener reactivos de RT-PCR 290 que pueden incluir 10 nmol de cada uno de: dATP, dCTP y dGTP; 20 nmol de dUTP, 25 μmol de KCl, 200 nmol de MgCl_2 , 1,5 unidades de polimerasa de Taq ADN polimerasa, 1,5 unidades de *Tth* ADN polimerasa y 20-100 pmol de cada uno de los oligonucleótidos cebador y 6-25 pmol de sonda TaqMan.

Para separación de plasma dentro del túbulo puede cargarse en el primer segmento 110 aproximadamente 300 μl de sangre entera. Todas las abrazaderas pueden cerrarse y el actuador 312 puede comprimir el segmento 110 para que estalle el sello desprendible entre los sub-segmentos y permitir la mezcla de la muestra de sangre con anticuerpo de anti-glóbulos rojos multi-valente o coagulante. El actuador 312 puede comprimir y descomprimir alternadamente el segmento 110 para facilitar la unión de anticuerpo a glóbulos rojos y la formación de agregados de células. El actuador 322 puede comprimir el segmento 120 para que estalle el sello desprendible entre el segmento 120 y 110 y mover el tampón de dilución al segmento 110 para la mezcla con muestra de sangre. Después de agregarse una cantidad suficiente de glóbulos rojos el actuador 312 puede comprimir suavemente el segmento 110 para conducir la muestra de sangre a través del filtro embebido, mientras que el actuador 322 puede descomprimir lentamente el segmento 120 para crear succión desde el otro lateral del filtro. Después de la separación de plasma la abrazadera 320 puede cerrarse y el actuador 332 puede comprimir el segmento 130 para reconstituir proteinasa seca K en el tampón de lisis. La abrazadera 330 puede luego abrirse y el actuador 322 puede comprimir el segmento 120 para mezclar la muestra de plasma con el tampón de lisis e incubar la mezcla a 50°C durante 5 minutos en el segmento 130. Para virus de ADN, la captura de ácido nucleico subsiguiente, lavado, elución, y etapas de amplificación y detección, puede ser igual que lo descrito en el ejemplo 1. Puede adicionarse una etapa de transcripción inversa antes de la amplificación, en donde el ARN extraído se incubaba con reactivos de RT-PCR en el noveno segmento 190 a 65°C durante 10 minutos.

Ejemplo 13. Aislamiento de ADN genómico y detección de sangre entera recogida sobre matrices a base de algodón

En una treceava modalidad, el aislamiento de ADN y detección de secuencia de ADN puede llevarse a cabo en un tubo 1, incluyendo un túbulo flexible 10 que tiene cuatro segmentos separados por sellos desprendibles y que contienen reactivos pre-empaquetados, y una tapa 20, que puede tener un depósito de desechos 22 alojado en ésta. El primer segmento 110 del túbulo puede recibir la muestra de sangre total recogida sobre matrices a base de

algodón, tal como Whatman BPC 180 y papel FTA^R, papel Scheicher y Schuell 903^R e IsoCode^R. El segundo segmento 120 puede contener tampón de lavado incluyendo 40 µl de agua destilada 220. El tercer segmento 130 puede contener 80 µl de tampón de elución (10 mM Tris HCl, pH 8,5) o agua destilada 230. El cuarto segmento 140 puede contener UNG seco y reactivos de PCR secos 240 (que pueden contener 10 mmol de cada uno de 3 dNTPs: dATP, dCTP y dGTP; 20 nmol de DUTP, 2,5 µmol de KCl, 200 nmol de MgCl₂, 1,5 unidades de polimerasa de ADN Taq y 20-100 pmol de cada uno de los cebadores oligonucleótidos, y 6-25 pmol de sonda TaqMan). El extremo del segmento 140 puede sellarse de forma permanente.

Para genotipación puede absorberse sangre entera, tal como la recogida mediante punción digital u otros medios sobre matrices a base de algodón 30 unidas a la tapa de túbulo de muestras 20 a través del conector 36. El tubo puede luego cerrarse mediante una etapa 20 e insertarse en un analizador.

El procesado de muestras incluye las etapas siguientes.

