

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 752 000**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

C12P 19/34 (2006.01)

B01L 3/00 (2006.01)

B01L 7/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.05.2006 PCT/US2006/017665**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.11.2006 WO06121997**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.05.2006 E 06752383 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2019 EP 1920070**

54 Título: **Análisis biológico autónomo**

30 Prioridad:

09.05.2005 US 67905205

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

02.04.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**RIRIE, KIRK M.;
RASMUSSEN, RANDY P.;
PORITZ, MARK AARON;
SMITH, STEWART BENJAMIN;
NEWSWANDER, MICHAEL R. y
JONES, DAVID E.**

74 Agente/Representante:

DURAN-CORRETJER, S.L.P

ES 2 752 000 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Análisis biológico autónomo

5 INTERÉS DEL GOBIERNO

La presente invención se realizó con apoyo del gobierno de acuerdo con las subvenciones Nos. U01 AI061611 y R43 AI063695 concedidas por los Institutos nacionales de la salud. El gobierno tiene ciertos derechos en la invención.

10 ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

15 En los Estados Unidos, Canadá y Europa occidental, la enfermedad infecciosa representa aproximadamente el 7 % de la mortalidad en seres humanos, mientras que en zonas en desarrollo la enfermedad infecciosa representa más del 40 % de la mortalidad en seres humanos. Las enfermedades infecciosas conducen a una variedad de manifestaciones clínicas. Entre las manifestaciones evidentes comunes se encuentran la fiebre, neumonía, meningitis, diarrea y diarrea que contiene sangre. Aunque las manifestaciones físicas sugieren algunos patógenos y eliminan otros como el agente etiológico, sigue quedando una variedad de posibles agentes causantes, y con frecuencia un diagnóstico claro requiere que se realice una variedad de ensayos. Las técnicas de microbiología 20 tradicionales para diagnosticar patógenos pueden tardar días o semanas, retrasando con frecuencia un ciclo de tratamiento apropiado.

25 En los últimos años, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se ha convertido en un procedimiento de elección para el diagnóstico rápido de agentes infecciosos. La PCR puede ser una herramienta rápida, sensible y específica para diagnosticar una enfermedad infecciosa. Un desafío en la utilización de PCR como medio primario de diagnóstico es la variedad de posibles organismos causantes y los bajos niveles de organismo presentes en algunas muestras patológicas. Con frecuencia no resulta práctico realizar grandes paneles de ensayos de PCR, uno para cada posible organismo causante, la mayoría de los cuales se espera que sean negativos. El problema se agrava cuando el ácido nucleico del patógeno está a baja concentración y requiere un gran volumen de muestra 30 para recoger moldes de reacción adecuados. En algunos casos existe una muestra inadecuada para realizar un ensayo para detectar todos los posibles agentes etiológicos. Una solución es realizar una "PCR de múltiplex" en la que la muestra se somete a ensayo simultáneamente para detectar múltiples dianas en una única reacción. Aunque la PCR de múltiplex ha demostrado ser valiosa en algunos sistemas, existen inconvenientes referentes a la robustez de las reacciones de múltiplex a alto nivel y dificultades para un análisis claro de múltiples productos. Para resolver 35 estos problemas, el ensayo se puede dividir posteriormente en múltiples PCR secundarias. Anidar reacciones secundarias dentro del producto primario aumenta la robustez. Sin embargo, esta manipulación adicional puede ser cara y puede conducir a contaminación o a otros problemas.

40 De manera similar, la inmuno-PCR ("iPCR") tiene potencial para la detección sensible de una amplia variedad de antígenos. Sin embargo, dado que se han aplicado técnicas de ELISA tradicionales a iPCR, la iPCR presenta con frecuencia cuestiones de contaminación que son problemáticas utilizando un procedimiento de detección basado en PCR.

45 Findlay et al., ("Automated closed-vessel system for *in vitro* diagnostics based on polymerase chain reaction" (1993) Clinical Chemistry, vol. 39, No. 9, páginas 1927-1933) describieron anteriormente un sistema automatizado para la amplificación por PCR y detección dentro de un único recipiente.

50 La Patente US 2003/008308 describe dispositivos de microfluidos y procedimientos de utilización para reacciones de ciclos térmicos.

La presente invención aborda diversas cuestiones de contaminación en análisis biológicos.

CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION

55 Por consiguiente, se da a conocer un ensayo rápido y sensible que realiza ensayos simultáneamente para detectar múltiples sustancias biológicas, incluyendo organismos. El sistema autónomo emplea de manera ilustrativa una bolsa de plástico desechable económica en un formato autónomo, que permite PCR anidada y otros medios para identificar biomoléculas, mientras que de manera ilustrativa se minimiza la contaminación y se proporciona una amplificación robusta.

60 De este modo, en un primer aspecto de la presente invención, se da a conocer un recipiente para realizar amplificación en dos etapas en una muestra en un sistema cerrado, comprendiendo el recipiente una zona de reacción de primera etapa que comprende un blíster de reacción de primera etapa que comprende una serie de pares de cebadores para la amplificación de una serie de dianas para la amplificación de primera etapa de la muestra, un depósito adicional conectado por conexión de fluido al blíster de reacción de primera etapa, estando el 65 depósito adicional configurado para proporcionar fluidos adicionales a la muestra, y una zona de reacción de

segunda etapa conectada por conexión de fluido a la zona de reacción de primera etapa, comprendiendo la zona de reacción de segunda etapa una serie de cámaras de reacción de segunda etapa, comprendiendo cada cámara de reacción de segunda etapa un par de cebadores proporcionados para la amplificación adicional de una porción de la muestra, estando la zona de reacción de segunda etapa configurada para realizar ciclos térmicos de la totalidad de la serie de cámaras de reacción de segunda etapa, en el que la amplificación de primera etapa es amplificación de múltiplex para una serie de dianas, y cada par de cebadores en las cámaras de reacción de segunda etapa está configurado para la amplificación adicional de una de las dianas de primera etapa. En un ejemplo ilustrativo, la zona de reacción de primera etapa es una zona de amplificación por PCR de primera etapa. En otro ejemplo ilustrativo, la zona de reacción de primera etapa es una zona de unión a antígeno para inmuno-PCR, en la que antígenos presentes en la muestra se reconocen y se asocian con un segmento de ácidos nucleicos particular y la zona de reacción de segunda etapa es una zona de amplificación de ácidos nucleicos. En otro ejemplo ilustrativo, el recipiente comprende además una zona de lisis celular que comprende partículas para realizar la lisis de células o esporas ubicadas en la muestra, y una zona de preparación de ácidos nucleicos que comprende componentes para purificar ácidos nucleicos. De manera ilustrativa, los blísteres comprenden un material flexible, de tal manera que presión proporcionada sobre un blíster individual derrumba el blíster, forzando el contenido fuera del blíster.

En otro aspecto de la presente invención se da a conocer un procedimiento de amplificación de ácidos nucleicos en una muestra, que comprende proporcionar un recipiente según el primer aspecto de la invención, que tiene una serie de blísteres de reacción conectados por conexión de fluido incluyendo un blíster de amplificación, un conjunto adicional de cámaras de amplificación de segunda etapa conectadas por conexión de fluido al blíster de amplificación, comprendiendo cada cámara de amplificación de segunda etapa adicional un par de cebadores para amplificar adicionalmente un ácido nucleico específico en la muestra, y uno o varios puertos sellables conectados por conexión de fluido a los blísteres de reacción, proporcionando los puertos sellables el único acceso desde el exterior del recipiente hasta los blísteres de reacción, inyectar la muestra al interior del recipiente a través de un primero de los puertos sellables, y sellar el primer puerto tras inyectar la muestra, extraer los ácidos nucleicos de partir de la muestra, y desplazar los ácidos nucleicos extraídos al blíster de amplificación, amplificar los ácidos nucleicos en el blíster de amplificación, desplazar una porción de los ácidos nucleicos amplificados a cada una de las cámaras de amplificación de segunda etapa adicionales, y realizar la amplificación de segunda etapa en las cámaras de amplificación de segunda etapa adicionales. Se describe, además, un recipiente que comprende una porción flexible que tiene una serie de blísteres conectados por conexión de fluido a través de una serie de canales, y una serie de depósitos, conteniendo cada depósito un componente de reacción, y estando cada depósito conectado por conexión de fluido, como mínimo, a uno de la serie de blísteres, y un puerto sellable configurado para recibir la muestra, estando el puerto sellable conectado por conexión de fluido a uno de la serie de blísteres. En una realización ilustrativa, los componentes de reacción están en forma seca, y el recipiente comprende, además, un segundo puerto sellable conectado por conexión de fluido a cada uno de la serie de depósitos, estando el puerto configurado para recibir agua para rehidratar los componentes de reacción.

En un ejemplo ilustrativo adicional de la presente invención, se da a conocer que la etapa de extrusión incluye realizar la lisis de células contenidas dentro de la muestra para generar un lisado, comprendiendo el procedimiento inyectar la muestra al interior del recipiente a través de un primero de los puertos sellables, y sellar el primer puerto tras inyectar la muestra, mezclar perlas magnéticas de unión a ácidos nucleicos con el lisado e incubar para permitir que los ácidos nucleicos se unan a las perlas magnéticas, desplegar un imán adyacente a uno de la serie de blísteres para contener las perlas magnéticas en ese blíster, y desplazar el resto del lisado a otro de la serie de blísteres.

En una realización adicional, la etapa de lisis incluye producir impactos repetidamente en una superficie exterior del recipiente. Se describe, además, un dispositivo para analizar una muestra para detectar la presencia de ácidos nucleicos, estando el dispositivo configurado para recibir un recipiente de la presente invención en el mismo, una serie de accionadores situados de manera correspondiente a diversos blísteres del recipiente, estando cada accionador configurado para aplicar presión al blíster correspondiente del recipiente, un primer dispositivo calentador/enfriador configurado para realizar ciclos térmicos del contenido de uno de los blísteres, y un segundo dispositivo calentador/enfriador para realizar ciclos térmicos de la cámara de segunda etapa.

Se dan a conocer ejemplos adicionales de procedimientos según la presente invención. En un procedimiento ilustrativo, se amplifican ácidos nucleicos. En otro procedimiento ilustrativo, se detectan antígenos utilizando inmuno-PCR.

Características adicionales de la presente invención resultarán evidentes para los expertos en la materia tras considerar la siguiente descripción detallada de realizaciones preferentes que muestran a modo de ejemplo el mejor modo de llevar a cabo la invención tal como se percibe actualmente.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LOS DIBUJOS

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

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

La figura 2a muestra una realización de una porción de una cámara de aire correspondiente a la zona de lisis celular

mostrada en la figura 2.

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

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

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

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

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

La figura 5b es un aumento de una porción de la bolsa de la figura 5.

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

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

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

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

La figura 9 muestra una vista en sección transversal parcial del instrumento de la figura 8, incluyendo los componentes de cámara de aire de la figura 7, con la bolsa de la figura 6 mostrada en sombreado.

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

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

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

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

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

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Las bolsas de análisis de ácidos nucleicos autónomas descritas en el presente documento se pueden utilizar para someter a ensayo una muestra para detectar la presencia de diversas sustancias biológicas, de manera ilustrativa antígenos y secuencias de ácidos nucleicos, de manera ilustrativa en un único sistema cerrado. En una realización, la bolsa se utiliza para realizar ensayos para detectar múltiples patógenos. De manera ilustrativa, se pueden realizar diversas etapas en la bolsa opcionalmente desechable, incluyendo preparación de ácidos nucleicos, PCR de múltiplex de gran volumen primaria, dilución de producto de amplificación primario, y PCR secundaria, culminando con detección en tiempo real y/o análisis tras la amplificación, tal como análisis de curva de fusión. Sin embargo, se entiende que la detección de patógenos es una utilización a modo de ejemplo y las bolsas se pueden utilizar para otro análisis de ácidos nucleicos o detección de otras sustancias, incluyendo, pero sin limitación a los mismos, péptidos, toxinas y moléculas pequeñas. Además, se entiende que, aunque las diversas etapas se pueden realizar en bolsas de la presente invención, para determinadas utilizaciones se pueden omitir una o varias de las etapas, y la configuración de bolsa se puede alterar en consecuencia.

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

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

Aunque se pueden utilizar otros recipientes, de manera ilustrativa, la bolsa 10 está formada por dos capas de una película de plástico flexible u otro material flexible tal como poliéster, poli(tereftalato de etileno) (PET), policarbonato, polipropileno, poli(metacrilato de metilo) y mezclas de los mismos que se pueden preparar mediante cualquier proceso conocido en la materia, incluyendo extrusión, deposición por plasma y laminación. Se pueden utilizar, además, láminas de metal o materiales de plástico con laminación de aluminio. En la materia se conocen otros materiales de barrera que se pueden sellar entre sí para formar los blísteres y canales. Si se utiliza película de plástico, las capas se pueden unir entre sí, de manera ilustrativa mediante sellado térmico. De manera ilustrativa, el

material tiene una baja capacidad de unión a ácidos nucleicos.

Para realizaciones que emplean monitorización fluorescente, son preferentes películas de plástico que son adecuadamente bajas en cuanto a absorbancia y autofluorescencia a las longitudes de onda de funcionamiento. Un material de este tipo se puede identificar probando diferentes materiales de plástico, diferentes plastificantes y proporciones de material compuesto, así como diferentes grosores de la película. Para materiales de plástico con aluminio u otra laminación de lámina, la porción de la bolsa que va a leerse mediante un dispositivo de detección de fluorescencia se puede dejar sin la lámina. Por ejemplo, si se monitoriza la fluorescencia en los blísteres 82 de la zona de amplificación de segunda etapa 80 de la bolsa 10, entonces una o ambas capas en los blísteres 82 se dejarán sin la lámina. En el ejemplo de PCR, materiales laminados de película compuestos por poliéster (Mylar, Dupont, Wilmington DE) de aproximadamente 0,0048 pulgadas (0,1219 mm) de grosor y películas de polipropileno de 0,001-0,003 pulgadas (0,025-0,076 mm) de grosor funcionan bien. De manera ilustrativa, la bolsa 10 se fabrica de un material transparente que puede transmitir aproximadamente el 80 %-90 % de la luz incidente.

En la realización ilustrativa, se retiran los materiales entre blísteres mediante la aplicación de presión, de manera ilustrativa presión neumática, sobre los blísteres y canales. Por consiguiente, en realizaciones que emplean presión neumática, el material de bolsa es de manera ilustrativa lo suficientemente flexible como para permitir que la presión neumática tenga el efecto deseado. El término "flexible" se utiliza en el presente documento para describir una característica física del material de bolsa. El término "flexible" se define en el presente documento como fácilmente deformable mediante los niveles de presión neumática utilizados en el presente documento sin rasgado, rotura, agrietamiento o similar. Por ejemplo, las láminas de plástico delgadas, tales como material de envolver Saran® y bolsas Ziploc®, así como lámina de metal delgada, tal como lámina de aluminio, son flexibles. Sin embargo, sólo se necesita que determinadas zonas de los blísteres y canales sean flexibles, incluso en realizaciones que emplean presión neumática. Además, sólo se necesita que un lado de los blísteres y canales sea flexible, siempre que los blísteres y canales se puedan deformar fácilmente. Otras zonas de la bolsa 10 se pueden fabricar de un material rígido o se pueden reforzar con un material rígido.

De manera ilustrativa, se utiliza una película de plástico para la bolsa 10. Una lámina de metal, de manera ilustrativa aluminio, u otro material adecuado, se puede triturar o cortar de otro modo para crear una matriz que tiene un patrón de superficies elevadas. Cuando se ajusta en una prensa neumática (de manera ilustrativa A-5302-PDS, Janesville Tool Inc., Milton WI), regulada de manera ilustrativa a una temperatura de funcionamiento de 195 °C, la prensa neumática funciona como una prensa de impresión, fundiendo las superficies de sellado de película de plástico únicamente donde la matriz entra en contacto con la película. Diversos componentes, tales como cebadores de PCR (de manera ilustrativa dispuestos en puntos sobre la película y secados), sustratos de unión a antígeno, perlas magnéticas y perlas de silicato de circonio se pueden sellar dentro de diversos blísteres a medida que se forma la bolsa 10. Los reactivos para el proceso de muestra se pueden disponer en puntos sobre la película antes del sellado, de manera colectiva o de manera independiente. En una realización, se disponen nucleótido trifosfatos (NTP) sobre la película de manera independiente de la polimerasa y los cebadores, eliminando esencialmente la actividad de la polimerasa hasta que se hidrata la reacción mediante una muestra acuosa. Si la muestra acuosa se ha calentado antes de la hidratación, esto crea las condiciones para una verdadera PCR de inicio en caliente y reduce o elimina la necesidad de componentes de inicio en caliente químicos caros. Esta colocación en puntos independiente se comenta adicionalmente a continuación, con respecto a la figura 5b, pero se entiende que tal colocación en puntos se puede utilizar con cualquiera de las realizaciones comentadas en el presente documento.

Cuando se utiliza presión neumática para desplazar materiales dentro de la bolsa 10, en una realización se puede emplear una "cámara de aire". El conjunto de cámara de aire 710, del cual se muestra una porción en la figura 2a, se puede fabricar en un proceso similar al de fabricación de la bolsa, pero blísteres individuales en el conjunto de cámara de aire 710 incluyen ajustes neumáticos (de manera ilustrativa el ajuste 724a) que permiten presurizar cámaras de aire individuales dentro del conjunto de cámara de aire 710 mediante una fuente de gas comprimido. Dado que el conjunto de cámara de aire se somete a gas comprimido y se puede utilizar múltiples veces, el conjunto de cámara de aire se puede fabricar a partir de un material más duro o más grueso que la bolsa.

Cuando se coloca la bolsa 10 dentro del instrumento, el conjunto de cámara de aire 710 neumática se presiona contra una cara de la bolsa 10, de modo que si se infla una cámara de aire particular, la presión forzaría el líquido fuera del blíster correspondiente en la bolsa 10. Además de cámaras de aire neumáticas correspondientes a muchos de los blísteres de bolsa 10, el conjunto de cámara de aire puede tener accionadores neumáticos adicionales, tales como cámaras de aire o pistones accionados de manera neumática, correspondientes a diversos canales de la bolsa 10. Cuando se activan, estos accionadores neumáticos adicionales forman válvulas de pinza para pellizcar y cerrar los canales correspondientes. Para confinar líquido dentro de un blíster particular de la bolsa 10, se inflan los accionadores neumáticos de válvula de pinza sobre los canales que conducen hacia y desde el blíster, de tal manera que los accionadores funcionan como válvulas de pinza para cerrar los canales mediante pinzamiento. De manera ilustrativa, para mezclar dos volúmenes de líquido en diferentes blísteres, se despresuriza el accionador neumático de válvula de pinza que sella el canal de conexión, y las cámaras de aire neumáticas sobre los blísteres se presurizan de manera alternante, forzando el líquido hacia delante y hacia atrás a través del canal que conecta los blísteres para mezclar el líquido entre los mismos. Los accionadores neumáticos de válvula de pinza pueden ser de diversas formas y tamaños y pueden estar configurados para pellizcar más de un canal a la vez. Una válvula de

pinza ilustrativa de este tipo se ilustra en la figura 1 como válvula de pinza 16, que se puede utilizar para cerrar todos los puertos de inyección. Aunque en el presente documento se comentan accionadores neumáticos, se entiende que se contemplan otras maneras de proporcionar presión a la bolsa, incluyendo diversos accionadores electromecánicos tales como motores a pasos lineales, levas accionadas por motor, paletas rígidas accionadas mediante fuerzas neumáticas, hidráulicas o electromagnéticas, rodillos, balancines y, en algunos casos, resortes con percutor. Además, existe una variedad de procedimientos de cierre reversible o irreversible de canales además de aplicar presión normal al eje del canal. Estos incluyen retorcer la bolsa a través del canal, sellado térmico, rodamiento de un accionador, y una variedad de válvulas físicas selladas en el interior del canal tales como válvulas de mariposa y válvulas esféricas. Adicionalmente, se pueden colocar pequeños dispositivos de Peltier u otros reguladores de temperatura adyacentes a los canales y establecerse a una temperatura suficiente para congelar el fluido, formando eficazmente un sello. Asimismo, aunque el diseño de la figura 1 está adaptado para un instrumento automatizado que presenta elementos accionadores situados sobre cada uno de los blísteres y canales, se contempla, además, que los accionadores pueden permanecer estacionarios, y se puede hacer pasar la bolsa en una o dos dimensiones de tal manera que se puede utilizar un pequeño número de accionadores para varias de las estaciones de proceso incluyendo alteración de muestra, captura de ácidos nucleicos, PCR de primera y segunda etapa, y otras aplicaciones de la bolsa tales como inmunoensayo e inmuno-PCR. Los rodillos que actúan sobre canales y blísteres pueden resultar particularmente útiles en una configuración en la que se traslada la bolsa entre estaciones. Por tanto, aunque en las realizaciones dadas a conocer en el presente documento se utilizan accionadores neumáticos, cuando se utiliza la expresión "accionador neumático" en el presente documento, se entiende que se pueden utilizar otros accionadores y otras maneras de proporcionar presión, dependiendo de la configuración de la bolsa y el instrumento.

Con referencia a la figura 1, se da a conocer una bolsa 10 de muestra ilustrativa configurada para la extracción de ácidos nucleicos y PCR de múltiplex. La muestra entra en la bolsa 10 a través de un puerto de inyección de muestra 12 en un accesorio 90. El puerto de inyector 12 puede ser un sello frangible, una válvula unidireccional u otro puerto de entrada. Se puede utilizar vacío a partir del interior de la bolsa 10 para aspirar la muestra al interior de la bolsa 10, se puede utilizar una jeringa u otra presión para forzar la muestra al interior de la bolsa 10, o se pueden utilizar otros medios de introducción de la muestra al interior de la bolsa 10 a través del puerto de inyector 12. La muestra se desplaza a través del canal 14 hasta el blíster de tres lóbulos 22 de la zona de lisis celular 20, en el que se realiza la lisis de células en la muestra. Una vez que la muestra entra en el blíster de tres lóbulos 22, se cierra la válvula de pinza 16. Junto con la válvula de pinza 36, que puede estar ya cerrada, el cierre de la válvula de pinza 16 sella la muestra en el blíster de tres lóbulos 22. Se entiende que la lisis celular puede no ser necesaria con todas las muestras. Para tales muestras, se puede omitir la zona de lisis celular o se puede desplazar la muestra directamente a la siguiente zona. Sin embargo, con muchas muestras, se necesita lisis celular. En una realización, se utiliza molienda con perlas para realizar la lisis de las células.