1. *Lisis de muestras*. Todas las abrazaderas, a excepción de la primera abrazadera 310 pueden cerrarse sobre el túbulo. El primer actuador 312 puede comprender el primer segmento 110 para ajustar la distancia del actuador 312 a las matrices a base de algodón 30 en el segmento, y luego la primera abrazadera 310 puede comprender el túbulo para cerrar el segmento. El primer segmento puede incubarse a 95°C durante 5 minutos para secar la muestra de sangre. Luego la temperatura del segmento puede dejarse enfriar hasta temperatura ambiente. El proceso de secado puede lisar células de sangre entera y realzar el ligado de proteínas de plasma e inhibidores de PCR a las matrices de algodón. La temperatura de incubación puede mantenerse mediante contacto entre el túbulo y los elementos térmicos incorporados dentro de los actuadores y/o bloques opuestos a los actuadores.

2. *Lavado*. Puede seguir un proceso de lavado al proceso de calentamiento con el fin de eliminar residuos lavables e inhibidores de PCR de las matrices y los segmentos que se utilizarían para ulterior proceso de muestreo. En esta modalidad puede utilizarse un lavado a base de dilución o un lavado a base de flujo de capa fina. Para lavado a base de dilución las abrazaderas 320 pueden abrirse primero y luego puede cerrarse el actuador 322 para mover el tampón de lavado 220 al segmento 210 seguido del cierre de la abrazadera 320. El primer actuador 312 puede agitar las matrices a base de algodón a través de una acción repetida de compresión y relajamiento para liberar componentes de proteína de plasma sin ligar e inhibidor PCR durante 3 minutos a temperatura ambiente. Después de completado el lavado puede eliminarse el tampón de lavado del segmento 110 para pasar al depósito de desechos 22 alojado en la tapa 20. El actuador 312, abrazaderas 310 y 320 pueden liberarse suavemente para formar un canal de flujo de capa delgada a través del segmento 110. El actuador 322 puede ejercer suave compresión sobre el segmento 120 para generar cierta presión interna para asegurar un huelgo sustancialmente uniforme del canal de flujo de capa delgada. El actuador 322 puede luego comprimir el túbulo para generar flujo esencialmente laminar del tampón de lavado a través del canal de flujo. Cuando se completa el lavado los actuadores y abrazaderas pueden ejercer compresión sobre los segmentos y sustancialmente todo el desecho puede moverse para entrar en el depósito de desechos 22.

3. *Elución de ácido nucleico*. El tampón de elución 230 puede luego moverse del segmento 130 al 110 utilizando un proceso similar al mencionado antes. La matriz a base de algodón puede incubarse a 95°C bajo condiciones estacionarias, de flujo o agitación durante 2 minutos. El eluido puede luego moverse al segmento 130. El actuador 332 puede comprimir el segmento 130 para ajustar el volumen de la solución de ácido nucleico eluída hasta 50 µl y luego puede cerrarse la abrazadera 330 contra el túbulo para completar el proceso de extracción de ADN.

4. *Amplificación y detección de ácido nucleico*. La solución de ácido nucleico puede luego transferirse al segmento 140, mezclarse, e incubarse con reactivo UNG y PCR 240 a 37°C durante 5 minutos para degradar cualquier producto de PCR contaminante que pueda haber estado presente cuando se introdujo la muestra. Después de incubación la temperatura puede aumentarse hasta 95°C para desnaturalizar el ADN durante 2 minutos seguido de reacción de PCR. Un ensayo de amplificación de 2-temperatura típico de 50 ciclos a 95°C durante 2 segundos y 60°C durante 9-15 segundos puede llevarse a cabo disponiendo el segmento 180 a 95°C y el segmento 190 a 60°C, y transfiriendo la mezcla reaccional entre los segmentos alternadamente cerrando y abriendo el actuador 332 y 342. Un ensayo de amplificación de 3-temperatura típico de 50 ciclos de 95°C durante 2 segundos, 60°C durante 8-10 segundos y 72°C durante 8-12 segundos puede conducirse disponiendo el segmento 120 a 95°C, el segmento 130 a 72°C y el segmento 140 a 60°C, y transfiriendo alternadamente la mezcla reaccional entre los segmentos mediante cierre y abertura de los actuadores 322, 332 y 342. Un sensor de detección, tal como un fotómetro 492 puede montarse sobre el bloque 344 para controlar la emisión de fluorescencia en tiempo real del colorante reportero a través de la pared de túbulo.

REIVINDICACIONES

1. Un túbulo (10) para el procesado de muestras, que comprende:
- 5 un extremo proximal que tiene una Abertura (12) a través de la cual se puede introducir una muestra; un extremo distal, y por lo menos un primer segmento que contiene un substrato, un segundo segmento distal al primer segmento y que contiene tampón de lavado, y un tercer segmento distal al segundo segmento y que contiene por lo menos uno de un reactivo de amplificación, un reactivo de elución y un reactivo de detección,
- 10 cada uno de los cuales está:
- definido por el túbulo (10);
 - aislado respecto de fluidos, por lo menos en parte mediante un sello rompible (14), de modo que la rotura del sello rompible (14) deja una superficie del túbulo interna que está sustancialmente exenta de obstrucciones al flujo de
 - 15 fluido,
 - expandible así para recibir un volumen de fluido expulsado de otro segmento; y
 - apto para ser comprimible de modo a no contener sustancialmente fluido cuando así se comprime.
2. El túbulo de la reivindicación 1, en donde por lo menos una porción del túbulo es transparente.
- 20 3. El túbulo de la reivindicación 1, que comprende además un substrato en donde el substrato comprende una almohadilla formada por lo menos en parte a partir de un material absorbente que comprende por lo menos papel, film, filtro, espuma, malla y matriz fibrosa.
- 25 4. El túbulo de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además por lo menos un tampón de dilución, tampón de suspensión, substrato, reactivo de lisis, reactivo de neutralización, reactivo de elución y reactivo de germinación.
- 30 5. El túbulo de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde por lo menos un reactivo comprende un tampón de elución que incluye por lo menos un tampón Tris, agua y tampón apropiado para reacción en cadena por polimerasa.
- 35 6. El túbulo de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde por lo menos un reactivo comprende un reactivo de lisis que incluye por lo menos uno de una sal guanidinio, una sal caotrópica, un reactivo de lisis de eritrocitos, un detergente, un quelante, un reactivo de germinación de esporas, hidróxido sódico, proteinasa K, inhibidor de DNase, RNase, inhibidor de RNase, anticoagulante, coagulante, una apteasa, una solución germinante y un tensioactivo.
- 40 7. El túbulo de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde por lo menos un reactivo comprende un reactivo de germinación incluyendo medio de fusión corazón-cerebro y por lo menos uno de L-alanina, inosina, L-fenilalanina, L-serina y L-prolina.
- 45 8. El túbulo de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde por lo menos un sello rompible es un sello desprendible.
9. El túbulo de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde cada sello rompible es un sello desprendible.
- 50 10. El túbulo de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde los segmentos forman una disposición sustancialmente lineal.
11. El túbulo de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde los segmentos forman una disposición contigua.
- 55 12. El túbulo de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además una tapa para cerrar la abertura (12).
13. El túbulo de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además un armazón al que se monta el túbulo.
- 60 14. El túbulo de la reivindicación 13, en donde el armazón comprende una interfase, recibiendo la interfase una abertura del túbulo.