La molienda con perlas, mediante agitación o agitación con vórtex de la muestra en presencia de partículas de lisis, tales como perlas de silicato de circonio (ZS) 34, es un procedimiento eficaz para formar un lisado. Se entiende que, tal como se utilizan en el presente documento, los términos tales como "lisis", "realizar lisis" y "lisado" no se limitan a romper células, sino que tales términos incluyen la alteración de partículas no celulares, tales como virus. La figura 2 presenta una realización de una zona de lisis celular 20, en la que un flujo convergente crea impactos con perlas a alta velocidad, para crear un lisado. De manera ilustrativa, los dos lóbulos inferiores 24, 26 del blíster de tres lóbulos 22 están conectados a través del canal 30, y el lóbulo superior 28 está conectado a los lóbulos inferiores 24, 26 en el lado opuesto 31 del canal 30. La figura 2a muestra una porción homóloga del conjunto de cámara de aire 710 que estará en contacto con la zona de lisis celular 20 de la bolsa 10. Cuando se coloca la bolsa 10 en un instrumento, adyacente a cada lóbulo 24, 26, 28 en la bolsa 10 hay una cámara de aire neumática 724, 726, 728 correspondiente en el conjunto de cámara de aire 710. Se entiende que el término "adyacente", cuando se refiere a la relación entre un blíster o canal en una bolsa y su accionador neumático correspondiente, se refiere a la relación entre el blíster o canal y el accionador neumático correspondiente cuando la bolsa está colocada en el instrumento. En una realización, los ajustes neumáticos 724a, 726a de las dos cámaras de aire neumáticas inferiores 724, 726 adyacentes a los lóbulos inferiores 24, 26 están conectados entre sí. Los ajustes neumáticos 724a, 726a y el ajuste neumático 728a de la cámara de aire neumática superior 728 adyacente al lóbulo superior 28 están conectados al lado opuesto de una válvula accionada eléctricamente configurada para accionar un cilindro neumático de doble acción. Configurado de esta manera, se alterna presión entre la cámara de aire neumática superior 728 y las dos cámaras de aire neumáticas inferiores 724, 726. Cuando se conmuta la válvula hacia delante y hacia atrás, se acciona líquido en la bolsa 10 entre los lóbulos inferiores 24, 26 y el lóbulo superior 28 a través de un nexo estrecho 32 en el canal 30. Dado que los dos lóbulos inferiores 24, 26 se presurizan al mismo tiempo, el flujo converge y se lanza al interior del lóbulo superior 28. Dependiendo de la forma geométrica de los lóbulos, la velocidad de colisión de las perlas 34 en el nexo 32 puede ser, como mínimo, de aproximadamente 12 m/s, proporcionando colisiones de alto impacto dando como resultado la lisis. El sistema de tres lóbulos ilustrativo permite una buena alteración celular y robustez estructural, al tiempo que minimiza el tamaño y el consumo de gas neumático. Aunque se utilizan perlas de ZS como las partículas de lisis, se entiende que esta elección sólo es ilustrativa, y que se pueden utilizar otros materiales y partículas de otras formas. Se entiende, además, que otras configuraciones para la zona de lisis celular 20 están dentro del alcance de la presente invención.

Aunque se utiliza un blíster de tres lóbulos para la lisis celular, se entiende que otras configuraciones de múltiples

lóbulos están dentro del alcance de la presente invención. Por ejemplo, se puede utilizar un blíster de cuatro lóbulos, de manera ilustrativa en patrón de trébol, en el que los blísteres opuestos se presurizan al mismo tiempo, forzando las partículas de lisis unas hacia otras, y, a continuación, formando un ángulo hacia los otros dos lóbulos, que a continuación, se pueden presurizar juntos. Un blíster de cuatro lóbulos de este tipo tendrá la ventaja de tener impactos a alta velocidad en ambos sentidos. Además, se contempla que se pueden utilizar blísteres de un único lóbulo, en los que las partículas de lisis se desplazan rápidamente de una porción del blíster de un único lóbulo a otra. Por ejemplo, se pueden utilizar accionadores neumáticos para cerrar zonas del blíster de un único lóbulo, formando temporalmente un blíster de múltiples lóbulos en las zonas restantes. Puede ser posible, además, desplazar la muestra y partículas de lisis de manera lo suficientemente rápida como para realizar la lisis dentro de un blíster de lisis de un único lóbulo sin formar temporalmente un blíster de múltiples lóbulos. En una realización alternativa de este tipo, tal como se muestra en la figura 2b, se puede lograr la agitación con vórtex produciendo impactos en la bolsa con palas o paletas rotatorias 21 acopladas a un motor eléctrico 19. Las palas 21 pueden producir impactos en la bolsa en el blíster de lisis o pueden producir impactos en la bolsa cerca del blíster de lisis, de manera ilustrativa en un borde 17 adyacente al blíster de lisis. En una realización de este tipo, el blíster de lisis puede comprender uno o varios blísteres. Se pueden utilizar, además, otros procedimientos de accionamiento, tales como paletas accionadas por motor, de manera neumática, hidráulica o electromagnética que actúan sobre los lóbulos del dispositivo. Se pueden utilizar rodillos o paletas rotatorias para accionar fluido conjuntamente en el nexo 32 de la figura 2, de manera ilustrativa si se proporcionan unos medios de recirculación entre los lóbulos superior e inferior y el accionador proporciona acción de bombeo peristáltico. Otras configuraciones están dentro del alcance de la presente invención.

La figura 2a muestra, además, una cámara de aire neumática 716 con un ajuste neumático 716a, y una cámara de aire neumática 736 con un ajuste neumático 736a. Cuando se coloca la bolsa 10 en contacto con el conjunto de cámara de aire 710, la cámara de aire 716 se alinea con el canal 12 para completar la válvula de pinza 16. De manera similar, la cámara de aire 736 se alinea con el canal 38 para completar la válvula de pinza 36. El funcionamiento de las cámaras de aire neumáticas 716 y 736 permite que las válvulas de pinza 16 y 36 se abran y se cierren. Aunque sólo se muestra la porción del conjunto de cámara de aire 710 adyacente a la zona de lisis celular, se entiende que el conjunto de cámara de aire 710 estará dotado de disposiciones similares de blísteres neumáticos para controlar el desplazamiento de fluidos a través de las zonas restantes de la bolsa 10.

Otros documentos de la técnica anterior dan a conocer PCR dentro de un recipiente flexible sellado. Ver, por ejemplo, las Patentes US6,645,758 y US6,780,617, y la Patente US10/478,453 en tramitación junto con la presente. Sin embargo, incluir la lisis celular dentro del recipiente de PCR sellado puede mejorar la facilidad de utilización y seguridad, particularmente si la muestra que va a someterse a prueba puede contener un peligro biológico. En las realizaciones ilustradas en el presente documento, el residuo de la lisis celular, así como todas las demás etapas, permanece dentro de la bolsa sellada. Sin embargo, se entiende que el contenido de la bolsa se puede retirar para pruebas adicionales.

Una vez realizada la lisis de las células, se abre la válvula de pinza 36 y se desplaza el lisado a través del canal 38 hasta la zona de preparación de ácidos nucleicos 40, tal como se observa mejor en la figura 3, tras lo cual se cierra la válvula de pinza 36, sellando la muestra en la zona de preparación de ácidos nucleicos 40. En la realización ilustrada en la figura 3, la purificación de ácidos nucleicos toma el material molido con perlas y utiliza unión de afinidad a perlas 56 magnéticas basadas en sílice, lavando las perlas con etanol y eluyendo los ácidos nucleicos con agua u otro fluido, para purificar los ácidos nucleicos a partir del lisado celular. Los componentes individuales necesarios para la extracción de ácidos nucleicos residen de manera ilustrativa en los blísteres 44, 46, 48, que están conectados mediante los canales 45, 47, 49 para permitir el mezclado de reactivos. El lisado entra en el blíster 44 a partir del canal 38. El blíster 44 puede estar dotado de perlas 56 magnéticas y un tampón de unión adecuado, de manera ilustrativa un tampón de alto contenido en sal tal como el del kit de preparación de muestras 1-2-3 (Idaho Technology, Salt Lake City, UT) o cualquiera o ambos de estos componentes se pueden proporcionar posteriormente a través de uno o varios canales conectados al blíster 44. Los ácidos nucleicos se capturan en las perlas 56, a continuación, se abre la válvula de pinza 53, y el lisado y las perlas 56 se pueden mezclar mediante presión suave de manera alternante en los blísteres 44 y 58 y, a continuación, desplazarse hasta el blíster 58 mediante presión neumática proporcionada de manera ilustrativa mediante una cámara de aire neumática correspondiente en el conjunto de cámara de aire 710. Las perlas 56 magnéticas se capturan en el blíster 58 mediante un imán retráctil 50, que está ubicado en el instrumento adyacente al blíster 58, y se pueden desplazar residuos a un depósito de residuos o se pueden devolver al blíster 44 aplicando presión al blíster 58. A continuación, se cierra la válvula de pinza 53. Se lavan las perlas 56 magnéticas con etanol, isopropanol u otra disolución de lavado orgánica o inorgánica proporcionada a partir del blíster 46, tras la liberación de la válvula de pinza 55. Opcionalmente, se puede retraer el imán 50 permitiendo que se laven las perlas proporcionando presión alternante sobre los blísteres 46 y 58. Las perlas 56 se capturan una vez más en el blíster 58 mediante el imán 50, y se lava la porción distinta de ácidos nucleicos del lisado a partir de las perlas 56 y se pueden desplazar de vuelta al blíster 46 y fijarse mediante la válvula de pinza 55 o se pueden eliminar mediante lavado a través de otro canal a un depósito de residuos. Una vez lavadas las perlas magnéticas, se abre la válvula de pinza 57, liberando agua (de manera ilustrativa agua tamponada) u otro eluyente de ácidos nucleicos a partir del blíster 48. Una vez más, el imán 50 se puede retraer para permitir un mezclado máximo de agua y perlas 56, de manera ilustrativa proporcionando presión alternante sobre los blísteres 48 y 58. Se despliega una vez más el imán 50 para recoger las perlas 56. Se libera la válvula de

pinza 59 y se desplaza el ácido nucleico eluido a través del canal 52 hasta la zona de amplificación de primera etapa 60. A continuación, se cierra la válvula de pinza 59, fijando por tanto la muestra en la zona de amplificación de primera etapa 60.

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

10 El etanol, agua y otros fluidos utilizados en el presente documento se pueden proporcionar a los blísteres de diversas maneras. Los fluidos se pueden almacenar en los blísteres, cuyos cuellos se pueden pellizcar mediante diversas válvulas de pinza o porciones frangibles que se pueden abrir en el momento apropiado en la secuencia de preparación de muestra. Alternativamente, se puede almacenar fluido en depósitos en la bolsa tal como la bolsa 110 mostrada en la figura 5, o en el accesorio tal como se comenta con respecto a una bolsa 210 de la figura 6, y desplazarse a través de canales, según sea necesario. En todavía otra realización, los fluidos se pueden introducir a partir de una fuente externa, tal como se muestra en la figura 1, especialmente con respecto a los puertos de inyección de etanol 41, 88 y los émbolos 67, 68, 69. De manera ilustrativa, los émbolos 67, 68, 69 se pueden insertar en el accesorio 90, de manera ilustrativa de un material más rígido, y pueden proporcionar un volumen medido de fluido tras la activación del émbolo, tal como en la Patente US10/512,255. El volumen medido puede ser igual o diferente para cada uno de los émbolos. Finalmente, en otra realización, se puede proporcionar a la bolsa un volumen medido del fluido que se almacena en uno o varios blísteres, en la que el fluido está contenido dentro del blíster, de manera ilustrativa proporcionado en una bolsa sellada pequeña dentro del blíster, formando de forma eficaz un blíster dentro del blíster. Entonces, en el momento apropiado, se puede romper la bolsa sellada, de manera ilustrativa mediante presión neumática, liberando así el fluido al interior del blíster de la bolsa. El instrumento puede estar configurado, además, para proporcionar algunos o la totalidad de los reactivos directamente a través de contactos de líquidos entre el instrumento y el material de accesorio o bolsa siempre que el paso de fluido esté estrechamente regulado mediante una válvula unidireccional para evitar que el instrumento se contamine durante una ejecución. Además, con frecuencia será deseable que la bolsa o su accesorio se selle tras la operación para impedir que escape ADN contaminante de la bolsa. Se conocen diversos medios para proporcionar reactivos bajo demanda tales como bombas de jeringa, y para realizar un contacto de fluido temporal con el accesorio o la bolsa, tales como ajustes con púas o juntas tóricas. Se entiende que cualquiera de estos procedimientos de introducción de fluidos en el blíster apropiado se pueden utilizar con cualquiera de las realizaciones de la bolsa tal como se comenta en el presente documento, tal como puede venir dictado por las necesidades de una aplicación particular.

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

50 Volviendo a la figura 1, la muestra de ácidos nucleicos entra en la zona de amplificación de primera etapa 60 a través del canal 52 y se suministra al blíster 61. Se puede proporcionar una mezcla de PCR, que incluye una polimerasa (de manera ilustrativa una polimerasa Taq), dNTP y una serie de pares de cebadores para amplificación de múltiplex, en el blíster 61 o se puede introducir en el blíster 61 a través de diversos medios, tal como se comentó anteriormente. Alternativamente, se pueden colocar en puntos reactivos secos sobre la ubicación del blíster 61 tras el ensamblaje de la bolsa 10, y se puede introducir agua o tampón al blíster 61, de manera ilustrativa a través del émbolo 68, tal como se muestra en la figura 1. Tal como se observa mejor en la figura 4, la muestra está ahora fijada en el blíster 61 mediante las válvulas de pinza 59 y 72, y se realizan ciclos térmicos entre dos o más temperaturas, de manera ilustrativa mediante bloques térmicos o dispositivos de Peltier que están ubicados en el instrumento y configurados para entrar en contacto con el blíster 61. Sin embargo, se entiende que otros medios de calentamiento y enfriamiento de la muestra contenida dentro del blíster 61, tal como se conoce en la materia, están dentro del alcance de la presente invención. Entre los ejemplos no limitativos de dispositivos de calentamiento/enfriamiento alternantes para realizar ciclos térmicos se incluyen tener un blíster con ciclo de aire dentro de la cámara de aire, en los que el aire en el blíster neumático adyacente al blíster 61 se somete a un ciclo entre dos o más temperaturas; o desplazar la muestra hasta zonas de temperatura dentro del blíster 61, de manera ilustrativa utilizando una serie de

prensas neumáticas, tal como en la Patente US10/478,453, o trasladar la bolsa 10 en un eje o dotar la bolsa 10 de una disposición rotatoria y centrifugar la bolsa 10 para desplazar el contenido entre zonas calientes de temperatura fija.

5 Con frecuencia ácidos nucleicos de patógenos se aíslan conjuntamente con cantidades considerables de ácidos nucleicos de huésped. Estos ácidos nucleicos derivados de huésped interaccionan con frecuencia con cebadores, dando como resultado la amplificación de productos no deseados que, a continuación, eliminan cebadores, dNTP y actividad polimerasa, privando posiblemente de recursos a un producto deseado. En general los ácidos nucleicos de organismos patógenos son poco abundantes, y el producto no deseado es un posible problema. El número de ciclos en la reacción de primera etapa de la zona 60 se puede optimizar para maximizar productos específicos y minimizar productos no específicos. Se espera que el número óptimo de ciclos sea de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 30 ciclos, de manera ilustrativa entre aproximadamente 15 y aproximadamente 20 ciclos, pero se entiende que el número de ciclos puede variar dependiendo de la diana, huésped y secuencia de cebador particulares.

15 Tras la amplificación de múltiplex de primera etapa, se diluye el producto de amplificación de primera etapa, de manera ilustrativa en mezcla maestra de PCR incompleta, antes de la transferencia fluida a sitios de reacción secundaria.

20 La figura 4 muestra una realización ilustrativa para diluir la muestra en tres etapas. En la primera etapa, se abre la válvula de pinza 72 y la muestra experimenta una dilución de dos veces mezclando la muestra en el blíster 61 con un volumen igual de agua o tampón a partir del blíster 62, que se proporciona al blíster 62, así como a los blísteres 64 y 66, tal como se comentó anteriormente. La presión del volumen hacia delante y hacia atrás entre los blísteres 61, 62 proporciona un mezclado exhaustivo. Tal como anteriormente, se puede proporcionar mezclado mediante cámaras de aire neumáticas proporcionadas en la cámara de aire 710 y ubicadas adyacentes a los blísteres 61, 62. Las cámaras de aire neumáticas se pueden presurizar de manera alternante, forzando el líquido hacia delante y hacia atrás. Durante el mezclado, una válvula de pinza 74 evita el flujo de líquido al interior de los blísteres adyacentes. Al final del mezclado, un volumen de la muestra diluida se captura en la zona 70, y se cierra la válvula de pinza 72, sellando la muestra diluida en la zona 70. Se abre la válvula de pinza 74 y se diluye adicionalmente la muestra mediante agua o tampón proporcionado en cualquiera o ambos de los blísteres 63, 64. Tal como anteriormente, apretar el volumen hacia delante y hacia atrás entre los blísteres 63, 64 proporciona mezclado. Posteriormente, se cierra la válvula de pinza 74, sellando un volumen diluido adicionalmente de muestra en la zona 71. La dilución final tiene lugar de manera ilustrativa utilizando tampón o agua proporcionado en cualquiera o ambos de los blísteres 65, 66, con mezclado como anteriormente. De manera ilustrativa esta dilución final tiene lugar utilizando una mezcla maestra de PCR incompleta (por ejemplo, que contiene todos los reactivos de PCR excepto los cebadores) como fluido. El calentamiento opcional del contenido del blíster 66 antes de la amplificación de segunda etapa puede proporcionar los beneficios de amplificación de inicio en caliente sin necesidad de anticuerpos o enzimas caros. Sin embargo, se entiende que se puede utilizar agua u otro tampón para la dilución final, con componentes de PCR adicionales proporcionados en la zona de amplificación de segunda etapa 80. Aunque la realización ilustrativa utiliza tres etapas de dilución, se entiende que se puede utilizar cualquier número de etapas de dilución, para proporcionar un nivel adecuado de dilución. Asimismo se entiende que la cantidad de dilución se puede controlar ajustando el volumen de la muestra capturada en las zonas 70 y 71, en el que cuanto menor es la cantidad de muestra capturada en las zonas 70 y 71, mayor es la cantidad de dilución o en el que alícuotas adicionales capturadas en la zona 70 y/o la zona 71 abriendo y cerrando repetidamente las válvulas de pinza 72 y 74 y/o las válvulas de pinza 74 y 76 se pueden utilizar para reducir la cantidad de dilución. Se espera que una dilución de aproximadamente 10^{-2} a aproximadamente 10^{-5} sea adecuada para muchas aplicaciones.

El éxito de las reacciones de PCR secundarias depende del molde generado mediante la reacción de primera etapa de múltiplex. Normalmente, la PCR se realiza utilizando ADN de alta pureza. Procedimientos tales como extracción con fenol o kits de extracción de ADN comerciales proporcionan ADN de alta pureza. Las muestras procesadas a través de la bolsa 10 pueden requerir que se realicen adaptaciones para compensar una preparación menos pura. La PCR se puede inhibir mediante componentes de muestras biológicas, lo cual es un posible obstáculo. De manera ilustrativa, se puede utilizar opcionalmente PCR de inicio en caliente, concentración superior de enzima polimerasa taq, ajustes de la concentración de $MgCl_2$, ajustes de la concentración de cebadores y adición de adyuvantes (tales como DMSO, TMSO o glicerol) para compensar una pureza de ácidos nucleicos inferior. Aunque es probable que las cuestiones de pureza supongan una mayor preocupación con la amplificación de primera etapa, se entiende que también se pueden proporcionar ajustes similares en la amplificación de segunda etapa.

Tras la PCR de primera etapa y dilución, el canal 78 transfiere la muestra a una serie de blísteres de bajo volumen 82 para PCR anidada secundaria. En una realización ilustrativa, cebadores secos proporcionados en los blísteres de segunda etapa se resuspenden mediante el material acuoso entrante para completar la mezcla de reacción. Opcionalmente, colorantes fluorescentes tales como LCGreen® Plus (Idaho Technology, Salt Lake City, UT) utilizados para la detección de ácidos nucleicos de cadena doble se pueden proporcionar en cada blíster o se pueden añadir a la mezcla maestra de PCR incompleta proporcionada al final de la dilución en serie, aunque se entiende que LCGreen® Plus sólo es ilustrativo y que hay otros colorantes disponibles, tal como se conocen en la materia. En otra realización opcional, sondas oligonucleotídicas marcadas de manera fluorescente y secas

configuradas para cada amplición específico se pueden proporcionar en cada blíster de segunda etapa respectivo, junto con los cebadores secos respectivos. Además, aunque la bolsa 10 está diseñada para contener todas las reacciones y manipulaciones dentro de la misma, para reducir la contaminación, en algunas circunstancias puede ser deseable retirar los productos de amplificación a partir de cada blíster 82 para realizar análisis adicionales. Otros medios para la detección del amplición de segunda etapa, tal como se conocen en la materia, están dentro del alcance de la presente invención. Una vez transferida la muestra a los blísteres 82, se activan las válvulas de pinza 84 y 86 para cerrar los blísteres 82. Cada blíster 82 contiene ahora todos los reactivos necesarios para la amplificación de una diana particular. De manera ilustrativa, cada blíster puede contener un par de cebadores único, o una serie de blísteres 82 pueden contener los mismos cebadores para proporcionar varias amplificaciones repetidas.

Se observa que las realizaciones dadas a conocer en el presente documento utilizan blísteres para la amplificación de segunda etapa, en las que los blísteres están formados de una película de plástico igual o similar al resto de la porción flexible. Sin embargo, en muchas realizaciones, el contenido de los blísteres de segunda etapa nunca se retira de los blísteres de segunda etapa, y, por tanto, no existe ninguna necesidad de que la reacción de segunda etapa tenga lugar en blísteres flexibles. Se entiende que la reacción de segunda etapa puede tener lugar en una serie de cámaras rígidas, semirrígidas o flexibles que están conectadas por conexión de fluido a los blísteres. Las cámaras se pueden sellar, tal como en el presente ejemplo, imponiendo presión sobre canales flexibles que conectan las cámaras, o se pueden sellar de otras maneras, de manera ilustrativa mediante sellado térmico o utilización de válvulas de una vía. Diversas realizaciones comentadas en el presente documento incluyen blísteres proporcionados únicamente para la recogida de residuos. Dado que los residuos pueden no retirarse nunca, los residuos se pueden recoger en cámaras rígidas, semirrígidas o flexibles.