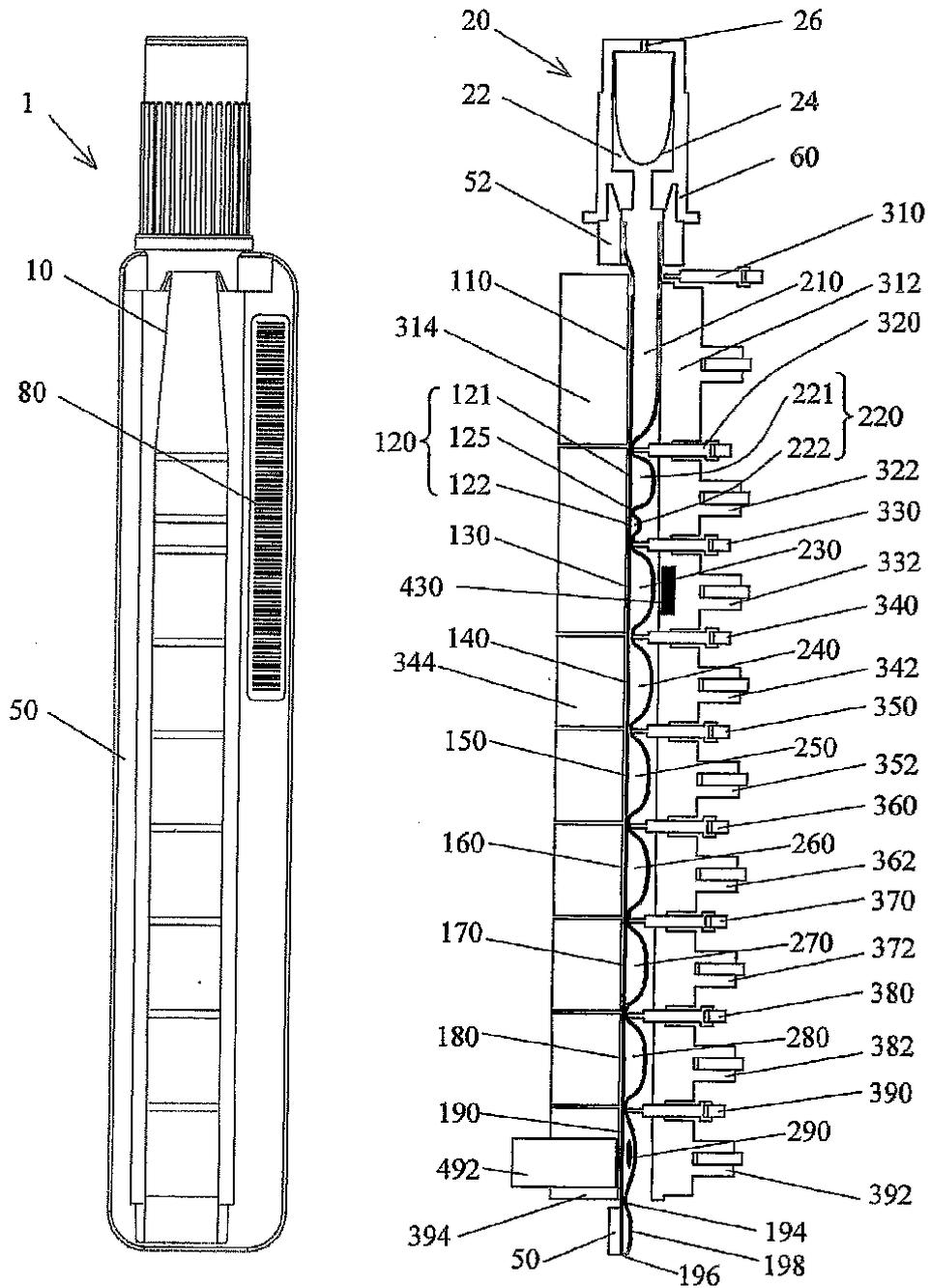


Fig. 1A

Fig. 1B

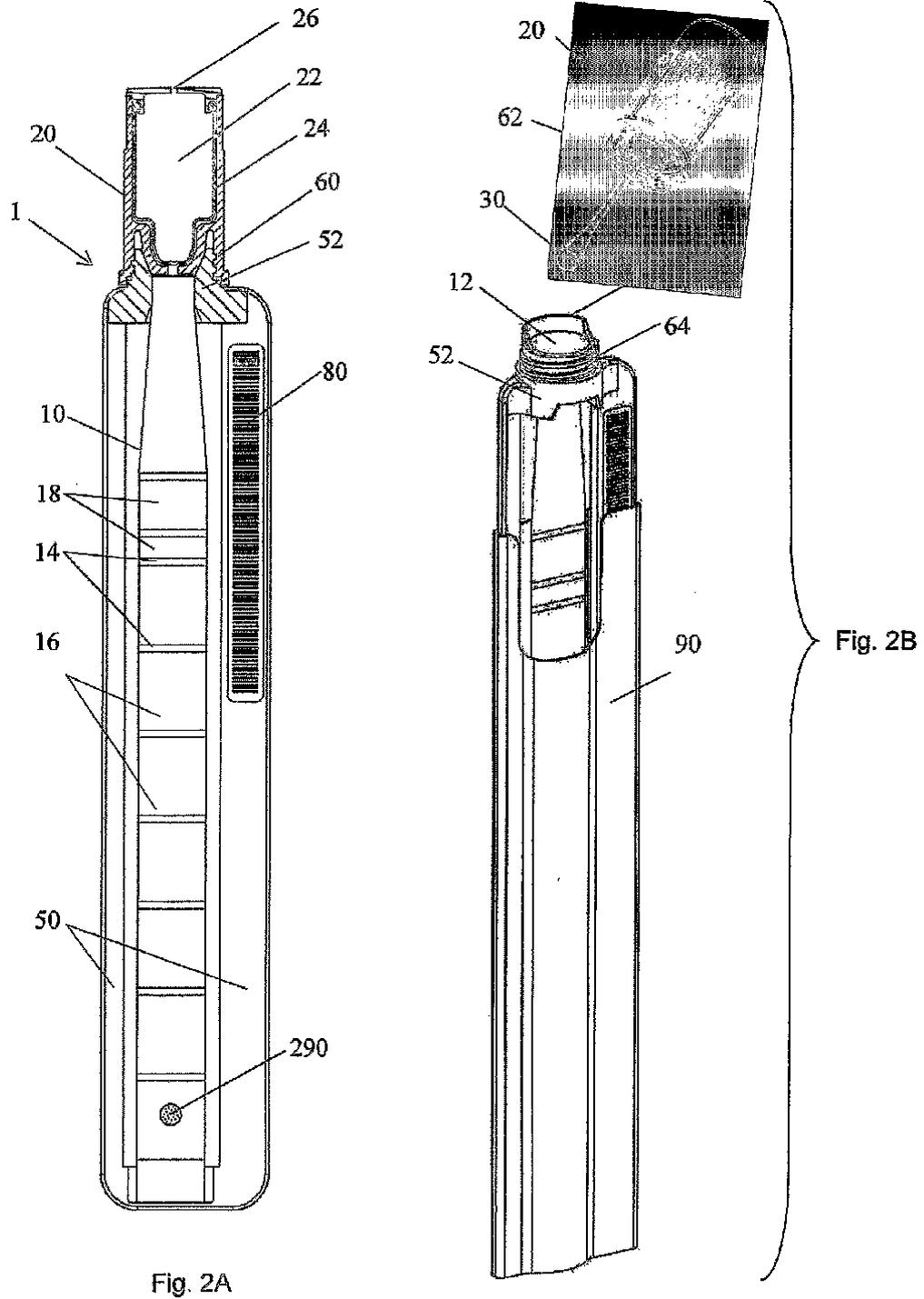


Fig. 2A

Fig. 2B

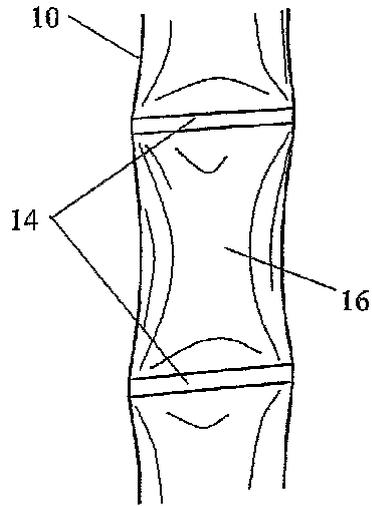