Está dentro del alcance de la presente invención realizar la amplificación de segunda etapa con los mismos cebadores utilizados en la amplificación de primera etapa (ver la Patente US6,605,451). Sin embargo, con frecuencia resulta ventajoso tener cebadores en reacciones de segunda etapa que son internos para el producto de primera etapa de tal manera que no existe ningún solapamiento, o existe un solapamiento mínimo, entre los sitios de unión a cebador de primera y segunda etapa. La dilución de producto de primera etapa elimina en gran medida la contribución del ADN de molde original y reactivos de primera etapa a la reacción de segunda etapa. Además, de manera ilustrativa, los cebadores de segunda etapa con una T_f superior a la de los utilizados en la primera etapa se pueden utilizar para potenciar la amplificación anidada. De manera ilustrativa, los productos de segunda etapa pueden tener entre aproximadamente 100 y aproximadamente 140 pares de bases y tener valores de T_f de $65\text{ }^\circ\text{C} \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$. Una T_f de aproximadamente $65\text{ }^\circ\text{C}$ permite la amplificación con dos temperaturas eficaz. En la amplificación de segunda etapa, se prevén parámetros ilustrativos de $94\text{ }^\circ\text{C}$ durante 0-5 segundos pasando a $65\text{ }^\circ\text{C}$ durante 15 segundos. Se puede diseñar un cebador para evitar horquillas significativas, hetero/homo-dímeros e hibridación no deseada. Debido al formato anidado, los cebadores de segunda etapa toleran interacciones perjudiciales mucho más que los cebadores utilizados para amplificar dianas a partir de ADN genómico en una única etapa. Opcionalmente, se utiliza inicio en caliente en la amplificación de segunda etapa.

Si se incluye un colorante fluorescente en la amplificación de segunda etapa, de manera ilustrativa como colorante de unión a ADNcd o como parte de una sonda fluorescente, tal como se conocen en la materia, se pueden utilizar dispositivos ópticos proporcionados para monitorizar la amplificación de una o varias de las muestras. Opcionalmente, se puede proporcionar análisis de la forma de la curva de amplificación para denominar a cada muestra positiva o negativa. Se comentan procedimientos ilustrativos de denominación de la muestra en la Patente US6,730,501. Alternativamente, se pueden utilizar procedimientos que emplean un umbral de cruce. Se puede proporcionar un ordenador de manera externa o dentro del instrumento y se puede configurar para realizar los procedimientos y denominar a la muestra positiva o negativa basándose en la presencia o ausencia de amplificación de segunda etapa. Sin embargo, se entiende que se pueden utilizar otros procedimientos, tal como se conocen en la materia, para denominar a cada muestra. Se pueden realizar otros análisis con la información fluorescente. Un ejemplo no limitativo de este tipo es la utilización de análisis de curva de fusión para mostrar características de fusión apropiadas (por ejemplo T_f , forma de perfil de fusión) del amplición. Se pueden configurar los dispositivos ópticos proporcionados para capturar imágenes de todos los blísteres 82 de una vez, o se pueden proporcionar dispositivos ópticos individuales para cada blíster individual. Otras configuraciones están dentro del alcance de la presente invención.

La figura 5 muestra una bolsa 110 alternativa. En esta realización, se cargan diversos reactivos en la bolsa 110 a través del accesorio 190. La figura 5a muestra una sección transversal del accesorio 190 con uno de una serie de émbolos 168. Se entiende que, aunque la figura 5a muestra una sección transversal a través del canal de entrada 115a, tal como se muestra en la realización de la figura 5, existen 12 canales de entrada presentes (canal de entrada 115a a 115i), cada uno de los cuales puede tener su propio émbolo 168 para su utilización en el accesorio 190, aunque en esta configuración particular, los canales de entrada 115c, 115f y 115i no se utilizan. Se entiende que una configuración que tiene 12 canales de entrada sólo es ilustrativa, y que se puede utilizar cualquier número de canales de entrada y émbolos asociados. En la realización ilustrativa, un puerto de vacío opcional 142 del accesorio 190 está formado a través de una primera superficie 194 del accesorio 190 para comunicarse con la cámara 192. El puerto de vacío opcional 142 se puede proporcionar para la comunicación con un vacío o cámara de vacío (no mostrado) para aspirar hacia fuera el aire desde dentro de la bolsa 110 para crear un vacío dentro de la

cámara 192 y los diversos blísteres y cámaras de la bolsa 110. A continuación, se inserta el émbolo 168 lo suficientemente dentro de la cámara 192 como para sellar el puerto de vacío 142. La cámara 192 se proporciona de manera ilustrativa bajo una cantidad predeterminada de vacío para aspirar un volumen de líquido deseado al interior de la cámara 192 tras su utilización. Se puede encontrar información adicional sobre la preparación de la cámara 192 en la Patente US10/512,255.

El accesorio 190 ilustrativo incluye, además, un puerto de inyección 141 formado en la segunda superficie 195 del accesorio 190. De manera ilustrativa, el puerto de inyección 141 está situado más cerca de la porción de película de plástico de la bolsa 110 que el puerto de vacío 142, tal como se muestra en la figura 5a, de tal manera que el émbolo 168 se inserta hasta la suficiente profundidad como para sellar el puerto de vacío 142, al tiempo que todavía permite el acceso a la cámara 192 a través del puerto de inyección 141. Tal como se muestra, la segunda superficie 119 de la porción de película de plástico 117 proporciona un sello penetrable 139 para prevenir la comunicación entre la cámara 192 y la atmósfera circundante a través del puerto de inyección 141. Sin embargo, se entiende que opcionalmente la segunda superficie 119 puede no extenderse hasta el puerto de inyección 141 y se pueden emplear diversos otros sellos. Además, si se desea otra ubicación para el sello, por ejemplo en una primera superficie 194 del accesorio 190, el puerto de inyección 141 puede incluir un canal hasta esa ubicación en el accesorio 190. La Patente US10/512,255 muestra diversas configuraciones en las que el sello está ubicado de manera remota con respecto al puerto de inyección, y el sello está conectado a la cámara a través de un canal. Asimismo, la Patente US10/512,255 da a conocer diversas configuraciones en las que canales conectan un único sello con múltiples cámaras. Las variaciones en la ubicación del sello, así como la conexión de un único puerto de inyección a múltiples cámaras, están dentro del alcance de la presente invención. Opcionalmente, el sello 139 puede ser frangible y se puede romper tras la inserción de una cánula (no mostrada), para permitir extraer o forzar una muestra de fluido desde el interior de la cánula hasta el interior de la cámara 192.

El émbolo 168 ilustrativo del conjunto de bolsa 110 tiene forma cilíndrica y tiene un diámetro de aproximadamente 5 mm para ajustarse a presión en la cámara 192. El émbolo 168 incluye una primera porción de extremo 173 y una segunda porción de extremo opuesta 175. Tal como se muestra en la figura 5a, una muesca 169 del émbolo 168 está formada en la segunda porción de extremo 175. En utilización, la segunda porción de extremo 175 se inserta parcialmente en el interior de la cámara 192, y la muesca 169 se puede alinear con el puerto de inyección 141 para permitir introducir o inyectar una muestra de fluido al interior de la cámara 192, aunque el émbolo 168 se inserte hasta la suficiente profundidad de modo que el émbolo 168 bloquearía de otro modo el puerto de inyección 141.

De manera ilustrativa, se coloca un fluido en un recipiente (no mostrado) con una jeringa que tiene una punta canulada que se puede insertar en el interior del puerto de inyección 141 para perforar el sello 139 en el mismo. Al utilizar un conjunto de bolsa con aire evacuado 110, cuando se perfora el sello 139, se extrae el fluido a partir del recipiente debido a la presión negativa dentro de la cámara 192 con respecto a la presión de aire ambiental. Entonces pasa fluido a través del puerto 141 para llenar la cámara 192. En este punto, habitualmente el fluido no fluye al interior de la porción de película de plástico 117 de la bolsa 110. Finalmente, se inserta el émbolo 168 en la cámara 192 de tal manera que la segunda porción de extremo 175 del émbolo 168 se aproxima al fondo 191 de la cámara 192, para empujar una cantidad medida del reactivo o la muestra al interior de la porción de película de plástico 117. Tal como se muestra, el émbolo 168 está configurado de tal manera que, tras la inserción completa, la segunda porción de extremo 175 no llega totalmente hasta el fondo 191 de la cámara 192. El espacio restante es útil para atrapar burbujas, reduciendo así el número de burbujas que entran en la porción de película de plástico 117. Sin embargo, en algunas realizaciones puede ser deseable que la segunda porción de extremo 175 llegue hasta el fondo 191 tras la inserción completa del émbolo 168. En la realización mostrada en la figura 5, los canales de entrada 115a, 115b, 115d, 115e, 115g, 115h, 115j, 115k y 115l conducen todos ellos a zonas de reacción o blísteres de depósito. Se entiende que la inserción completa del émbolo asociado con el canal de entrada 115a forzará una muestra al interior del blíster de tres lóbulos 122, la inserción completa del émbolo asociado con el canal de entrada 115b forzará un reactivo al interior del blíster de depósito 101, la inserción completa del émbolo asociado con el canal de entrada 115d forzará un reactivo al interior del blíster de depósito 102, la inserción completa del émbolo asociado con el canal de entrada 115e forzará un reactivo al interior del blíster de depósito 103, la inserción completa del émbolo asociado con el canal de entrada 115g forzará un reactivo al interior del blíster de depósito 104, la inserción completa del émbolo asociado con el canal de entrada 115h forzará un reactivo al interior del blíster de depósito 105, la inserción completa del émbolo asociado con el canal de entrada 115j forzará un reactivo al interior del blíster de depósito 106, la inserción completa del émbolo asociado con el canal de entrada 115k forzará un reactivo al interior del blíster de depósito 107, y la inserción completa del émbolo asociado con el canal de entrada 115l forzará un reactivo al interior del blíster de depósito 108.

Si se utiliza un diseño de émbolo que incluye una muesca 169 tal como se ilustra en la realización mostrada en la figura 5a, el émbolo 168 se puede hacer rotar antes de hacerse descender, para desviar la muesca 169 y cerrar el puerto de inyección 141 frente a la comunicación con la cámara 192, para sellar el contenido en la misma. Esto actúa para minimizar cualquier posible flujo de retorno de fluido a través del puerto de inyección 141 hasta la atmósfera circundante, lo cual es particularmente útil cuando se desea retardar la inserción completa del émbolo. Aunque anteriormente se muestra y se describe la muesca 169 con respecto al émbolo 168, también está dentro del alcance de la presente invención cerrar el puerto de inyección 141 poco después de dispensar la muestra de fluido al interior de la cámara 192 mediante otros medios, tales como presionando el émbolo 168 hacia el fondo de la

cámara 192, mediante sellado térmico, válvulas unidireccionales u puertos autosellantes, por ejemplo. Si se utiliza sellado térmico como procedimiento de sellado, se puede incluir una barra de sellado en el instrumento de tal manera que se realiza el sellado térmico de todas las cámaras tras la inserción de la bolsa en el instrumento.

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

15 Tras la activación del émbolo 168 asociado con el canal de entrada 115a, se fuerza la muestra directamente al interior del blíster de tres lóbulos 122 a través del canal 114. El usuario presiona, además, los émbolos 168 restantes, forzando el contenido fuera de cada una de las cámaras 192 en el accesorio 190 y al interior de los blísteres de depósito 101 a 108. En este punto, se carga la bolsa 110 en el interior de un instrumento para su procesamiento. Aunque el instrumento 800, mostrado en la figura 8, está configurado para la bolsa 210 de la figura
20 6, se entiende que una modificación de la configuración de las cámaras de aire del instrumento 800 hará que el instrumento 800 sea adecuado para su utilización con la bolsa 110, o con bolsas de otras configuraciones.

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

Una vez que se ha colocado la bolsa 110 en el interior del instrumento 800 y se ha desplazado la muestra al blíster de tres lóbulos 122, se puede someter la muestra a alteración mediante agitación de la muestra con partículas de lisis tales como ZS o perlas cerámicas. Las partículas de lisis se pueden proporcionar en el blíster de tres lóbulos
35 122, o se pueden inyectar en el blíster de tres lóbulos 122 junto con la muestra. El blíster de tres lóbulos 122 de la figura 5 se hace funcionar de la misma manera que el blíster de tres lóbulos 22 de la figura 1, con los dos lóbulos inferiores 124, 126 presurizados juntos, y se alterna la presión entre el lóbulo superior 128 y los dos lóbulos inferiores 124, 126. Sin embargo, tal como se ilustra, los lóbulos inferiores 124, 126 están mucho más redondeados
40 que los lóbulos inferiores 24, 26, permitiendo un flujo suave de perlas al canal 130 y permitiendo colisiones a alta velocidad, incluso sin el separador de flujo triangular en el nexo 32. Al igual que con el blíster de tres lóbulos 22, el blíster de tres lóbulos 122 de la figura 5 permite la alteración o lisis eficaz de microorganismos, células y partículas virales en la muestra. Se ha encontrado que un canal 130 que tiene una anchura de aproximadamente 3-4 mm, y de manera ilustrativa aproximadamente 3,5 mm, permanece relativamente despejado de perlas durante la lisis y es
45 eficaz para proporcionar colisiones a alta velocidad.

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

A continuación, se bombea la disolución al interior del blíster 144 de la "figura 8" a través del canal 143, en el que las perlas se capturan mediante un imán retráctil alojado en el instrumento, que de manera ilustrativa se acciona neumáticamente. El proceso de captura de perlas comienza presurizando todos los lóbulos 124, 126 y 128 del aparato de molienda con perlas 122. Esto fuerza gran parte del contenido de líquido de 122 a través del canal 143 y al interior del blíster 144. Se pone un imán en contacto con la porción inferior 144b del blíster 144 y se incuba la muestra durante varios segundos para permitir que el imán capture las perlas a partir de la disolución, a
55 continuación, se despresurizan las cámaras de aire adyacentes al blíster 122, se presurizan las cámaras de aire adyacentes a las porciones 144a y 144b del blíster, y se fuerza el líquido de vuelta al interior del blíster 122. Dado que no todas las perlas se capturan en un único pase, este proceso se puede repetir hasta 10 veces para capturar sustancialmente todas las perlas en el blíster 144. A continuación, se fuerza el líquido fuera del blíster 144, dejando sólo las perlas magnéticas y los ácidos nucleicos capturados, y se introducen reactivos de lavado en el interior del blíster 144 en dos lavados sucesivos (a partir de los blísteres de depósito 102 y 103 a través de los canales 145 y 147, respectivamente). En cada lavado, se presuriza la cámara de aire situada sobre el blíster de depósito que contiene el reactivo de lavado, forzando el contenido al interior del blíster 144. Se retira el imán y se altera el

5 sedimento que contiene las perlas magnéticas presurizando alternativamente cada una de dos cámaras de aire que cubren cada lóbulo 144a y 144b del blíster 144. Cuando se comprime el lóbulo superior 144a, se fuerza el contenido líquido al interior del lóbulo inferior 144b, y cuando se comprime el lóbulo inferior 144b, se fuerza el contenido al interior del lóbulo superior 144a. Agitando la disolución en el blíster 144 entre el lóbulo superior 144a y el lóbulo inferior 144b, se eliminan eficazmente mediante lavado las impurezas de las perlas magnéticas. Se mantiene un equilibrio entre agitación inadecuada, que deja el sedimento de perlas sin alterar, y agitación excesiva, que elimina posiblemente mediante lavado los ácidos nucleicos de la superficie de las perlas y los pierde con los reactivos de lavado. Tras cada ciclo de lavado, se capturan las perlas magnéticas mediante el imán en el blíster 144 y se fuerzan los reactivos de lavado de manera ilustrativa al interior del blíster de tres lóbulos 122, que ahora sirve como un receptáculo de residuos. Sin embargo, se entiende que los blísteres de depósito utilizados pueden servir, además, como receptáculos de residuos, o se pueden proporcionar otros blísteres específicamente como receptáculos de residuos.

15 A continuación, se inyecta tampón de elución de ácidos nucleicos a partir del blíster de depósito 104 a través del canal 149 al interior del blíster 144, se agita la muestra una vez más, y se vuelven a capturar las perlas magnéticas empleando el imán. La mezcla fluida en el blíster 144 ahora contiene ácidos nucleicos a partir de la muestra original. La presión sobre el blíster 144 desplaza la muestra de ácidos nucleicos al blíster de PCR de primera etapa 161 a través del canal 152, en el que se mezcla la muestra con mezcla maestra de PCR de primera etapa que contiene múltiples conjuntos de cebadores, proporcionándose la mezcla maestra de PCR a partir del blíster de depósito 105 a través del canal 162. Si se desea, la muestra y/o la mezcla maestra de PCR de primera etapa se pueden calentar antes del mezclado, para proporcionar ventajas de inicio en caliente. Tal como se verá a continuación, la bolsa 110 de la figura 5 está configurada para hasta 10 conjuntos de cebadores, pero se entiende que la configuración se puede alterar y se puede utilizar cualquier número de conjuntos de cebadores. Una cámara de aire situada sobre el blíster 161 se presuriza a baja presión, para forzar el contenido del blíster 161 a entrar en contacto íntimo con un elemento de calentamiento/enfriamiento, de manera ilustrativa un elemento de Peltier, en el otro lado del blíster 161. La presión sobre el blíster 161 debe ser suficiente para garantizar un buen contacto con el elemento de calentamiento/enfriamiento, pero debe ser lo suficientemente suave de tal manera que no se fuerce fluido desde el blíster 161. El elemento de calentamiento/enfriamiento se somete a ciclos de temperatura, de manera ilustrativa entre aproximadamente 60 °C y aproximadamente 95 °C. De manera ilustrativa, se realizan ciclos de temperatura durante aproximadamente 15-20 ciclos, dando como resultado la amplificación de una o varias dianas de ácidos nucleicos presentes. Asimismo de manera ilustrativa, los ciclos de temperatura se detienen antes de la fase de meseta y se pueden detener en la fase logarítmica o incluso antes de la fase logarítmica. En un ejemplo, puede ser deseable enriquecer simplemente la muestra con los amplicones deseados, sin alcanzar niveles mínimos de detección. Véase la Patente US6,605,451.

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

55 De manera ilustrativa, la mezcla maestra de PCR utilizada para amplificación de segunda etapa carece de los cebadores, pero por lo demás está completa. Sin embargo, una mezcla maestra de PCR "incompleta" puede carecer, además, de otros componentes de PCR. En un ejemplo, la mezcla maestra de PCR de segunda etapa es únicamente agua o tampón, que a continuación, se mezcla con el producto de amplificación por PCR de primera etapa opcionalmente diluido. Se desplaza esta mezcla a los blísteres de reacción de PCR de pequeño volumen, en los que se han proporcionado previamente todos los componentes restantes. Si se desea, todos los componentes restantes se pueden mezclar entre sí y colocarse en puntos como una única mezcla en el interior de los blísteres de reacción de PCR de pequeño volumen. Alternativamente, tal como se ilustra en la figura 5b, cada uno de los componentes se puede colocar en puntos sobre una zona independiente del blíster de reacción de PCR de pequeño volumen 182. Tal como se muestra en la figura 5b, están presentes cuatro zonas, de manera ilustrativa con dNTP colocados en puntos en la zona 182a, cebadores colocados en puntos en 182b, polimerasa colocada en puntos en 182c, y un compuesto de magnesio colocado en puntos en 182d. Colocando en puntos los componentes de manera

independiente y calentando la mezcla de muestra antes de rehidratar los componentes, se pueden minimizar las reacciones no específicas. Se entiende que de esta manera se puede colocar en puntos cualquier combinación de componentes, y que este procedimiento de colocar componentes en puntos en una o varias zonas de los blísteres se puede utilizar con cualquier realización de la presente invención.

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

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

20 La bolsa descrita anteriormente en la figura 5 incluye los blísteres de depósito de reactivo 101 a 108, en la que el usuario inyectó reactivos desde el accesorio 190 al interior de los blísteres de depósito de reactivo 101 a 108 en la porción de película de plástico 117 de la bolsa 110, de manera ilustrativa antes de la inserción de la bolsa 110 en el instrumento. Aunque existen ventajas en cuanto a la utilización de los blísteres de depósito de reactivo de la figura 5, incluyendo tener la capacidad de mantener el contenido de los diversos blísteres a temperaturas diferentes, existen, además, algunas desventajas. Dado que el operario es responsable de desplazar los reactivos desde el accesorio 190 hasta los blísteres de depósito 101 a 108, y dado que con frecuencia esto se realiza fuera de la máquina y por tanto sin válvulas de pinza activadas, ocasionalmente se pueden producir fugas de reactivos desde los blísteres de depósito hasta los blísteres de trabajo. Los reactivos en los blísteres de depósito están expuestos durante la preparación y la carga. Si se presionan, aprietan o incluso se bombean ligeramente, se pueden producir fugas de los reactivos a través de canales disponibles. Si la pérdida de reactivos es sustancial, se puede producir un fallo completo de la reacción. Además, durante el funcionamiento, puede existir algo de variabilidad en la cantidad de reactivo forzado desde los blísteres de depósito 101 a 108, conduciendo a resultados no sistemáticos. La automatización de la introducción de los reactivos en el accesorio 190 y el desplazamiento de los reactivos desde el accesorio 190 hasta los blísteres de depósito de reactivo 101 a 108 resolverá muchos de estos problemas, y está dentro del alcance de la presente invención.

40 La bolsa 210 de la figura 6 aborda muchas de estas cuestiones de una manera diferente, utilizando un enfoque de inyección directa en el que el propio instrumento desplaza los émbolos 268, de manera ilustrativa mediante pistones neumáticos, y fuerza los reactivos al interior de los diversos blísteres de trabajo a medida que se necesitan los reactivos. En lugar de almacenar los reactivos en los blísteres de depósito 101 a 108 de la figura 5, en la realización de la figura 6 los reactivos se introducen en diversas cámaras 292 del accesorio 290 y se mantienen ahí hasta que se necesitan. El funcionamiento neumático del pistón 268 en el momento apropiado introduce una cantidad medida del reactivo en el blíster de reacción apropiado. Además de abordar muchas de las cuestiones mencionadas anteriormente, la bolsa 210 tiene, además, una forma mucho más compacta, permitiendo un diseño de instrumento más pequeño, y la bolsa 210 tiene canales más cortos, permitiendo un mejor flujo de fluido y minimizando la pérdida de reactivo en los canales.