Fig. 3A

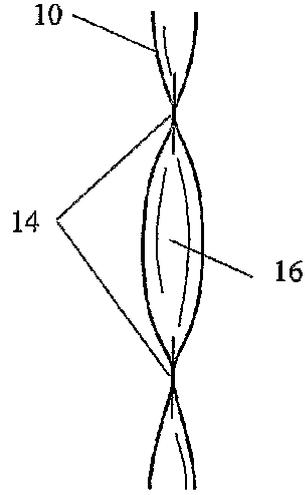


Fig. 3B

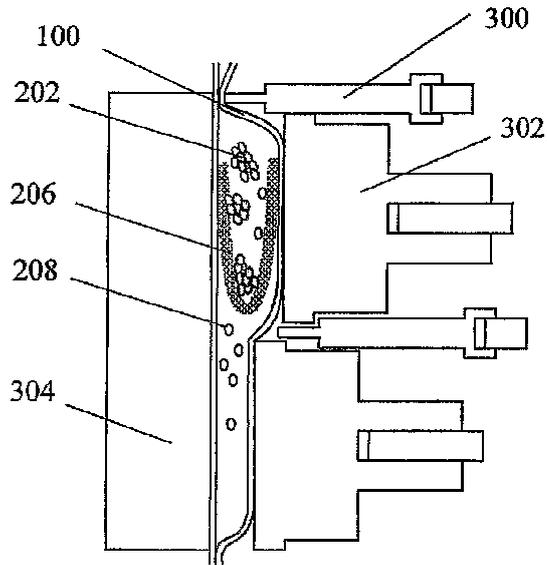


Fig. 4A

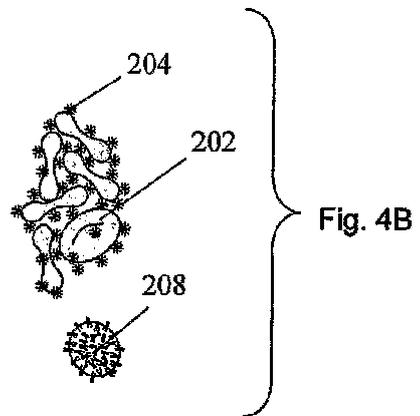


Fig. 4B