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

60 Tal como se muestra en la figura 6, el agua inyectada a través del sello 293b se distribuye a diversas cámaras a través del canal 293. En esta realización, sólo se necesita inyectar la muestra y agua en la bolsa 210. Sin embargo, se entiende que se puede inyectar agua en cada cámara 292 independientemente. Además, se entiende que, en lugar de proporcionar reactivos secos en las diversas cámaras 292 e hidratarlos tras la inyección del agua, se pueden inyectar reactivos húmedos específicos en cada cámara, según se desee. Adicionalmente, se entiende que una o varias de las cámaras 292 se pueden proporcionar únicamente con agua, y se pueden proporcionar los reactivos necesarios secados en los blísteres de reacción apropiados. Diversas combinaciones de lo anterior, según vengan dictadas por las necesidades de la reacción particular, están dentro del alcance de la presente invención.

- 5 Tal como se observa en la figura 6, se proporcionan protuberancias opcionales 213 en la superficie de fondo 297 del accesorio 290. Tal como se muestra, las protuberancias 213 están ubicadas dentro de sus canales de entrada 215 respectivos. Sin embargo, otras configuraciones son posibles. Las protuberancias 213 ayudan a abrir el canal de entrada 215 y evitar que la superficie de fondo 297 se enganche con otra superficie plana de tal manera que pellizquen los canales de entrada 215 cuando se presionan los émbolos 268, lo cual ayuda a prevenir el flujo de retorno tras la activación de los émbolos 268. Dichas protuberancias se pueden utilizar en cualquiera de las diversas bolsas según la presente invención.
- 10 En realizaciones en las que se inyecta agua en la bolsa para hidratar múltiples reactivos secos en múltiples cámaras en el accesorio, se desean unos medios de cierre del canal entre el puerto de inyección y las muchas cámaras. Si el canal no se cierra, la activación de cada émbolo puede forzar parte del contenido de su cámara respectiva de vuelta al interior del canal, contaminando potencialmente cámaras cercanas y alterando los volúmenes contenidos en la cámara y suministradas desde la primera. Se han utilizado varias maneras de cerrar este canal, incluyendo hacer
- 15 rotar un émbolo 268 con muescas tal como se comentó anteriormente, y realizando el sellado térmico de la película de plástico a través del canal cerrando así el canal de manera permanente, y aplicando presión al canal como una válvula de pinza. Asimismo se pueden utilizar otros cierres, tales como válvulas incorporadas en el accesorio, de manera ilustrativa válvulas unidireccionales.
- 20 Tras cargar los fluidos en las cámaras 292 y cargarse la bolsa 210 en el instrumento, se presiona el émbolo 268a de manera ilustrativa mediante activación de un pistón neumático, forzando el resto de la muestra al interior del blíster de tres lóbulos 220 a través del canal 214. Tal como con las realizaciones mostradas en las figuras 1 y 5, los lóbulos 224, 226 y 228 del blíster de tres lóbulos 220 se comprimen secuencialmente mediante las cámaras de aire de accionamiento 824, 826 y 828 del conjunto de cámara de aire 810, mostrado en las figuras 7-9, forzando el líquido a
- 25 través del nexo estrecho 232 entre los lóbulos, y accionando colisiones a alta velocidad, sometiendo la muestra a cizalladura y liberando ácidos nucleicos, incluyendo de manera ilustrativa ácidos nucleicos a partir de esporas difíciles de abrir, bacterias y hongos. La lisis celular continúa durante un periodo de tiempo apropiado, de manera ilustrativa de 0,5 a 10 minutos.
- 30 Una vez realizada la lisis adecuada de las células, se activa el émbolo 268b y se inyectan perlas magnéticas de unión a ácidos nucleicos almacenadas en la cámara 292b a través del canal 236 al interior del lóbulo superior 228 del blíster de tres lóbulos 220. Se mezcla la muestra con las perlas magnéticas y se deja que se incube la mezcla durante un periodo de tiempo apropiado, de manera ilustrativa aproximadamente de 10 segundos a 10 minutos.
- 35 Se fuerza la mezcla de muestra y perlas a través del canal 238 al interior del blíster 244 mediante accionamiento de la cámara de aire 826, a continuación, a través del canal 243 y al interior del blíster 246 mediante accionamiento de la cámara de aire 844, en el que un imán retráctil 850 ubicado en el instrumento 800 adyacente al blíster 245, mostrado en la figura 8, captura las perlas magnéticas a partir de la disolución, formando un sedimento contra la superficie interior del blíster 246. A continuación, una cámara de aire neumática 846, situada sobre el blíster 246
- 40 fuerza el líquido fuera del blíster 246 y de vuelta a través del blíster 244 y al interior del blíster 222, que ahora se utiliza como receptáculo de residuos. Sin embargo, tal como se comentó anteriormente con respecto a la figura 5, otros receptáculos de residuos están dentro del alcance de la presente invención. Uno de los émbolos 268c, 268d y 268e se puede activar para proporcionar una disolución de lavado al blíster 244 a través del canal 245, y a continuación, al blíster 246 a través del canal 243. Opcionalmente, se retrae el imán 850 y se lavan las perlas magnéticas desplazando las perlas hacia delante y hacia atrás a partir de los blísteres 244 y 246 a través del canal 243, presurizando alternativamente las cámaras de aire 844 y 846. Una vez lavadas las perlas magnéticas, se recapturan las perlas magnéticas en el blíster 246 mediante activación del imán 850, y a continuación, se desplaza la disolución de lavado al blíster 222. Este proceso se puede repetir según sea necesario para retirar mediante lavado el tampón de lisis y el residuo de muestra de las perlas magnéticas de unión a ácidos nucleicos. De manera
- 45 ilustrativa, se realizan tres lavados, cada uno utilizando reactivos de lavado en las cámaras 292c, 292d y 292e. Sin embargo, se entiende que más o menos lavados están dentro del alcance de la presente invención. Si se desean más lavados, se pueden proporcionar más cámaras 292. Alternativamente, cada cámara 292 puede contener un volumen mayor de fluido y la activación de los émbolos puede forzar únicamente una fracción del volumen a partir de la cámara tras cada activación.
- 50 Tras el lavado, se desplaza tampón de elución almacenado en la cámara 292f a través del canal 247 hasta el blíster 248, y se retrae el imán. Se somete la disolución a ciclos entre los blísteres 246 y 248 a través del canal 252, descomponiendo el sedimento de perlas magnéticas en el blíster 246 y permitiendo que los ácidos nucleicos capturados se disocian de las perlas y entren en la disolución. Se activa el imán 850 una vez más, capturando las
- 55 perlas magnéticas en el blíster 246, y se fuerza la disolución de ácidos nucleicos eluido al interior del blíster 248.
- 60 Se presiona el émbolo 268h y se mezcla la mezcla maestra de PCR de primera etapa a partir de la cámara 292h con la muestra de ácidos nucleicos en el blíster 248. Opcionalmente, se mezcla la mezcla mediante activación alternante de las cámaras de aire 848 y 864, forzando la mezcla entre 248 y 264 a través del canal 253. Tras varios ciclos de mezclado, la disolución está contenida en el blíster 264, en el que se realiza PCR de múltiplex de primera etapa. Si se desea, antes del mezclado, se puede retener la muestra en el blíster 246 mientras se calienta previamente la
- 65

mezcla maestra de PCR de primera etapa, de manera ilustrativa desplazando la mezcla maestra de PCR de primera etapa al interior del blíster 264 o proporcionando un calentador adyacente al blíster 248. Tal como se comentó anteriormente, este calentamiento previo puede proporcionar los beneficios de PCR de inicio en caliente. El instrumento 800 ilustrado en la figura 8 presenta cicladores térmicos basados en Peltier 886 y 888 que calientan y enfrían la muestra. Sin embargo, se entiende que se pueden utilizar otros dispositivos calentadores/enfriadores, tal como se comentó anteriormente. La realización de ciclos de temperatura se realiza de manera ilustrativa durante 15-20 ciclos, aunque otros niveles de amplificación pueden ser deseables, dependiendo de la aplicación, tal como se comentó anteriormente. Tal como se verá a continuación, la zona de amplificación de segunda etapa 280 está configurada para detectar la amplificación en 18 reacciones de segunda etapa. Por consiguiente, se pueden incluir 18 pares de cebadores diferentes en la reacción de PCR en el blíster 264.

Tras haber avanzado la PCR de primera etapa durante el número deseado de ciclos, se puede diluir la muestra tal como se comentó anteriormente con respecto a la realización de la figura 5, forzando la mayor parte de la muestra de vuelta al interior del blíster 248, dejando sólo una pequeña cantidad, y añadiendo mezcla maestra de PCR de segunda etapa desde la cámara 292i. Alternativamente, se puede desplazar un tampón de dilución desde 292i hasta el blíster 266 a través del canal 249 y, a continuación, mezclarse con la muestra amplificada en el blíster 264 desplazando los fluidos hacia delante y hacia atrás entre los blísteres 264 y 266. Tras el mezclado, una porción de la muestra diluida que queda en el blíster 264 se fuerza hasta el blíster de tres lóbulos 222, ahora el receptáculo de residuos. Si se desea, se puede repetir la dilución varias veces, utilizando tampón de dilución desde las cámaras 292j y 292k y, a continuación, añadiendo mezcla maestra de PCR de segunda etapa desde la cámara 292g hasta parte o la totalidad de la muestra amplificada diluida. Se entiende que el nivel de dilución se puede ajustar alterando el número de etapas de dilución o alterando el porcentaje de la muestra descartada antes del mezclado con el tampón de dilución o la mezcla maestra de PCR de segunda etapa. Si se desea, esta mezcla de la muestra y la mezcla maestra de PCR de segunda etapa se puede calentar previamente en el blíster 264 antes del desplazamiento hasta los blísteres de segunda etapa 282 para la amplificación de segunda etapa.

La mezcla maestra de PCR de segunda etapa ilustrativa es incompleta, careciendo de pares de cebadores, y cada uno de los 18 blísteres de segunda etapa 282 está cargado previamente con un par de cebadores de PCR específico. Si se desea, la mezcla maestra de PCR de segunda etapa puede carecer de otros componentes de reacción, y entonces estos componentes se pueden cargar, además, previamente en los blísteres de segunda etapa 282. Tal como se comentó anteriormente con los ejemplos anteriores, cada par de cebadores puede ser idéntico a un par de cebadores de PCR de primera etapa o puede estar anidado dentro del par de cebadores de primera etapa. El desplazamiento de la muestra desde el blíster 264 hasta los blísteres de segunda etapa completa la mezcla de reacción de PCR. Asimismo se desplazan muestras de control desde la cámara 292i hasta los blísteres de control 283 a través del canal 267. Las muestras de control pueden ser controles positivos o negativos, según se desee. De manera ilustrativa, cada bolsa contendrá reacciones de control que validan el funcionamiento de cada etapa en el proceso y demuestran que los resultados positivos no son resultados de autocontaminación con ácidos nucleicos amplificados anteriormente. Sin embargo, esto no resulta práctico en muchos protocolos, particularmente para una reacción altamente multiplexada. Una manera ilustrativa de proporcionar controles adecuados implica realizar adiciones conocidas en las muestras con una especie tal como levadura de panadería. Se extraen los ácidos nucleicos a partir de la levadura, junto con otros ácidos nucleicos. Reacciones de PCR de primera y segunda etapa amplifican dianas de ADN y/o ARN a partir del genoma de levadura. De manera ilustrativa, se puede utilizar una secuencia de ARNm derivada a partir de un pre-ARNm sometido a corte y empalme para generar una secuencia diana específica de ARN disponiendo las secuencias de cebadores para abarcar un intrón. Un análisis cuantitativo del número de copias de levadura frente a estándares de referencia permite una validación sustancial de que cada componente del sistema está funcionando. Las reacciones de control negativo para cada uno de los muchos ensayos de segunda etapa son más problemáticas. Puede ser deseable ejecutar reacciones de control en paralelo o en una serie independiente.

La activación de la cámara de aire 882 del conjunto de cámara de aire 810 sella las muestras en el interior de sus blísteres de segunda etapa 282, 283 respectivos, y la activación de la cámara de aire 880 proporciona una presión suave en los blísteres de segunda etapa 282, 283, para forzar los blísteres de segunda etapa 282, 283 a entrar en contacto con un dispositivo calentador/enfriador. Una ventana 897 situada sobre la zona de amplificación de segunda etapa 280 permite la monitorización de fluorescencia de la matriz durante PCR y durante un análisis de curva de fusión de ADN de los productos de reacción.

Se observa que la bolsa 210 de la figura 6 tiene varias zonas no selladas, tales como la zona no sellada 255 y la zona no sellada 256. Estas zonas no selladas forman blísteres que no participan en ninguna de las reacciones en esta realización ilustrativa. En lugar de eso, estas zonas no selladas se proporcionan en un espacio entre los blísteres de trabajo y los canales. En comparación con bolsas que están selladas en todo el espacio no utilizado, se ha encontrado que se obtienen como resultado menos fugas cuando se proporcionan zonas no selladas tales como 255 y 256, supuestamente reduciendo arrugas problemáticas en el material de película. Tales zonas no selladas se pueden proporcionar en cualquier realización de bolsa.

La figura 8 muestra un aparato 800 ilustrativo que se puede utilizar con la bolsa 210. El instrumento 800 incluye un elemento de soporte 802 que puede formar una pared de una carcasa o montarse dentro de una carcasa. El

instrumento 800 incluye, además, un segundo elemento de soporte 804 que se puede desplazar con respecto al elemento de soporte 802, para permitir la inserción y extracción de la bolsa 210. El elemento de soporte desplazable 804 se puede montar en un carril o se puede desplazar con respecto al elemento de soporte 802 de cualquiera de una variedad de maneras. De manera ilustrativa, una tapa 805 se ajusta sobre la bolsa 210 una vez que se ha insertado la bolsa 210 en el instrumento 800.

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

Cada accionador neumático tiene uno o varios ajustes neumáticos. Por ejemplo, la cámara de aire 824 del conjunto de cámara de aire 810 tiene un ajuste neumático 824a y el pistón neumático 843 tiene su ajuste neumático 843a asociado. En la realización ilustrativa, cada uno de los ajustes neumáticos del conjunto de cámara de aire 810 se extiende a través de un conducto 816 en el elemento de soporte desplazable 804, en el que un manguito 878 conecta cada ajuste neumático a la fuente de aire comprimido 895 a través de las válvulas 899. En la realización ilustrativa, los conductos 816 no sólo proporcionan acceso a la fuente de aire comprimido 895, sino que los conductos ayudan, además, en la alineación de los diversos componentes del conjunto de cámara de aire 810, de modo que las cámaras de aire se alinean apropiadamente con los blísteres de la bolsa 210.

De manera similar, el conjunto de válvula neumática 808 está montado, además, en el elemento de soporte desplazable 804, aunque se entiende que otras configuraciones son posibles. En la realización ilustrativa, pasadores 858 en el conjunto de válvula neumática 808 se montan en aberturas de montaje 859 en el elemento de soporte desplazable 804, y pistones neumáticos 843, 852, 853 y 862 se extienden a través de conductos 816 en el elemento de soporte desplazable 804, para entrar en contacto con la bolsa 210. Tal como se ilustra, el conjunto de cámara de aire está montado en un primer lado 811 del elemento de soporte desplazable 804 mientras que el conjunto de válvula neumática 808 está montado en un segundo lado 812 del elemento de soporte desplazable 804. Sin embargo, dado que los pistones neumáticos 843, 852, 853 y 862 se extienden a través de los conductos 816, los pistones neumáticos del conjunto de válvula neumática 808 y las cámaras de aire neumáticas del conjunto de cámara de aire 810 trabajan en conjunto para proporcionar los accionadores neumáticos necesarios para la bolsa 210.

Tal como se comentó anteriormente, cada uno de los accionadores neumáticos del conjunto de cámara de aire 810 y el conjunto de válvula neumática 808 tiene un ajuste neumático asociado. Aunque sólo se muestran varios manguitos 878 en la figura 8, se entiende que cada ajuste neumático está conectado a través de un manguito 878 a la fuente de gas comprimido 895. La fuente de gas comprimido 895 puede ser un compresor, o, alternativamente, la fuente de gas comprimido 895 puede ser un cilindro de gas comprimido, tal como un cilindro de dióxido de carbono. Los cilindros de gas comprimido son particularmente útiles si se desea portabilidad. Otras fuentes de gas comprimido están dentro del alcance de la presente invención.

Varios otros componentes del instrumento 810 están, además, conectados a la fuente de gas comprimido 895. El imán 850, que está montado en un primer lado 813 del elemento de soporte 802, se despliega y se retrae de manera ilustrativa utilizando gas a partir de la fuente de gas comprimido 895 a través del manguito 878, aunque en la materia se conocen otros procedimientos de desplazamiento del imán 850. El imán 850 descansa en un rebaje 851 en el elemento de soporte 802. Se entiende que el rebaje 851 puede ser un conducto a través del elemento de soporte 802, de modo que el imán 850 puede entrar en contacto con el blíster 246 de la bolsa 210. Sin embargo, dependiendo del material del elemento de soporte 802, se entiende que el rebaje 851 no necesita extenderse totalmente a través del elemento de soporte 802, siempre que cuando el imán 850 se despliega, el imán 850 esté lo suficientemente cerca como para proporcionar un campo magnético suficiente en el blíster 246, y cuando el imán 850 se retrae, el imán 850 no afecta significativamente a ninguna perla magnética presente en el blíster 246. Aunque se hace referencia a retraer el imán 850, se entiende que se puede utilizar un electroimán y se puede activar e inactivar el electroimán controlando el flujo de electricidad a través del electroimán. Por tanto, aunque esta memoria descriptiva trata de retirar o retraer el imán, se entiende que estos términos son lo suficientemente amplios como para incorporar otras maneras de retirar el campo magnético.

Los diversos pistones neumáticos 868 de la matriz de pistón neumático 869, que está montada en el soporte 802, están conectados, además, a la fuente de gas comprimido 895 a través de los manguitos 878. Aunque sólo se

muestran dos manguitos 878 que conectan los pistones neumáticos 868 a la fuente de gas comprimido 895, se entiende que cada uno de los pistones neumáticos 868 está conectado a la fuente de gas comprimido 895. Se muestran doce pistones neumáticos 868. Cuando se inserta la bolsa 210 en el instrumento 800, los doce pistones neumáticos 868 se sitúan para activar sus doce émbolos 268 respectivos de la bolsa 210. Cuando se cierra la tapa 805 sobre la bolsa 210, un reborde 806 sobre la tapa 805 proporciona un soporte para el accesorio 290, de modo que a medida que se activan los pistones neumáticos 868, la tapa 805 sujeta el accesorio 290 en su sitio. Se entiende que otros soportes para el accesorio 290 están dentro del alcance de la presente invención.

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

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

Cuando se desea detección fluorescente, se puede proporcionar una matriz óptica 890. Tal como se muestra en la figura 8, la matriz óptica 890 incluye una fuente de luz 898, de manera ilustrativa una fuente de luz de LED filtrada, luz blanca filtrada o iluminación por láser, y una cámara 896. Una ventana 897 a través del soporte desplazable 804 proporciona a la matriz óptica 890 acceso a la zona de amplificación de segunda etapa 280 de la bolsa 210. La cámara 896 tiene de manera ilustrativa una serie de fotodetectores correspondientes cada uno a un blíster de segunda etapa 282, 283 en la bolsa 210. Alternativamente, la cámara 896 puede captar imágenes que contienen todos los blísteres de segunda etapa 282, 283, y se puede dividir la imagen en campos independientes correspondientes a cada uno de los blísteres de segunda etapa 282, 283. Dependiendo de la configuración, la matriz óptica 890 puede ser estacionaria, o la matriz óptica 890 se puede colocar sobre elementos de desplazamiento unidos a uno o varios motores y desplazarse para obtener señales a partir de cada blíster de segunda etapa 282, 283 individual. Se entiende que otras disposiciones son posibles.

Tal como se muestra, un ordenador 894 controla las válvulas 899 de la fuente de aire comprimido 895, y por tanto controla todos los elementos neumáticos del instrumento 800. El ordenador 894 controla, además, los calentadores 886 y 888, y la matriz óptica 890. Cada uno de estos componentes está conectado eléctricamente, de manera ilustrativa a través de cables 891, aunque otras conexiones físicas o inalámbricas están dentro del alcance de la presente invención. Se entiende que el ordenador 894 se puede alojar dentro del instrumento 890 o puede ser externo al instrumento 890. Además, el ordenador 894 puede incluir placas de circuito incorporadas que controlan algunos o la totalidad de los componentes, y puede incluir, además, un ordenador externo, tal como un PC de sobremesa o portátil, para recibir y visualizar datos a partir de la matriz óptica. Se puede proporcionar una interfaz 893, de manera ilustrativa una interfaz de teclado, que incluye teclas para introducir información y variables tales como temperaturas, tiempos de ciclo, etc. De manera ilustrativa, se proporciona, además, un elemento de visualización 892. El elemento de visualización 892 puede ser un elemento de visualización de LED, LCD u otro de este tipo, por ejemplo.

La figura 9 muestra la relación entre el conjunto de cámara de aire 810 y la bolsa 210 durante el funcionamiento del instrumento 800. El conjunto de cámara de aire comprende subconjuntos 815, 817, 818, 819 y 822. Dado que la cámara de aire 809 del subconjunto 815 de cámara de aire es grande, el subconjunto 815 de cámara de aire tiene de manera ilustrativa dos ajustes neumáticos 815a y 815b. La cámara de aire 809 se utiliza para cerrar las cámaras 292 (tal como se muestra en la figura 6) a partir de la porción de película de plástico 217 de la bolsa 210. Cuando se presiona uno de los émbolos 268, uno o ambos de los ajustes neumáticos 815a y 815b permiten que se desinflen la cámara de aire 809. Tras atravesar el fluido una de las cámaras 292, se vuelve a presurizar la cámara de aire 809, sellando los canales 214, 236, 245, 247 y 249. Aunque el subconjunto de cámara de aire 815 ilustrativo sólo tiene una cámara de aire 809, se entiende que otras configuraciones son posibles, de manera ilustrativa en las que cada uno de los canales 214, 236, 245, 247 y 249 tiene su propia cámara de aire o pistón neumático asociado. El subconjunto de cámara de aire 822 comprende de manera ilustrativa tres cámaras de aire 824, 826 y 828. Tal como se trató anteriormente, las cámaras de aire 824, 824 y 828 accionan el blíster de tres lóbulos 222 para la lisis celular. Tal como se ilustra, las cámaras de aire 824, 826 y 828 son ligeramente más grandes que sus blísteres 224, 226, 228 correspondientes. Se ha encontrado que, tras inflarse, la superficie de las cámaras de aire se puede volver con

forma algo de cúpula, y utilizar cámaras de aire ligeramente sobredimensionadas permite un buen contacto sobre toda la superficie del blíster correspondiente, permitiendo una presión más uniforme y mejor evacuación del blíster. El subconjunto 817 de cámara de aire tiene cuatro cámaras de aire. La cámara de aire 836 funciona como una válvula de pinza para el canal 236, mientras que las cámaras de aire 844, 848 y 866 están configuradas para proporcionar presión sobre los blísteres 244, 248 y 266, respectivamente. El subconjunto 818 de cámara de aire tiene dos cámaras de aire 846 y 864, que están configuradas para proporcionar presión sobre los blísteres 246 y 264, respectivamente. Finalmente, el subconjunto de cámara de aire 819 controla la zona de amplificación de segunda etapa 280. La cámara de aire 865 actúa como válvula de pinza para los canales 265 y 267, mientras que la cámara de aire 882 proporciona una presión suave a los blísteres de segunda etapa 282 y 283, para forzar los blísteres de segunda etapa a entrar en contacto estrecho con el calentador 888. Aunque el conjunto de cámara de aire 810 está dotado de cinco subconjuntos, se entiende que esta configuración sólo es ilustrativa y que se puede utilizar cualquier número de subconjuntos o que el conjunto de cámara de aire 810 se puede proporcionar como un único conjunto integral.

La figura 10 muestra de manera similar la relación entre el conjunto de válvula neumática 808 y la bolsa 210 durante el funcionamiento del instrumento 800. En vez de cámaras de aire, el conjunto de válvula neumática 808 tiene cuatro pistones neumáticos 842, 852, 853 y 862. Estos pistones neumáticos 842, 852, 853 y 862, accionados cada uno por aire comprimido, proporcionan presión dirigida sobre los canales 242, 252, 253 y 262. Dado que los pistones tienen un diámetro bastante estrecho, se pueden ajustar entre el subconjunto de cámara de aire 817 y el subconjunto de cámara de aire 818 para proporcionar válvulas de pinza para los canales 242, 252, 253 y 262, permitiendo que los canales 242, 252, 253 y 262 sean bastante cortos. Sin embargo, si se desea, se pueden sustituir los pistones neumáticos 842, 852, 853 y 862 por cámaras de aire, que se pueden incluir en el conjunto de cámara de aire 810, eliminando la necesidad del conjunto de válvula neumática 808. Se entiende que cualquier combinación de cámaras de aire y pistones neumáticos está dentro del alcance de la presente invención. Asimismo se entiende que otros procedimientos de proporcionar presión sobre los canales y los blísteres de la bolsa 210, tal como se conocen en la materia, están dentro del alcance de la presente invención.

EJEMPLO 1: PCR DE MÚLTIPLEX ANIDADA

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

La bolsa 110 se fabricó con 0,25 g de perlas de ZS selladas en el blíster de tres lóbulos 122. Asimismo se colocaron en puntos cebadores de segunda etapa, tal como se trata a continuación, en los blísteres 181 y 182 durante la fabricación de la bolsa 110. Se cargó la bolsa 110 de la siguiente manera:

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

dNTP 0,2 mM

0,3 µM de cada cebador:

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

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

Sc3: cebadores configurados para amplificar una zona de 213 pb del ADNc de RUB 1, proteína similar a ubiquitina, de *S. cerevisiae*.

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

Sp2: cebadores configurados para amplificar una zona de 180 pb del ADNc de sec14, familia de factor citosólico, de *S. pombe*. Tampón de PCR con MgCl₂ 3 mM (sin BSA ("Bovine Serum Albumin", Albúmina de Suero Bovino))

50 unidades de M-MLV

4,5 unidades de Taq:anticuerpo

100 unidades de RNaseOut

115j-k tampón de PCR de segunda etapa
 dNTP 0,2 mM
 1X LC Green® Plus (Idaho Technology)
 5 tampón de PCR con MgCl₂ 2 mM (con BSA),
 4,5 unidades de Taq

1151 tampón de PCR de segunda etapa con una muestra de los amplicones de primera etapa.

10 Durante la fabricación, en los blísteres de segunda etapa 181 y 182 se colocaron en puntos cebadores de segunda etapa anidados. En cada blíster se colocó en puntos un par de cebadores en una cantidad para dar como resultado una concentración final de aproximadamente 0,3 μM una vez rehidratado con el tampón de PCR de segunda etapa. Los cebadores anidados de segunda etapa son de la siguiente manera:

- 15 Sc1: cebadores configurados para amplificar un fragmento de 80 pb del amplicón de primera etapa de ADNc de Sc1.
- Sc2: cebadores configurados para amplificar un fragmento de 121 pb del amplicón de primera etapa de ADNc de Sc1.
- Sc3: cebadores configurados para amplificar una porción de 93 pb del amplicón de primera etapa de ADNc de Sc1.
- 20 Sp1: cebadores configurados para amplificar una porción de 99 pb del amplicón de primera etapa de ADNc de Sc1.
- Sp2: cebadores configurados para amplificar una porción de 96 pb del amplicón de primera etapa de ADNc de Sc1.

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

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

45 Una vez colocada la bolsa 110 en el instrumento, se realizaron golpes durante diez minutos en presencia de perlas de ZS, tal como se describió anteriormente. Una vez completada la lisis celular, se comprimió el depósito 101 y se forzaron perlas magnéticas de unión a ácidos nucleicos desde el depósito 101 al interior del blíster de tres lóbulos 122, en el que se mezclaron suavemente las perlas y se dejaron incubar durante 5 minutos.

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

60 En el blíster 161, se mezcla la muestra de ácidos nucleicos con la mezcla maestra de PCR de primera etapa a partir del depósito 105. A continuación, se mantiene la muestra a 40 °C durante 10 minutos (tiempo durante el cual M-MLV convierte ARNm en ADNc), a continuación, 94 °C durante 2 minutos (para inactivar M-MLV y retirar anticuerpo de taq). A continuación, los ciclos térmicos son 20 ciclos de 94 °C durante 10 segundos y 65 °C durante 20 segundos.

65 Tras la amplificación de primera etapa, se diluye la muestra aproximadamente 100 veces utilizando la mezcla maestra de PCR de segunda etapa a partir del depósito 106. A continuación, se desplaza la muestra hasta los blísteres 182, en los que anteriormente se colocaron en puntos los cebadores de segunda etapa, tal como se comentó anteriormente. Se desplazó el tampón de PCR de segunda etapa desde el depósito 181 hasta los blísteres de control negativo 181, y se desplazó la mezcla de control positivo hasta los blísteres 183 desde el depósito 108.

Se desnaturalizaron las muestras durante 30 segundos a 94 °C, a continuación, se amplificaron durante 45 ciclos de 94 °C durante 5 segundos y 69 °C durante 20 segundos.

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

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

EJEMPLO 2: iPCR

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

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

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

Cuestiones de contaminación con amplicón ralentizaron la adopción extendida de la propia PCR en el diagnóstico de estados genéticos humanos o de enfermedad infecciosa hasta que se desarrollaron ensayos de PCR homogéneos (es decir "en tubo cerrado"). Haciendo que la lectura del ensayo sea posible en un sistema de tubo cerrado, se reduce intensamente el esparcimiento de amplicón. De manera similar, la iPCR se podría adoptar más ampliamente si estuviera disponible un formato de sistema cerrado. En el presente sistema, la muestra se inyectará en una bolsa que estará dotada de todos los reactivos requeridos. Las etapas de captura de antígeno, lavado, unión de anticuerpo indicador, lavado y posterior detección por PCR se pueden realizar completamente dentro de la bolsa. De manera ilustrativa, los ácidos nucleicos nunca salen de la bolsa y se desecharán junto con la bolsa.

Cualquiera de las bolsas de la presente invención puede estar adaptada para iPCR. Por ejemplo, la bolsa 210 de la figura 6 se puede adaptar de manera ilustrativa de la siguiente manera. Las cámaras 292a a 292l se llenarán con los siguientes componentes. La muestra que comprende de manera ilustrativa un antígeno no purificado y/o no modificado (por ejemplo una toxina) se inyecta a través del puerto de inyección 241a a la cámara 292a. Se proporciona un anticuerpo de captura conjugado con perlas magnéticas (C-Ab) en la cámara 292b. Si tienen que someterse a prueba múltiples dianas, se entiende que se pueden utilizar múltiples anticuerpos de captura que tienen especificidad por múltiples antígenos. Se proporciona un tampón de lavado previo opcional en la cámara 292c. Se proporciona un anticuerpo indicador conjugado con un molde de oligonucleótido (R-Ab-ADN) en la cámara 292d. Se entiende que los anticuerpos de captura e indicador pueden ser monoclonales o policlonales. Cuando van a detectarse múltiples antígenos, los anticuerpos de captura e indicador pueden contener únicamente anticuerpos policlonales, únicamente anticuerpos monoclonales o cualquier combinación de anticuerpos policlonales específicos para un antígeno y anticuerpos monoclonales específicos para otro antígeno. Cuando un anticuerpo indicador es policlonal, se entiende que todos los anticuerpos indicadores que tienen especificidad por un antígeno particular se acoplarán a moldes de oligonucleótidos que tienen una secuencia específica, aunque la especificidad entre diversos anticuerpos en ese conjunto varíe. El oligonucleótido puede ser de cadena doble o de cadena sencilla. Se pueden proporcionar múltiples R-Ab-ADN para detectar múltiples antígenos, con cada anticuerpo diferente conjugado a un oligonucleótido único. Se proporcionan tampones de lavado en las cámaras 292e a 292h. Se proporciona una

mezcla maestra de PCR de primera etapa, tal como se describió anteriormente, en la cámara 292i. Se proporciona un tampón de dilución en la cámara 292j. Se proporciona una mezcla maestra de PCR de segunda etapa, tal como se describió anteriormente, en la cámara 292k. Tal como se comentó anteriormente, los reactivos se pueden proporcionar secos en las cámaras 292b a 292l, y se pueden rehidratar antes de utilizarse mediante inyección de agua a través del sello 239, o cada reactivo se puede proporcionar húmedo mediante inyección en cada cámara 292 individual. Se contemplan combinaciones de lo mismo.

Una vez cargados la muestra y los reactivos, se inserta la bolsa 220 en el instrumento 800. A continuación, se presiona el émbolo 268a y se desplaza la muestra al blíster de tres lóbulos 222. Asimismo, se presiona el émbolo 268b y, además, se desplazan los anticuerpos de captura conjugados a perlas magnéticas (mostrados como C en la figura 11) hasta el blíster de tres lóbulos 222. La muestra y el C-Ab se mezclan mediante presión a partir de la cámara de aire 828 alternando con presión a partir de las cámaras de aire 824, 826. Dado que se desea el mezclado, la presión de las cámaras de aire 824, 826, 828 puede ser considerablemente inferior a la presión utilizada tal como se comentó anteriormente para la lisis. De manera ilustrativa, se obtiene un mezclado suave. Se dejan incubar la muestra y el C-Ab durante un tiempo suficiente para que los anticuerpos de captura se unan a los antígenos T en la muestra (formando complejos de C-Ab-T), de manera ilustrativa durante aproximadamente 5 minutos, aunque otros tiempos de incubación pueden ser deseables. Para la iPCR, puede ser deseable incluir un calentador adicional en el instrumento 800 para mantener las incubaciones a aproximadamente 37 °C.

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

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

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

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

puede utilizar con cualquiera de los ejemplos de iPCR comentados en el presente documento.

Una vez completado el lavado, se presiona el émbolo 268i y se desplaza la mezcla maestra de PCR de primera etapa, tal como se describió anteriormente, hasta el blíster 246. La mezcla maestra de PCR de primera etapa contiene pares de cebadores para todas las dianas deseadas. Se libera el imán 850, y se puede utilizar un mezclado opcional entre los blísteres 246 y 248 para resuspender los complejos ternarios. Se desplaza la mezcla hasta el blíster 264, en el que tienen lugar los ciclos térmicos de primera etapa, tal como se describió anteriormente. Una vez que los oligonucleótidos complejados se han amplificado hasta niveles suficientes, tal como se comentó anteriormente, opcionalmente se diluye la mezcla amplificada utilizando el tampón de dilución proporcionado en la cámara 292j. Parte o la totalidad de la mezcla amplificada de primera etapa se puede mezclar con la mezcla maestra de PCR de segunda etapa proporcionada a partir de la cámara 292k y, a continuación, se desplaza esta mezcla hasta los 18 blísteres de segunda etapa 282, en los que se proporcionan cebadores de segunda etapa, tal como se comentó anteriormente. Si se desea, uno de los blísteres de segunda etapa 282 se puede utilizar para un control negativo, en el que se sabe que no hay ningún antígeno presente en la muestra, pero se proporcionó R-Ab-ADN a partir de la cámara 292d y se proporcionan los cebadores apropiados en el blíster de control negativo de segunda etapa 282. Se espera que, a pesar de los diversos lavados, pequeñas cantidades de este R-Ab-ADN particular puedan estar presentes en la PCR de primera etapa y, por consiguiente, que pequeñas cantidades del producto amplificado de primera etapa se puedan proporcionar a este blíster de segunda etapa 282. Sin embargo, las cantidades deben ser bastante pequeñas, y el punto de cruce debe retrasarse mucho más allá que el de las muestras positivas. Asimismo, si se desea, uno de uno de los blísteres de segunda etapa se puede utilizar para un control positivo, en el que se realizan adiciones conocidas en la muestra de un antígeno que no está sometido a prueba de otro modo (quizás incluido con las perlas de C-Ab), que supuestamente se unirá a su R-Ab-ADN correspondiente, y que a continuación, se amplifica en la PCR de primera etapa. Finalmente, en esta realización ilustrativa no se utilizan blísteres de control 283. Sin embargo, con una reconfiguración menor, se pueden conectar los blísteres 283 al blíster 266 y pueden proporcionar seis reacciones de segunda etapa adicionales. Alternativamente, se pueden utilizar los blísteres 283 para otros controles, según se desee por la aplicación particular.

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

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

EJEMPLO 3: iPCR CON BOLSA ESPECÍFICA PARA iPCR

El ejemplo anterior ilustra un procedimiento que adapta la bolsa 210 de la figura 6 para iPCR. Sin embargo, la figura 12 muestra una bolsa 310 que está configurada de manera ilustrativa para iPCR. El accesorio 390 es similar a los accesorios 190 y 290, excepto por que tiene 15 cámaras 392 y émbolos 368. Cada cámara 392 (de manera ilustrativa, la cámara 392a, en la que se inyecta la muestra) puede tener su propio puerto de inyección, o varias cámaras pueden tener un canal de conexión y pueden compartir un puerto de inyección (de manera ilustrativa 392e a 392k, que contienen cada una tampón de lavado). Tal como con los accesorios descritos anteriormente, cualquier combinación de puertos de inyección y canales está dentro del alcance de la presente invención. La bolsa 310 difiere de la bolsa 210 de la figura 6 de una manera principal. Dado que habitualmente no se necesita lisis celular en la iPCR, el blíster de tres lóbulos 222 se puede sustituir por un único depósito de residuos grande 322. Dado que en iPCR son deseables múltiples lavados, el depósito de residuos 322 está dotado de un volumen suficientemente grande como para retener los múltiples tampones utilizados, por ejemplo 2-5 ml, dependiendo de la aplicación y del volumen de las reacciones. Se entiende que se puede necesitar reconfigurar el instrumento 800 en cierta medida para adaptarse a la bolsa 390.

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

Para empezar, se presionan los émbolos 368a y 368b, forzando la muestra y los anticuerpos de captura C-Ab a través del canal 343 al interior del blíster 344. Se mezclan suavemente la muestra y los C-Ab, desplazándose de

manera ilustrativa entre los blísteres 344 y 346 a través del canal 345, y se incuban tal como se describió anteriormente. Tras un periodo de tiempo suficiente para la formación del complejo de C-Ab-T, se desplaza la mezcla hasta el blíster 346 a través del canal 338, en el que se despliega un imán 350 alojado en el instrumento, capturando las perlas complejadas en el mismo. Se desplaza el fluido restante hasta el depósito de residuos 322, a través del canal 339. Opcionalmente, se desplaza tampón de lavado previo desde la cámara 392c hasta el blíster 346 a través del canal 345, se retira el imán 350, y se lavan suavemente las perlas magnéticas desplazando el fluido entre los blísteres 344 y 346. Se despliega de nuevo el imán 350 y se capturan de nuevo las perlas en el blíster 346.

A continuación, se presiona el émbolo 368d desplazando los anticuerpos indicadores conjugados a molde de ácidos nucleicos (R-Ab-ADN) hasta el blíster 346, se retira el imán 350, y se mezclan suavemente C-Ab-T y R-Ab-ADN desplazándose de manera ilustrativa entre los blísteres 344 y 346 a través del canal 345 y se incuban tal como se describió anteriormente. Tras la formación del complejo ternario (C-Ab-T-R-Ab-ADN), se despliega una vez más el imán 350, capturando el complejo ternario en el blíster 346, y se desplaza el fluido restante hasta el blíster de residuos 322.

A continuación, se lava el complejo ternario utilizando el tampón de lavado a partir de la cámara 392e, tal como se describió anteriormente para el lavado previo. Se despliega una vez más el imán 350, capturando el complejo ternario en el blíster 346, y se desplaza el fluido restante hasta el blíster de residuos 322. Se repite el lavado varias veces, utilizando el tampón de lavado a partir de las cámaras 392f a 392k. De este modo, en la realización ilustrativa de la figura 12, se completan siete lavados. Sin embargo, tal como se comentó anteriormente, más o menos lavados pueden ser deseables, dependiendo de la aplicación particular.

Tal como se ilustra en el esquema de inmuno-PCR II mostrado en la figura 11, el anticuerpo indicador se conjuga directamente al molde de ácidos nucleicos. Se entiende que el anticuerpo indicador en cualquiera de las realizaciones que se tratan en el presente documento se puede unir al molde de ácidos nucleicos de cualquiera de una variedad de maneras, incluyendo formación de enlaces covalentes y no covalentes directos e indirectos. Además, el anticuerpo indicador se puede unir a los ácidos nucleicos mediante una variedad de mecanismos, incluyendo, por ejemplo, mediante la utilización de anticuerpos secundarios, tal como se ilustra en el esquema de inmuno-PCR I de la figura 11. Si se utilizan anticuerpos secundarios u otros mecanismos de acoplamiento indirecto, puede ser deseable añadir puertos adicionales y menos etapas de lavado.

A continuación, se despliega la mezcla maestra de PCR de primera etapa, tal como se describió anteriormente, hasta el blíster 346 mediante la activación del émbolo 368k, y se retira el imán 350 una vez más. Si se desea un mezclado suave, se puede desplazar el fluido entre los blísteres 346 y 364 a través del canal 347. Aunque el mezclado puede tener lugar entre los blísteres 346 y 344, tal como anteriormente, en la realización ilustrativa el mezclado tiene lugar entre los blísteres 346 y 364. Esto ayuda a reducir la reintroducción de complejos de anticuerpo indicador no unidos que pueden residir en el blíster 344. A continuación, se desplaza la muestra hasta el blíster 364. Se presuriza suavemente una cámara de aire situada sobre 364 para desplazar el blíster 364 para entrar en contacto con un dispositivo de calentamiento/enfriamiento, tal como un dispositivo de Peltier, y se someterá la muestra a ciclos térmicos, tal como se comentó anteriormente para PCR de primera etapa. Tal como se comentó anteriormente en el ejemplo anterior, la PCR de primera etapa puede ser innecesaria con la iPCR actualmente descrita, se pueden omitir el blíster 364 y su calentador asociado, y todos los lavados pueden tener lugar de manera ilustrativa mediante mezclado entre los blísteres 344 y 346. Si se omite la PCR de primera etapa, se puede omitir, además, la dilución, tal como se comenta a continuación.

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

EJEMPLO 4: PCR E iPCR COMBINADAS

En algunas circunstancias, puede ser deseable someter a prueba para detectar antígenos y ácidos nucleicos en un conjunto de reacción. Por ejemplo, un ataque terrorista puede emplear diversos agentes para matar a múltiples personas. Al responder al ataque, puede no saberse si el agente causante es un virus, una bacteria u otro organismo, o si el agente causante es una toxina. El sistema de entorno cerrado de las bolsas de la presente

invención es bien adecuado para tal utilización. En la realización dada a conocer en el presente documento, pueden tener lugar tanto PCR como iPCR dentro de una única bolsa, permitiendo la detección simultánea de diversos agentes biológicos y antigénicos.

5 La figura 13 muestra una bolsa 410 que es similar a la bolsa 210 de la figura 6. La bolsa 410 ilustrativa tiene todos los blísteres de la bolsa 210, pero incluye, además, los blísteres 430, 431, 432 y 433. La bolsa 410 tiene, además, un accesorio más grande 490, que tiene veinte cámaras 492 con veinte émbolos 468 correspondientes. Tal como
10 anteriormente, el accesorio puede incluir puertos de inyección independientes para cada cámara, o diversas cámaras pueden tener canales de conexión. Diversas combinaciones de lo mismo están dentro del alcance de la presente invención. El instrumento para la bolsa 410 será similar al instrumento 800, excepto por que se necesitarán accionadores neumáticos adicionales para los blísteres 430, 431, 432 y 433 y los canales 436, 457, 473, 486, 487 y 488, así como dos imanes retráctiles 451 y 454 adicionales adyacentes a los blísteres 433 y 431, respectivamente.