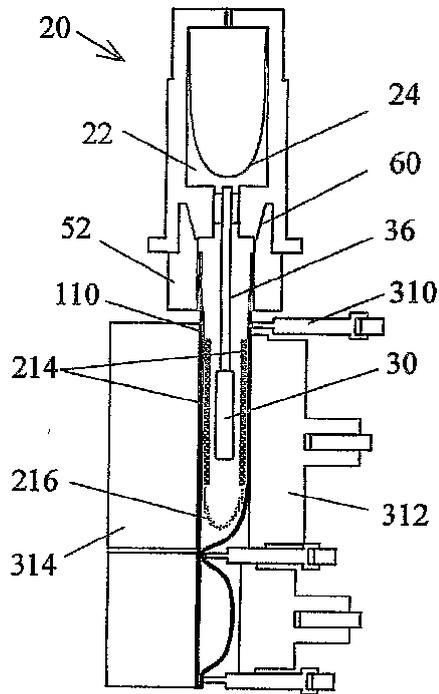


Fig. 5A

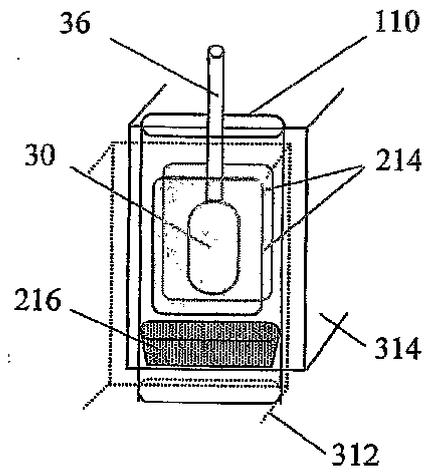


Fig. 5B

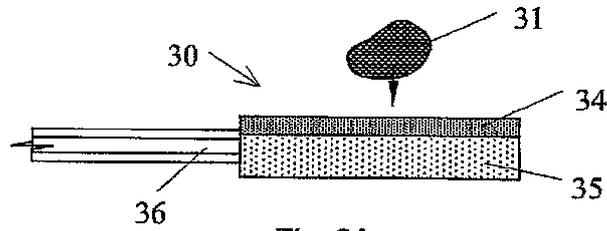


Fig. 6A