15 En la realización ilustrativa, las cámaras se cargarán de la siguiente manera. Se proporcionará tampón de lavado de iPCR en las cámaras 492a a 492e y 492j. La muestra que va a someterse a prueba se inyectará en la cámara 492f. Los anticuerpos de captura (C-Ab) conjugados a perlas magnéticas se proporcionan en la cámara 492g. Se proporciona un tampón de lavado previo opcional en la cámara 492h. Se proporcionan anticuerpos indicadores conjugados a su molde de oligonucleótidos respectivo (R-Ab-ADN) en la cámara 492i. Se proporciona un tampón de lisis celular en la cámara 492k. Se proporcionan perlas magnéticas de unión a ácidos nucleicos en la cámara 492l.
20 Se proporcionan tampones de lavado de ácidos nucleicos en las cámaras 492m y 492n. Se proporciona un tampón de elución de ácidos nucleicos en la cámara 492o. Se proporciona una mezcla maestra de PCR de primera etapa en la cámara 492p. Se proporciona un tampón de dilución en las cámaras 492q y 492r. Se proporciona una mezcla maestra de PCR de segunda etapa en la cámara 492s. Se proporcionan controles, tal como se comentó anteriormente con respecto a la figura 6, en la cámara 492t. Se entiende que esta disposición es ilustrativa y que
25 otras configuraciones son posibles. Asimismo, como con los otros ejemplos comentados anteriormente, se pueden proporcionar uno o varios de estos componentes secos en uno o varios de los blísteres de la bolsa 410.

30 Una vez cargada la muestra en la cámara 492f y cargada la bolsa 410 en el instrumento, se presionan los émbolos 468f y 468g, desplazando la muestra y C-Ab a través del canal 436 hasta el blíster 430. La muestra y los anticuerpos de captura se pueden mezclar desplazándolos suavemente entre los blísteres 430 y 431 y, a continuación, incubando tal como se describió anteriormente, para motivar la formación de complejos de C-Ab-T. Se desplaza la muestra hasta el blíster 431 y se activa el imán 454, capturando los complejos de C-Ab-T en el mismo. De este modo, toxinas u otros antígenos diana están ahora capturados en el blíster 431. Se observa que, en la realización
35 ilustrativa, la superficie de la porción de perla magnética de las perlas magnéticas acopladas a los anticuerpos de captura es diferente de la superficie de las perlas magnéticas de unión a ácidos nucleicos, y las perlas magnéticas acopladas a los anticuerpos de captura están configuradas de manera ilustrativa para no unirse a ácidos nucleicos. A continuación, se desplaza el fluido restante hasta el blíster de tres lóbulos 422 a través del canal 473. A continuación, puede procesarse este fluido y someterse a ensayo para determinar la presencia de ácidos nucleicos diana. Esta división de la muestra puede ser problemática si un antígeno seleccionado como diana es un antígeno
40 de superficie de un organismo seleccionado como diana en la detección por PCR. En tal situación, puede ser deseable elegir entre detección de antígeno y detección de ácidos nucleicos para ese organismo, o utilizar bolsas independientes para PCR e iPCR. Alternativamente, se puede someter la muestra a lisis antes de la captura de anticuerpo. Si la lisis interfiriera con la captura de anticuerpo, por ejemplo cambiando la conformación del antígeno, entonces se puede dividir la muestra y se puede someter a lisis sólo una porción de la muestra antes de la captura de anticuerpo. Si se desea un lavado previo de C-Ab-T, se activa el émbolo 468h y se desplaza el tampón de lavado
45 previo desde la cámara 492h al interior del blíster 431. Se retira el imán 454, se mezcla el fluido entre los blísteres 430 y 431, y se despliega una vez más el imán 454, capturando el complejo de C-Ab-T en el blíster 431. El tampón de lavado, que ahora contiene posiblemente células que se habían quedado atrás tras la captura, se desplaza hasta el blíster de tres lóbulos 422, junto con el resto del material no capturado.

50 Se entiende que la muestra está ahora dividida en dos partes para su proceso independiente. Los antígenos presentes en la muestra están ahora capturados en complejos de C-Ab-T en el blíster 431, mientras que las células, los virus y los ácidos nucleicos libres presentes en la muestra están ahora en el blíster de tres lóbulos 422 esperando la lisis. Las dos porciones de la muestra se procesan de manera independiente hasta que ambas están
55 listas para la PCR de primera etapa. Estos procesos pueden tener lugar en cualquier orden o simultáneamente. Sin embargo, en la presente realización, la lisis celular debe tener lugar antes que el proceso sustancial de los complejos de C-Ab-T, de modo que el blíster de tres lóbulos puede funcionar entonces como el depósito de residuos. Si se utiliza un depósito de residuos independiente, se puede retrasar la lisis celular hasta, a continuación, de haberse procesado los complejos de C-Ab-T, si se desea.

60 Se desplaza tampón de lisis a partir de la cámara 492k al interior del blíster de tres lóbulos 422 a través del canal 436. Se presurizan las cámaras de aire adyacentes a los blísteres del blíster de tres lóbulos 422 tal como se describió anteriormente con respecto a la figura 6, impulsando colisiones a alta velocidad, sometiendo la muestra a cizalladura y liberando ácidos nucleicos. Una vez que se han sometido adecuadamente las células a lisis, se activa
65 el émbolo 468l y se inyectan perlas magnéticas de unión a ácidos nucleicos almacenadas en la cámara 492l a través del canal 436 al interior del blíster de tres lóbulos 220. Se mezcla la muestra con las perlas magnéticas y se deja

incubar la mezcla. A continuación, el proceso continúa tal como se describió anteriormente con respecto a la bolsa de la figura 6. Se fuerzan la mezcla de muestra y perlas a través del canal 438 al interior del blíster 444, a continuación, a través del canal 443 y al interior del blíster 446, en el que un imán retráctil 450 captura las perlas magnéticas a partir de la disolución. A continuación, se fuerza el líquido no capturado fuera del blíster 446 y de vuelta a través del blíster 444 y al interior del blíster 422, que ahora se utiliza como un receptáculo de residuos. El émbolo 468m se puede activar para proporcionar una disolución de lavado al blíster 444 a través del canal 445 y, a continuación, al blíster 446 a través del canal 447. Se retrae el imán 450 y se lavan las perlas magnéticas desplazando las perlas hacia delante y hacia atrás a partir de los blísteres 444 y 446. Una vez lavadas las perlas magnéticas, vuelven a capturarse las perlas magnéticas en el blíster 446 mediante activación del imán 450 y, a continuación, se desplaza la disolución de lavado hasta el blíster 422. Se puede repetir este proceso utilizando reactivos de lavado en las cámaras 492n. Sin embargo, se entiende que más o menos lavados están dentro del alcance de la presente invención. Tras el lavado, se desplaza tampón de elución almacenado en la cámara 492o a través del canal 447 hasta el blíster 448, y se retrae el imán 450. Se somete la disolución a ciclos entre los blísteres 446 y 448 a través del canal 452, descomponiendo el sedimento de perlas magnéticas en el blíster 446 y dejando que los ácidos nucleicos capturados entren en la disolución. Se activa una vez más el imán 450, capturando las perlas magnéticas en el blíster 246, y se desplaza la disolución de ácidos nucleicos eluidos al interior del blíster 448.

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

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

El complejo ternario de anticuerpo lavado está ahora capturado en el blíster 433 y los ácidos nucleicos eluidos están ahora en el blíster 448. Se observa que el complejo ternario de anticuerpo y los ácidos nucleicos eluidos se pueden procesar mediante PCR en reacciones independientes, a través de conjuntos independientes de blísteres de PCR de segunda etapa. Sin embargo, en la presente realización, el complejo ternario de anticuerpo y los ácidos nucleicos eluidos se combinan para su análisis mediante PCR. Se inyecta mezcla maestra de PCR de primera etapa, que contiene todos los cebadores de primera etapa, a partir de la cámara 492p al interior del blíster 448. A continuación, se mezcla la muestra de ácidos nucleicos entre los blísteres 448 y 464 a través del canal 453. Si se desea PCR de primera etapa para los componentes de iPCR y, a continuación, se desplaza la muestra de ácidos nucleicos hasta el blíster 433, se retira el imán 451 y se mezcla de manera ilustrativa la muestra reunida entre los blísteres 433 y 464. A continuación, se desplaza la muestra hasta el blíster 464, en el que se somete la muestra a ciclos térmicos, tal como se comentó anteriormente. A continuación, se puede diluir la muestra amplificada una vez o varias veces, utilizando los tampones de dilución a partir de las cámaras 492q y 492r. Antes de cada dilución, se retira una gran porción de la muestra amplificada a partir del blíster 464 a través del canal 447 o del canal 488. Con cada adición de tampón de dilución, se mezcla la muestra entre los blísteres 464 y 466 a través del canal 462. Tras la dilución, se mezcla la totalidad o una porción de la muestra con la mezcla maestra de PCR de segunda etapa a partir de la cámara 492s, tal como se describió en los ejemplos anteriormente.

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

mientras que el análisis mediante iPCR puede utilizar umbrales de cruce, tal como se comentó anteriormente. Otros procedimientos de análisis están dentro del alcance de la presente invención.

REFERENCIAS

- 5 1. Wittwer CT, Fillmore GC, Garling DJ. Minimizing the time required for DNA amplification by efficient heat transfer to small samples. *Anal Biochem.* 1 de mayo de 1990; 186(2):328-31.
2. Wittwer CT, Garling DJ. Rapid cycle DNA amplification: time and temperature optimization. *Biotechniques.* Enero de 1991; 10(1):76-83.
- 10 3. Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques.* Enero de 1997; 22(1):130-1, 134-8.
4. Wittwer CT, Ririe KM, Andrew RV, David DA, Gundry RA, Balis UJ. The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *Biotechniques.* Enero de 1997; 22(1):176-81.
- 15 5. Gundry CN, Vandersteen JG, Reed GH, Pryor RJ, Chen J, Wittwer CT. Amplicon melting analysis with labeled primers: a closed-tube method for differentiating homozygotes and heterozygotes. *Clin Chem.* marzo de 2003; 49(3):396-406.
6. Wittwer CT, Reed GH, Gundry CN, Vandersteen JG, Pryor RJ., High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clin Chem.* junio de 2003; 49(6 Pt 1):853-60.
- 20 7. McKinney JT, Longo N, Hahn S, Matern D, Rinaldo P, Dobrowolski SF. Comprehensive analysis of the human medium chain acyl-CoA dehydrogenase gene. *Mol Gen Metab.* En prensa.
8. Dobrowolski SF, Amat di San Filippo C, McKinney JT, Wilcken B, Longo N Identification of novel mutations in the SLC22A5 gene in primary carnitine deficiency with dye-binding/high-resolution thermal denaturation, *Human Mutation*, presentado.
9. McKinney JT, Saunders C, Dobrowolski SF, High-resolution melting analysis of the human galactose-1-phosphate uridyl transferase gene, en preparación.
- 25 10. <http://www.defenselink.mil/contracts/2003/ct20030925.html>.
11. Poritz MA, Abbott R, Gerber T, Thatcher S, Bird A, Tuck A, Newswander AM, Belisle S, Ririe K, A Hand-held, Battery-operated Real-time PCR Machine, American Society for Microbiology Annual Meeting, Baltimore MD, 9-12 de marzo, 2003.
- 30 12. Elnifro EM, Ashshi AM, Cooper RJ, Klapper PE. Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. *Clin Microbiol Rev.* octubre de 2000; 13(4):559-70. Revisión.
13. Elnifro EM, Cooper RJ, Klapper PE, Yeo AC, Tullo AB. Multiplex polymerase chain reaction for diagnosis of viral and chlamydial keratoconjunctivitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* junio de 2000; 41(7):1818-22.
- 35 14. Giaever, G., et al. Genomic profiling of drug sensitivities via induced haploinsufficiency. *Nature Genetics.* 1999, 21, 278-283.
15. Winzeler, E., et al. Functional Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* Genome by Gene Deletion and Parallel Analysis. *Science.* 1999. 285, 901-906.
16. Sano, T., C.L. Smith, y C.R. Cantor, Immuno-PCR: very sensitive antigen detection by means of specific antibody-DNA conjugates. *Science*, 1992. 258(5079): págs. 120-2.
- 40 17. Niemeyer, C.M., M. Adler, y R. Wacker, Immuno-PCR: high sensitivity detection of proteins by nucleic acid amplification. *Trends Biotechnol*, 2005. 23(4): págs. 208-16.
18. Adler, M., Immuno-PCR as a clinical laboratory tool. *Adv Clin Chem*, 2005. 39: págs. 239-92.
19. Barletta, J.M., et al., Detection of ultra-low levels of pathologic prion protein in scrapie infected hamster brain homogenates using real-time immuno-PCR. *J Virol Methods*, 2005. 127(2): págs. 154-64.
- 45 20. Adler, M., et al., Detection of Rotavirus from stool samples using a standardized immuno-PCR ("Imperacer") method with end-point and real-time detection. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. 333(4): págs. 1289-94.
21. Lind, K. y M. Kubista, Development and evaluation of three real-time immuno-PCR assemblages for quantification of PSA. *J Immunol Methods*, 2005. 304(1-2): págs. 107-16.
22. Schiavo, S., et al., Comparison of fluorometric detection methods for quantitative polymerase chain reaction (PCR). *J Immunoassay Immunochem*, 2005. 26(1): págs. 1-12.
- 50 23. Barletta, J.M., D.C. Edelman, y N.T. Constantine, Lowering the detection limits of HIV-1 viral load using real-time immuno-PCR for HIV-1 p24 antigen. *Am J Clin Pathol*, 2004. 122(1): págs. 20-7.
24. McKie, A., et al., A quantitative immuno-PCR assay for the detection of mumps-specific IgG. *J Immunol Methods*, 2002. 270(1): págs. 135-41.
- 55 25. Chao, H.Y., et al., A highly sensitive immunopolymerase chain reaction assay for *Clostridium botulinum* neurotoxin type A. *Toxicon*, 2004. 43(1): págs. 27-34.
26. Wu, H.C., et al., Detection of *Clostridium botulinum* neurotoxin type A using immuno-PCR. *Lett Appl Microbiol*, 2001. 32(5): págs. 321-5.
27. Liang, H., et al., A highly sensitive immuno-PCR assay for detecting Group A *Streptococcus*. *J Immunol Methods*, 60 2003. 279(1-2): págs. 101-10.
28. Adler, M., R. Wacker, y C.M. Niemeyer, A realtime immuno-PCR assay for routine ultrasensitive quantification of proteins. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003. 308(2): págs. 240-50.
29. Allen, R.C., et al., An immuno-PCR method for detecting *Bacillus thuringiensis* CryIAc toxin. *J Immunol Methods*, 65 2006. 308(1-2): págs. 109-15.
30. Hendrickson, E.R., et al., High sensitivity multianalyte immunoassay using covalent DNA-labeled antibodies and polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res*, 1995. 23(3): págs. 522-9.

31. Joerger, R.D., et al., Analyte detection with DNA-labeled antibodies and polymerase chain reaction. Clin Chem, 1995. 41(9): págs. 1371-7.

5 Aunque en el presente documento se hace referencia a PCR e iPCR, se entiende que los dispositivos y procedimientos dados a conocer en el presente documento pueden ser adecuados para su utilización con otros procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos o de otros procesos biológicos, tal como se conocen en la materia, particularmente procedimientos que se benefician de una reacción de múltiplex de primera etapa y una reacción individual de segunda etapa. Las reacciones de segunda etapa no limitativas ilustrativas incluyen extensión de cebador, incluyendo extensión de cebador específica de alelo; terminaciones de extensión, incluyendo
10 terminación mediante incorporación de uno o varios didesoxinucleótidos; incorporación de etiquetas fluorescentes o no fluorescentes; y otras reacciones enzimáticas que requieren un cambio en los componentes de mezcla de reacción o proporciones de componentes, tales como PCR asimétrica, PCR específica de alelo, ensayos Invader y otras químicas de amplificación o detección isotérmicas.

REIVINDICACIONES

1. Recipiente (10) para realizar amplificación de ácidos nucleicos en dos etapas en una muestra en un sistema cerrado que comprende
 5 una zona de reacción de primera etapa (60) que comprende un blíster de reacción de primera etapa (61) que comprende una serie de pares de cebadores para la amplificación de una serie de dianas para la amplificación de primera etapa de la muestra,
 un depósito adicional conectado por conexión de fluido al blíster de reacción de primera etapa (61), estando el depósito adicional configurado para proporcionar fluidos adicionales a la muestra, y
 10 una zona de reacción de segunda etapa (80) conectada por conexión de fluido a la zona de reacción de primera etapa (60), comprendiendo la zona de reacción de segunda etapa (80) una serie de cámaras de reacción de segunda etapa, comprendiendo cada cámara de reacción de segunda etapa un par de cebadores proporcionados para la amplificación adicional de una porción de la muestra, estando la zona de reacción de segunda etapa (80) configurada para realizar ciclos térmicos de la totalidad de la serie de cámaras de reacción de segunda etapa,
 15 en el que la amplificación de primera etapa es amplificación de múltiplex para una serie de dianas, y cada par de cebadores en las cámaras de reacción de segunda etapa está configurado para la amplificación adicional de una de las dianas de primera etapa.
2. Recipiente (10), según la reivindicación 1, en el que cada par de cebadores en la cámara de reacción de segunda etapa está anidado dentro de cebadores utilizados en la amplificación de las dianas de primera etapa.
3. Recipiente (10), según la reivindicación 1, en el que el recipiente se puede sellar tras la introducción de la muestra y una serie de reactivos y permanece sellado a lo largo de la amplificación de primera y segunda etapa.
- 25 4. Recipiente (10), según la reivindicación 3, que comprende, además,
 un puerto de inyección de muestra (12) para introducir la muestra en el recipiente,
 una zona de lisis celular (20) configurada para realizar la lisis de células o esporas ubicadas en la muestra, comprendiendo la zona de lisis celular (20) una serie de partículas de lisis y estando conectada por conexión de fluido al puerto de inyección de muestra, y
 30 una zona de preparación de ácidos nucleicos (40) conectada por conexión de fluido a la zona de lisis celular (20) y a la zona de reacción de primera etapa (60), la zona de preparación de ácidos nucleicos (40) está dotada de perlas (56) magnéticas para purificar ácidos nucleicos.
5. Recipiente (10), según la reivindicación 1, en el que el blíster de primera etapa (61) comprende un material flexible, de tal manera que la presión proporcionada sobre el blíster aplasta el blíster, forzando el contenido fuera del blíster al interior de la zona de amplificación de segunda etapa (80).
- 35 6. Procedimiento de amplificación de ácidos nucleicos en una muestra, que comprende proporcionar el recipiente (10), según la reivindicación 1, que tiene
 40 una serie de blísteres de reacción conectados por conexión de fluido incluyendo un blíster de amplificación, un conjunto adicional de cámaras de amplificación de segunda etapa conectadas por conexión de fluido al blíster de amplificación, comprendiendo cada cámara de amplificación de segunda etapa adicional un par de cebadores para amplificar adicionalmente un ácido nucleico específico en la muestra, y
 45 uno o varios puertos sellables conectados por conexión de fluido a los blísteres de reacción, proporcionando los puertos sellables el único acceso desde el exterior del recipiente (10) hasta los blísteres de reacción, inyectar la muestra al interior del recipiente (10) a través de un primero de los puertos sellables, y sellar el primer puerto tras inyectar la muestra,
 50 extraer los ácidos nucleicos a partir de la muestra, y desplazar los ácidos nucleicos extraídos al blíster de amplificación,
 amplificar los ácidos nucleicos en el blíster de amplificación,
 desplazar una porción de los ácidos nucleicos amplificados a cada una de las cámaras de amplificación de segunda etapa adicionales, y
 55 realizar la amplificación de segunda etapa en las cámaras de amplificación de segunda etapa adicionales.
7. Procedimiento, según la reivindicación 6, en el que la etapa de amplificación y la amplificación de segunda etapa incluyen realizar ciclos térmicos para amplificación por PCR.
8. Procedimiento, según la reivindicación 7, en el que la etapa de amplificación se termina antes de alcanzar la fase logarítmica, y la amplificación de segunda etapa avanza a la fase logarítmica.
- 60 9. Procedimiento, según la reivindicación 8, en el que la etapa de extracción incluye realizar la lisis de células contenidas dentro de la muestra para generar un lisado,
 mezclar perlas (56) magnéticas de unión a ácidos nucleicos con el lisado e incubar para permitir que los ácidos nucleicos se unan a las perlas (56) magnéticas,
 65

desplegar un imán (50) adyacente a uno de la serie de blísteres para contener las perlas (56) magnéticas en ese blíster, y desplazar el resto del lisado a otro de la serie de blísteres.

- 5 10. Procedimiento, según la reivindicación 9, en el que la etapa de lisis incluye producir impactos repetidamente en una superficie exterior del recipiente (10).
- 10 11. Procedimiento, según la reivindicación 7, en el que la etapa de realización de amplificación de segunda etapa incluye detectar cuáles de las cámaras de reacción de segunda etapa contienen productos de amplificación de segunda etapa.
12. Procedimiento, según la reivindicación 11, en el que para cada diana respectiva los pares de cebadores de segunda etapa están anidados dentro de sus pares de cebadores de primera etapa homólogos.
- 15 13. Recipiente (10), según la reivindicación 1, en el que la zona de reacción de segunda etapa (80) comprende, además, una o varias cámaras de reacción de segunda etapa adicionales, proporcionándose cada una de las cámaras de reacción de segunda etapa adicionales como controles de amplificación.

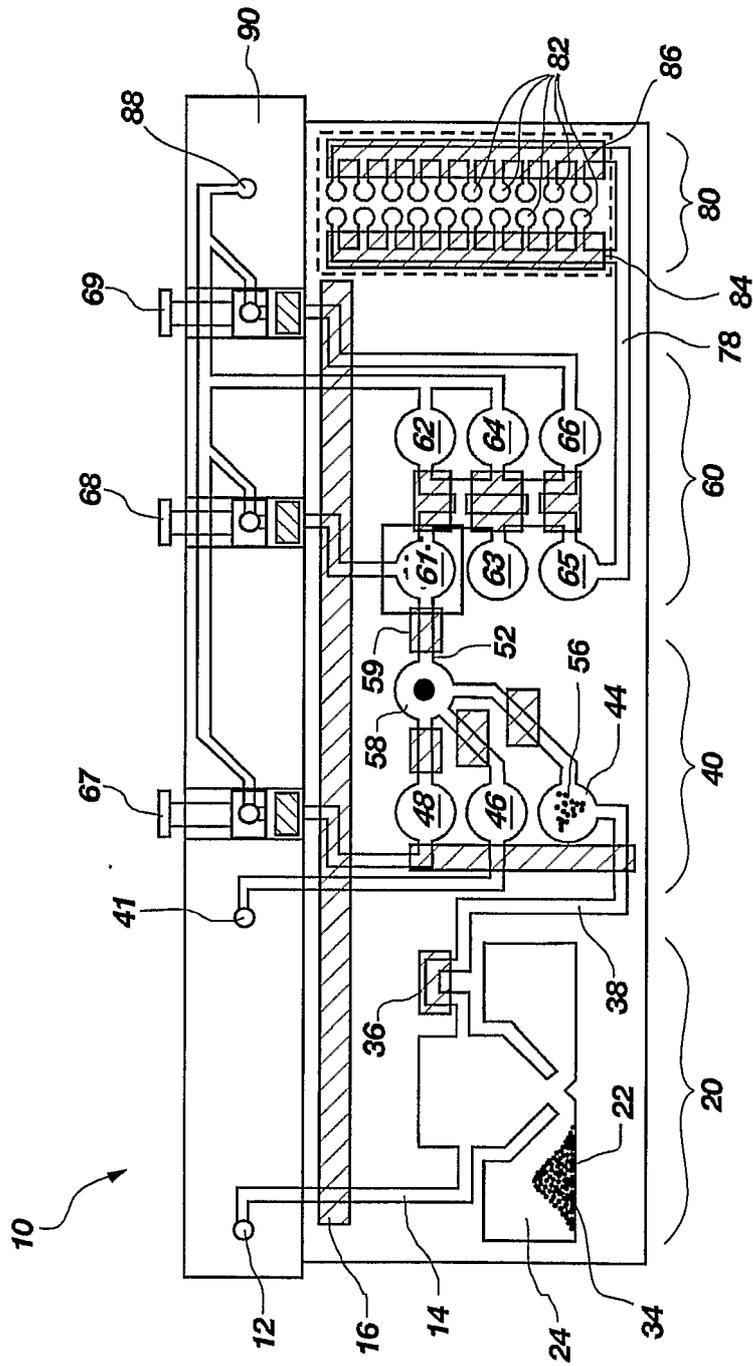


FIG. 1

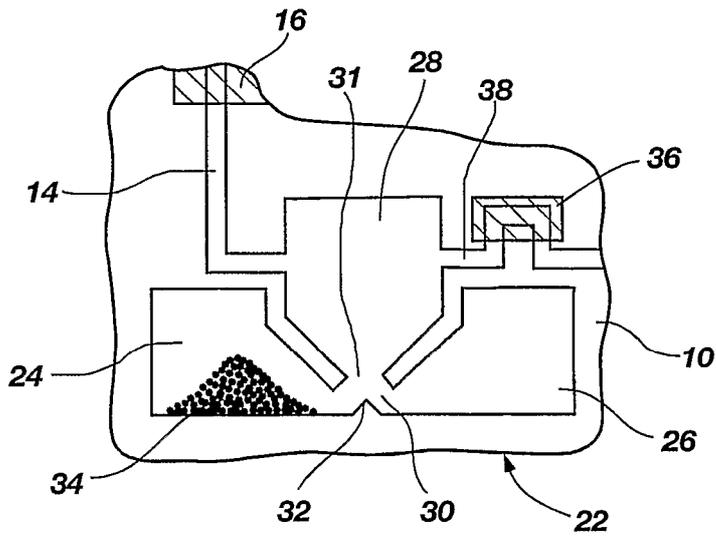


FIG. 2

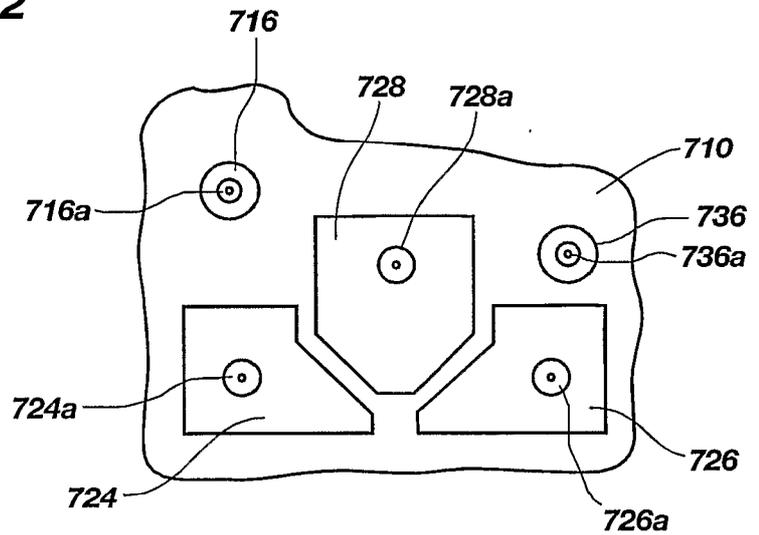


FIG. 2a

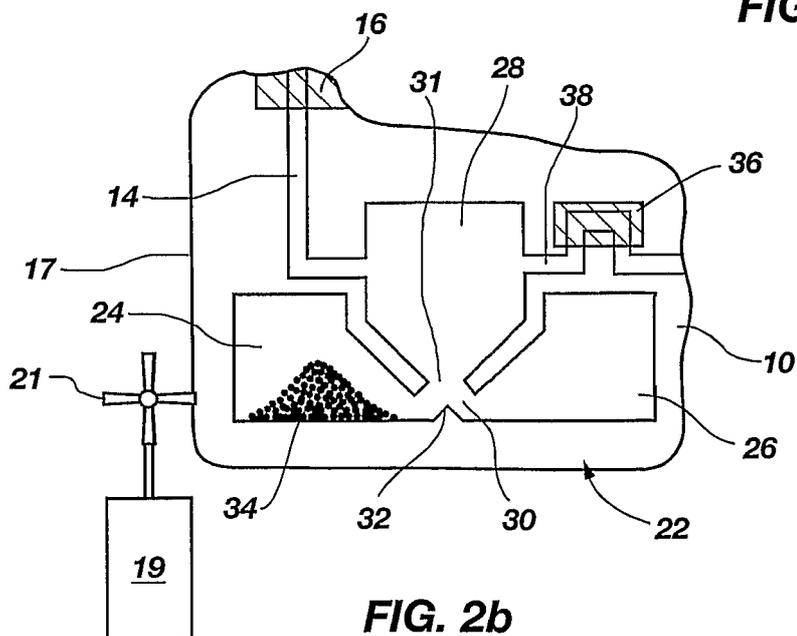


FIG. 2b

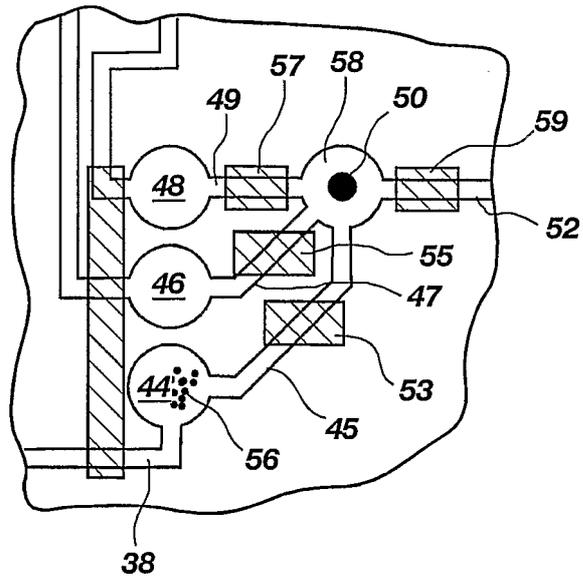


FIG. 3

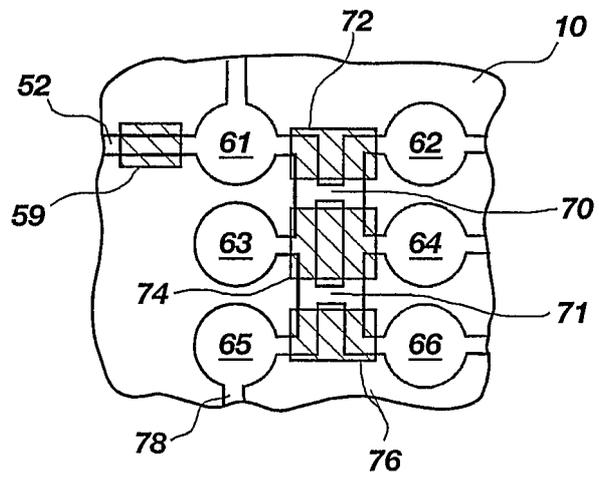


FIG. 4

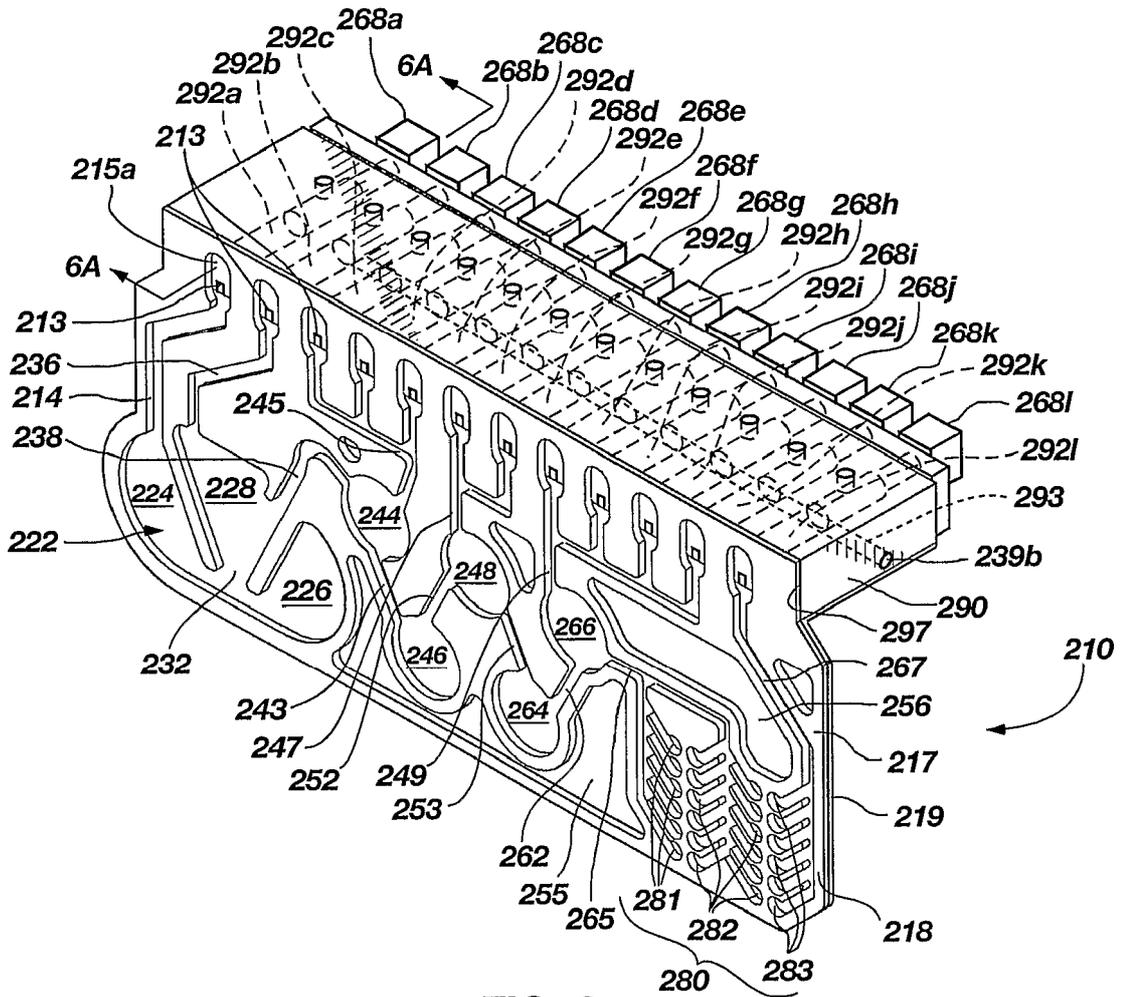


FIG. 6

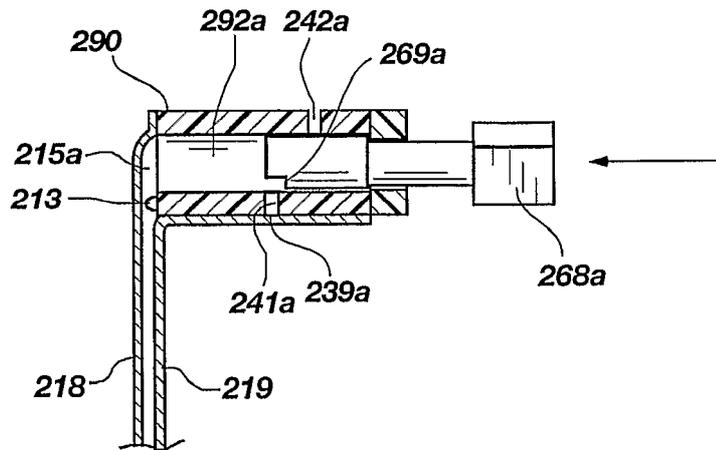


FIG. 6a

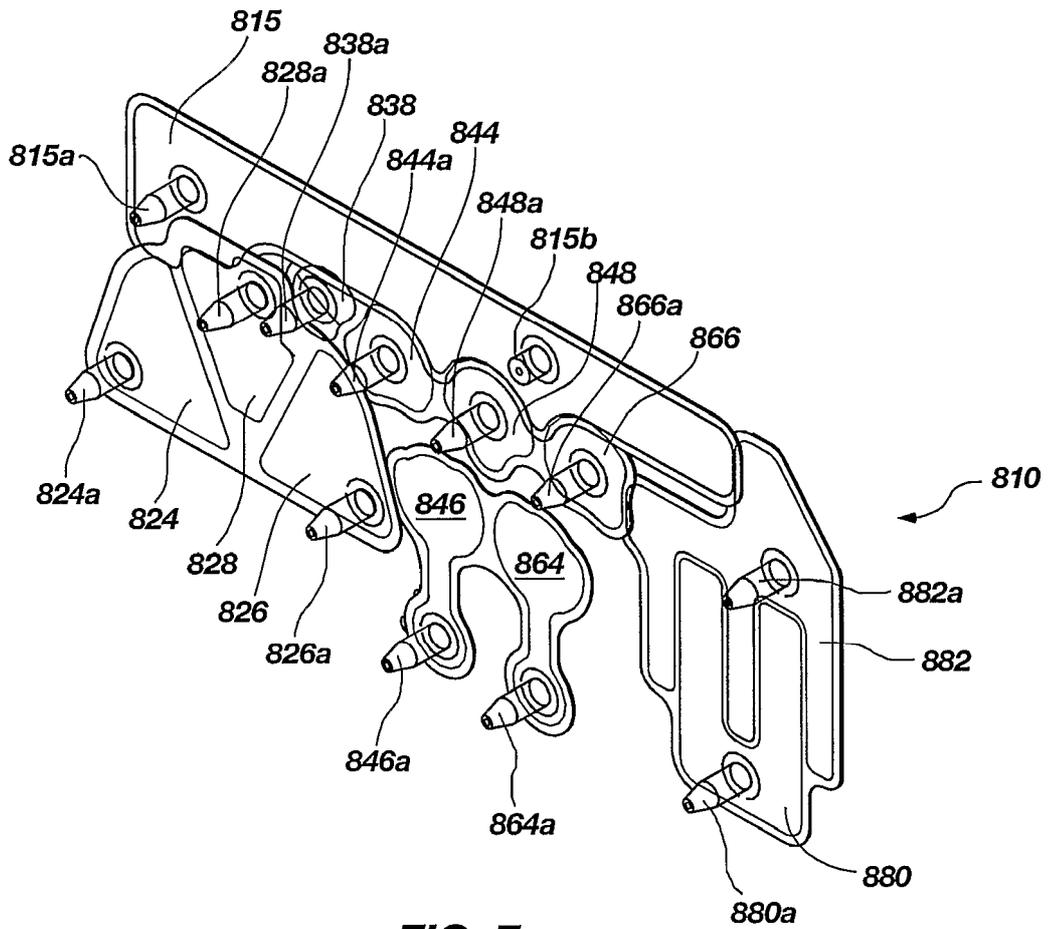


FIG. 7

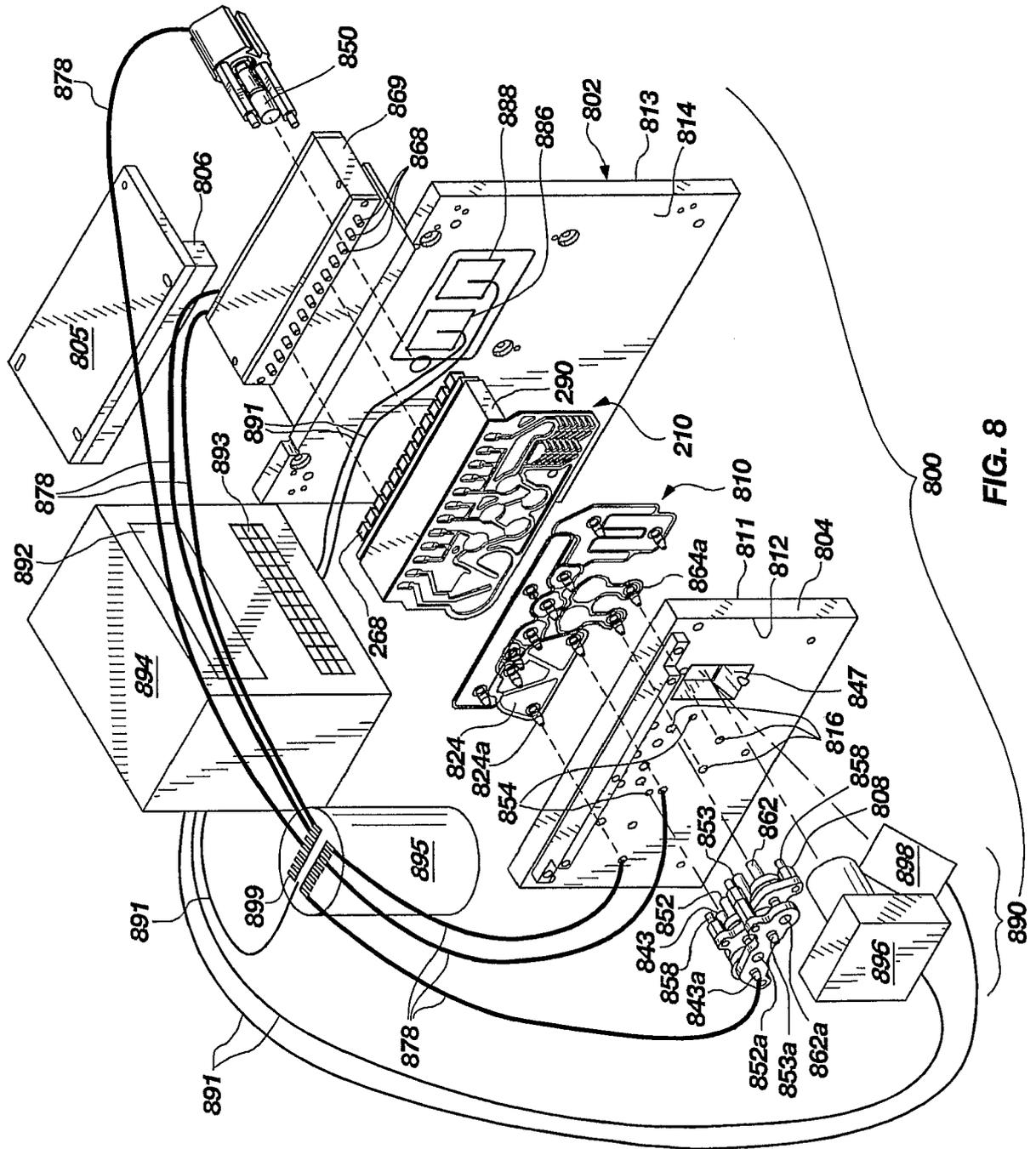


FIG. 8

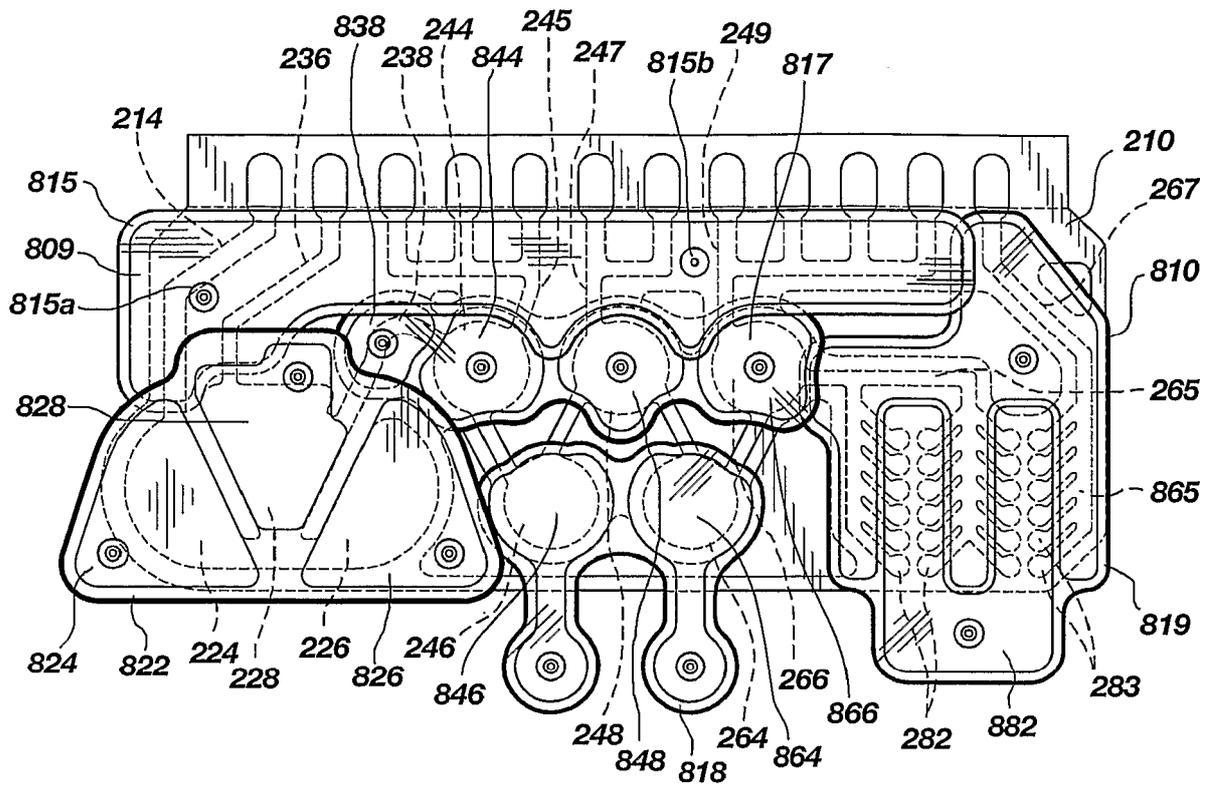


FIG. 9

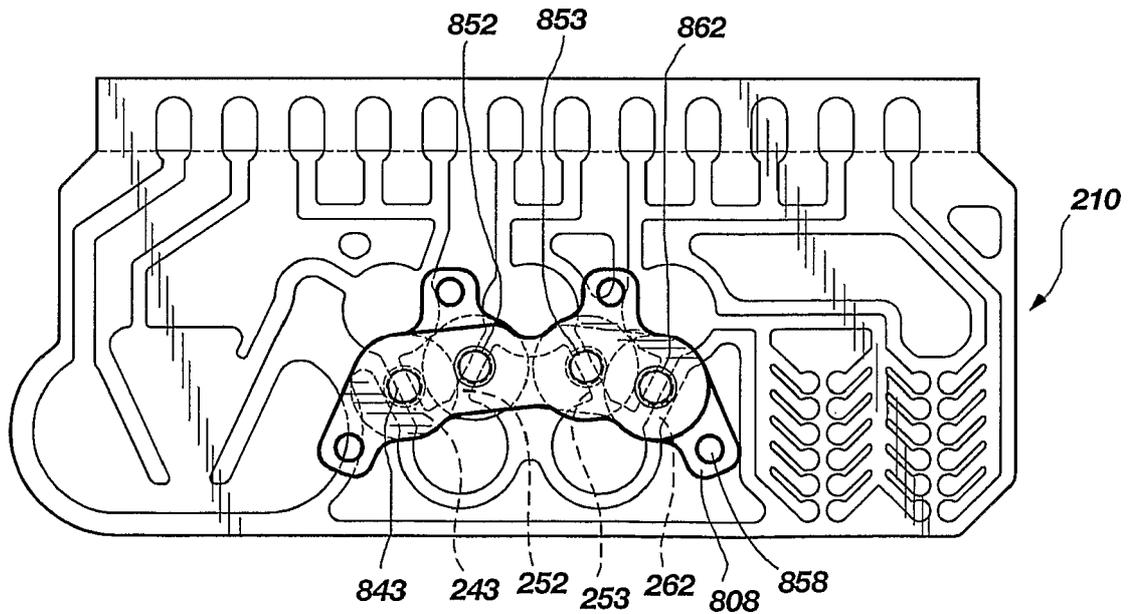


FIG. 10

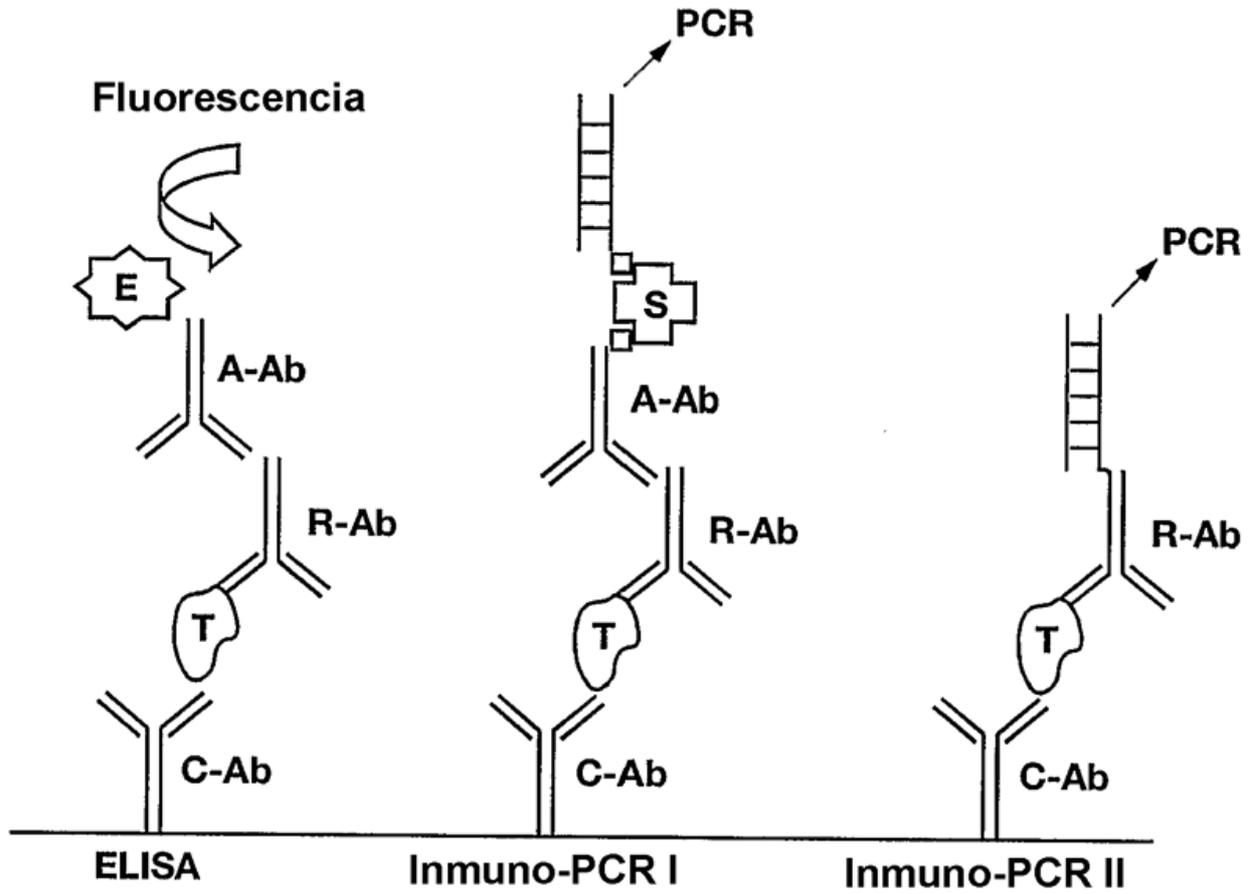


FIG. 11

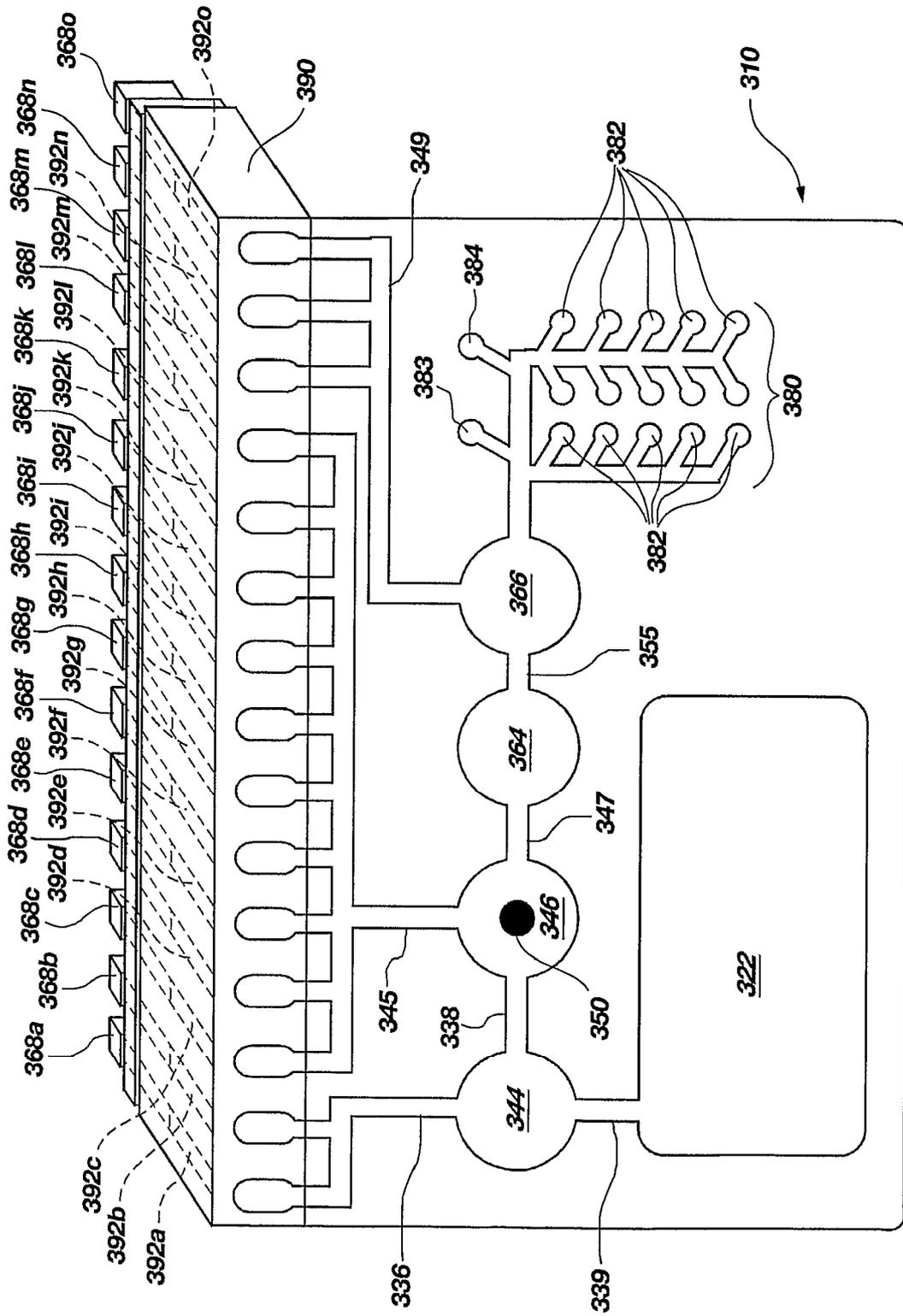


FIG. 12

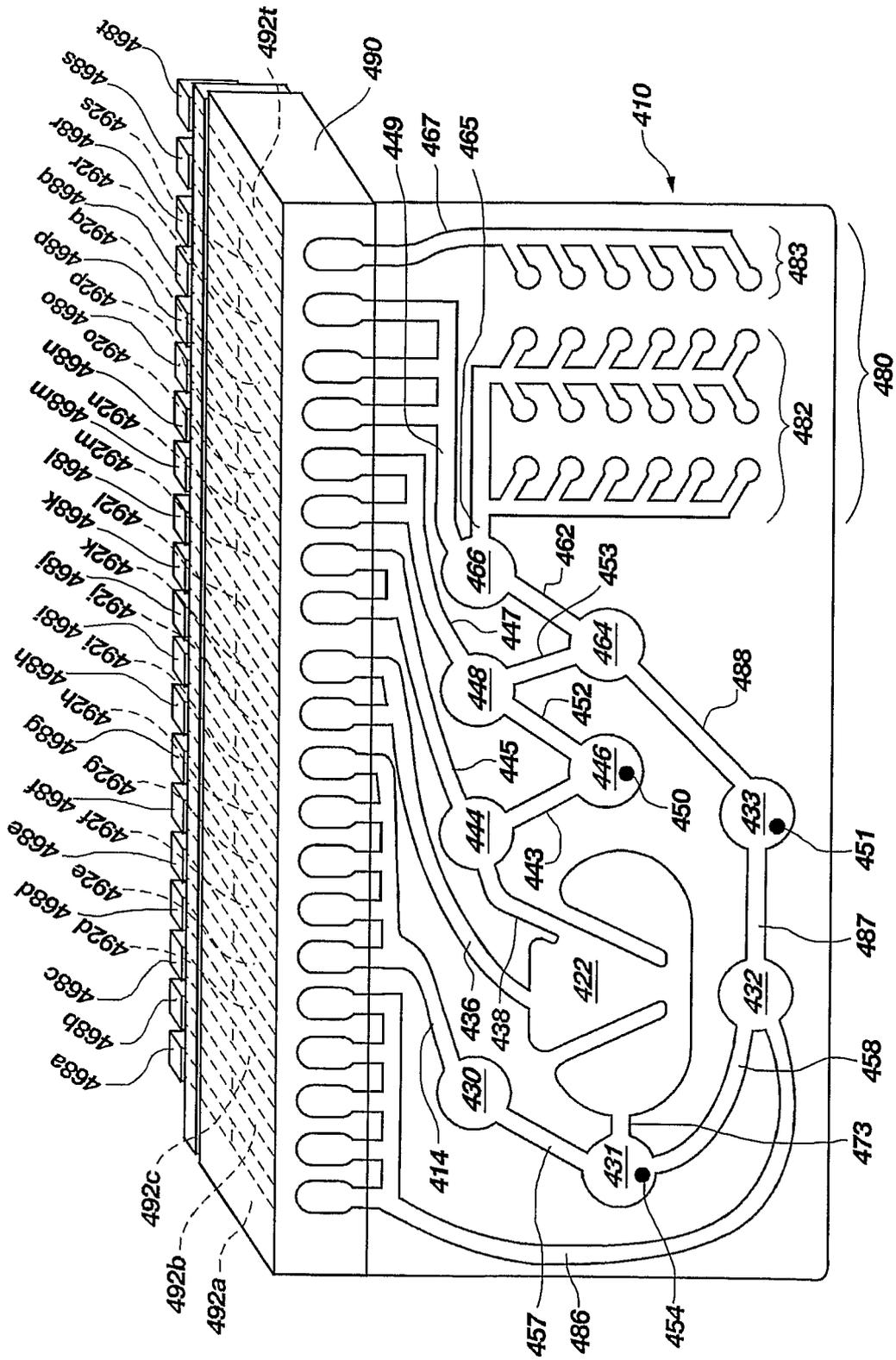


FIG. 13

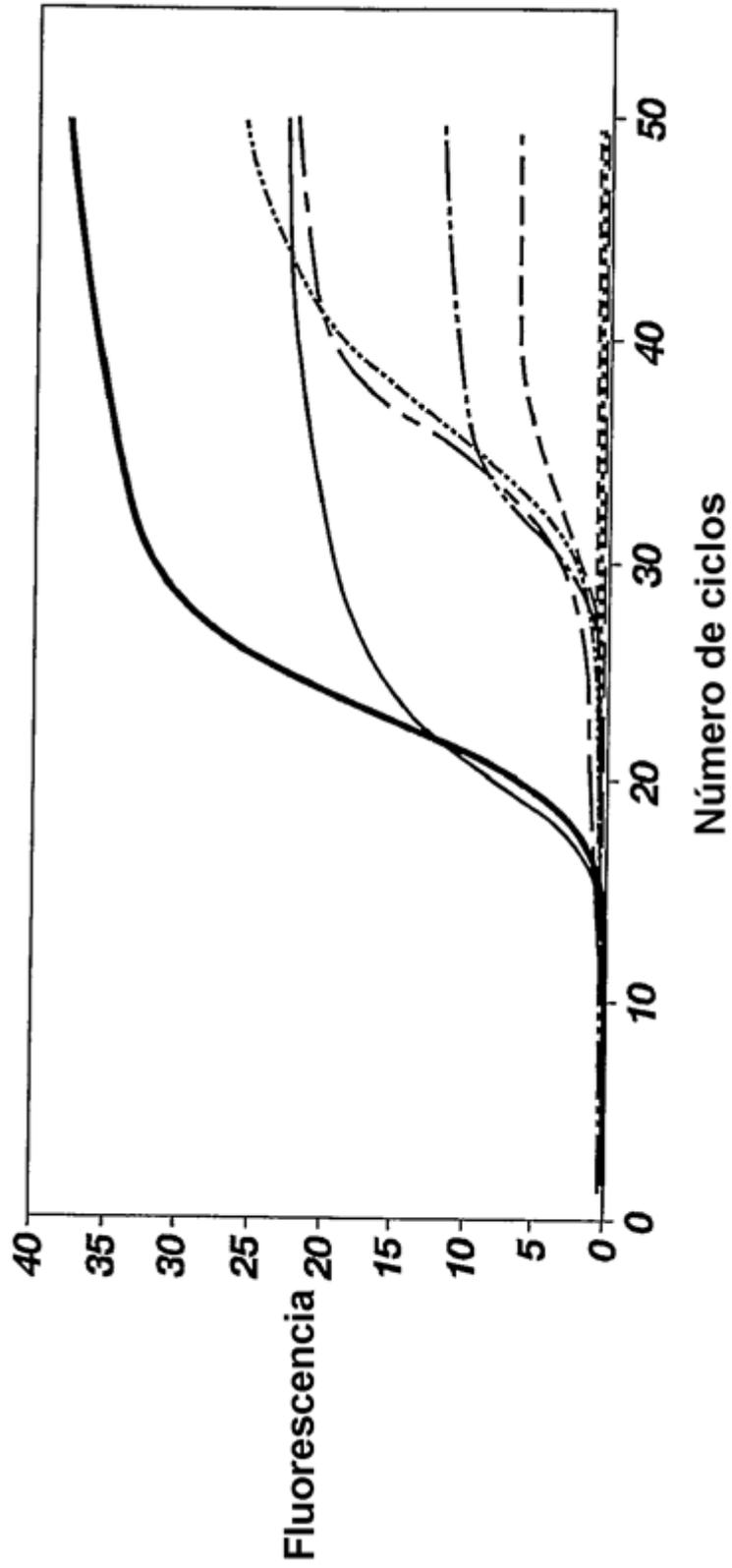


FIG. 14

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

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

Documentos de patentes citados en la descripción

- US 2003008308 A
- US 6645758 B
- US 6780617 B
- US 478453 A
- US 512255 A
- US 6605451 B
- US 6730501 B

Literatura no patente citada en la descripción

- **FINDLAY et al.** Automated closed-vessel system for in vitro diagnostics based on polymerase chain reaction. *Clinical Chemistry*, 1993, vol. 39 (9), 1927-1933
- **SANO, T. et al.** *Science*, 1992, vol. 258 (5079), 120-2
- **WITTWER CT ; FILLMORE GC ; GARLING DJ.** Minimizing the time required for DNA amplification by efficient heat transfer to small samples. *Anal Biochem.*, 01 May 1990, vol. 186 (2), 328-31
- **WITTWER CT ; GARLING DJ.** Rapid cycle DNA amplification: time and temperature optimization. *Biotechniques*, January 1991, vol. 10 (1), 76-83
- **WITTWER CT ; HERRMANN MG ; MOSS AA ; RASMUSSEN RP.** Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques*, January 1997, vol. 22 (1), 130-1, 134-8
- **WITTWER CT ; RIRIE KM ; ANDREW RV ; DAVID DA ; GUNDRY RA ; BALIS UJ.** The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *Biotechniques*, January 1997, vol. 22 (1), 176-81
- **GUNDRY CN ; VANDERSTEEN JG ; REED GH ; PRYOR RJ ; CHEN J ; WITTWER CT.** Amplicon melting analysis with labeled primers: a closed-tube method for differentiating homozygotes and heterozygotes. *Clin Chem.*, March 2003, vol. 49 (3), 396-406
- **WITTWER CT ; REED GH ; GUNDRY CN ; VANDERSTEEN JG ; PRYOR RJ.** High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clin Chem.*, June 2003, vol. 49 (6), 853-60