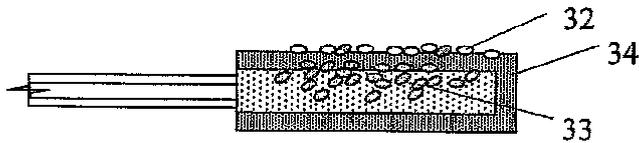


Fig. 6B

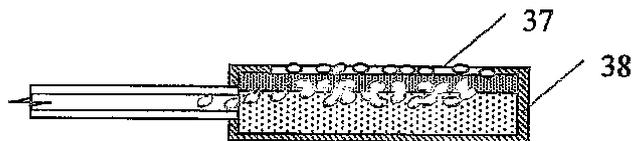


Fig. 6C

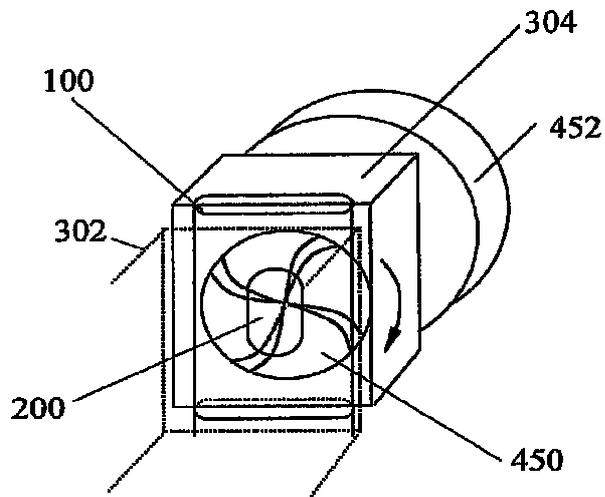
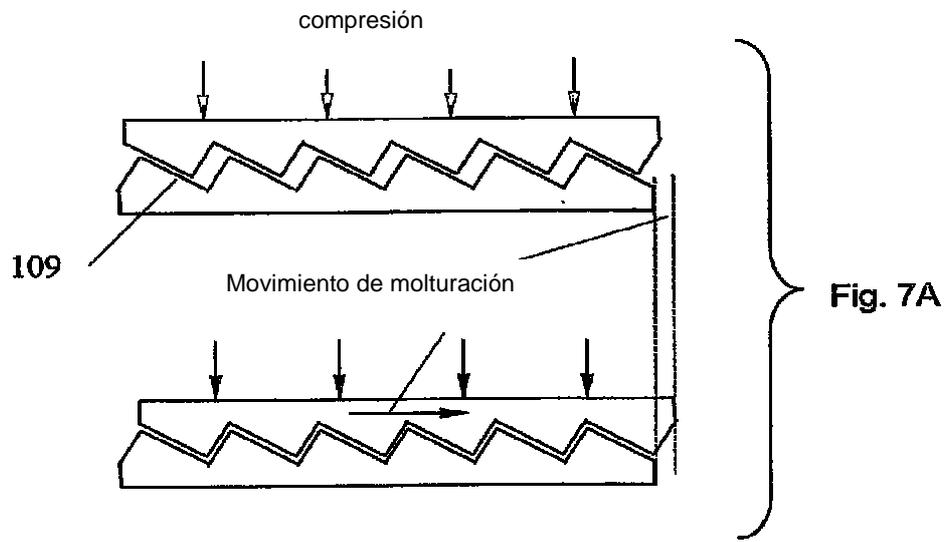


Fig. 7B

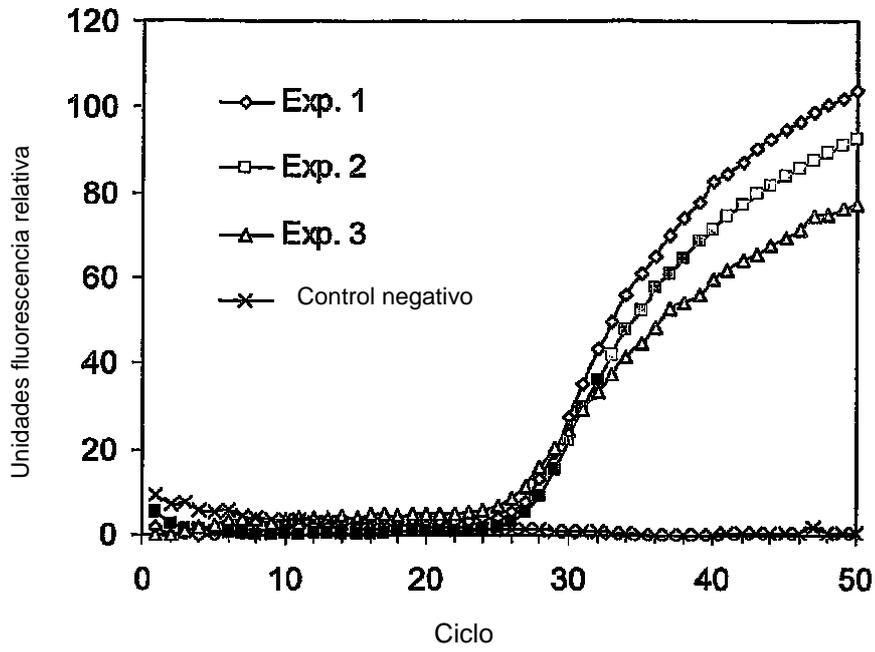


Figura 8

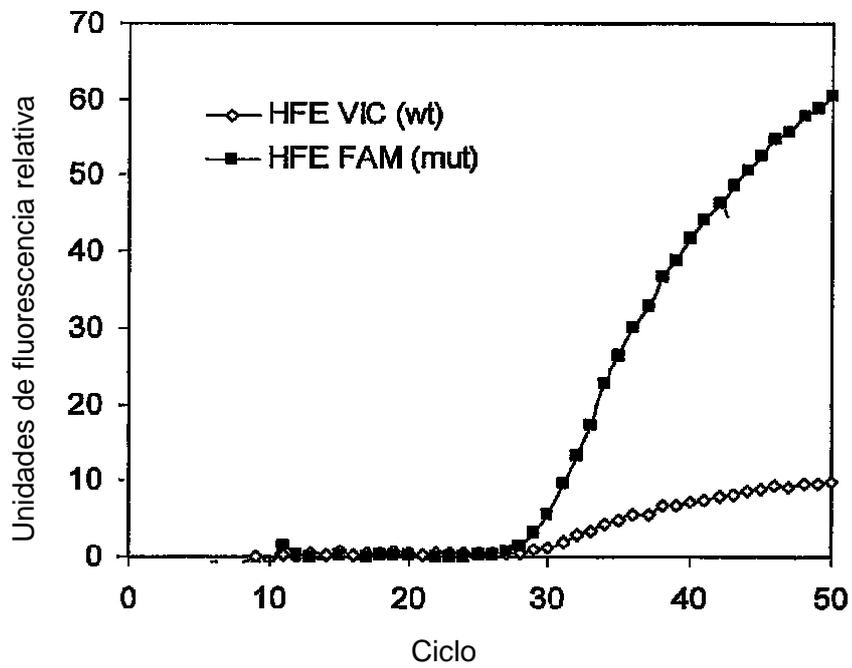


Figura 9

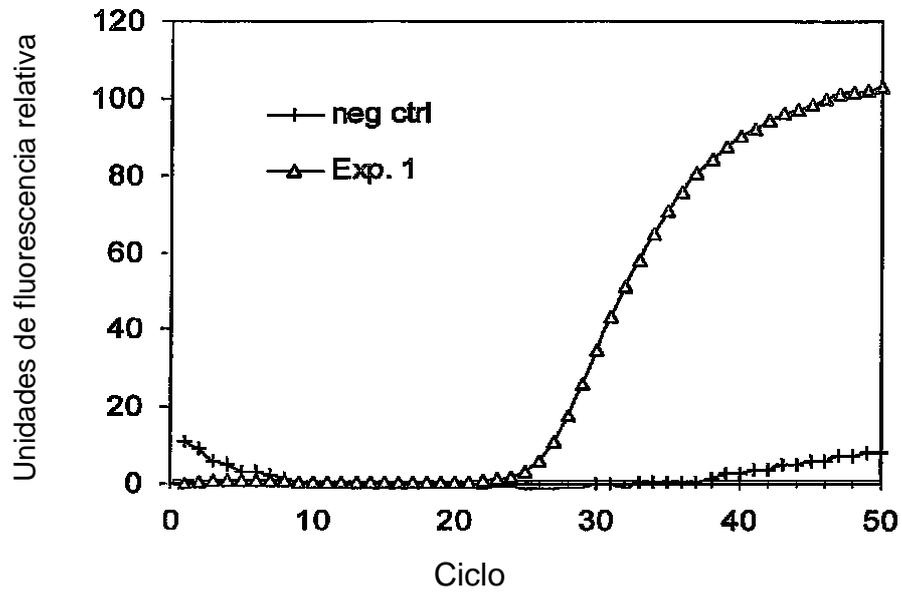


Figura 10