- **MCKINNEY JT ; LONGO N ; HAHN S ; MATERN D ; RINALDO P ; DOBROWOLSKI SF.** Comprehensive analysis of the human medium chain acyl-CoA dehydrogenase gene. *Mol Gen Metab*
- **DOBROWOLSKI SF ; AMAT DI SAN FILIPPO C ; MCKINNEY JT ; WILCKEN B ; LONGO N.** Identification of novel mutations in the SLC22A5 gene in primary carnitine deficiency with dye-binding/high-resolution thermal denaturation. *Human Mutation*
- **MCKINNEY JT ; SAUNDERS C ; DOBROWOLSKI SF.** High-resolution melting analysis of the human galactose-1-phosphate uridylyl transferase gene
- **PORITZ MA ; ABBOTT R ; GERBER T ; THATCHER S ; BIRD A ; TUCK A ; NEWSWANDER AM ; BELISLE S ; RIRIE K ; A HAND-HELD.** Battery-operated Real-time PCR Machine. American Society for Microbiology Annual Meeting, 09 March 2003
- **ELNIFRO EM ; ASHSHI AM ; COOPER RJ ; KLAPPER PE.** Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. *Clin Microbiol Rev.*, October 2000, vol. 13 (4), 559-70
- **ELNIFRO EM ; COOPER RJ ; KLAPPER PE ; YEO AC ; TULLO AB.** Multiplex polymerase chain reaction for diagnosis of viral and chlamydial keratoconjunctivitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, June 2000, vol. 41 (7), 1818-22
- **GIAEVER, G. et al.** Genomic profiling of drug sensitivities via induced haploinsufficiency. *Nature Genetics*, 1999, vol. 21, 278-283
- **WINZELER, E. et al.** Functional Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* Genome by Gene Deletion and Parallel Analysis. *Science*, 1999, vol. 285, 901-906
- **SANO, T. ; C.L. SMITH ; C.R. CANTOR.** Immuno-PCR: very sensitive antigen detection by means of specific antibody-DNA conjugates. *Science*, 1992, vol. 258 (5079), 120-2
- **NIEMEYER, C.M. ; M. ADLER ; R. WACKER.** Immuno-PCR: high sensitivity detection of proteins by nucleic acid amplification. *Trends Biotechnol*, 2005, vol. 23 (4), 208-16

- **ADLER, M.** Immuno-PCR as a clinical laboratory tool. *Adv Clin Chem*, 2005, vol. 39, 239-92
- **BARLETTA, J.M. et al.** Detection of ultra-low levels of pathologic prion protein in scrapie infected hamster brain homogenates using real-time immuno-PCR. *J Virol Methods*, 2005, vol. 127 (2), 154-64
- **ADLER, M. et al.** Detection of Rotavirus from stool samples using a standardized immuno-PCR ("Imperacer") method with end-point and real-time detection. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, vol. 333 (4), 1289-94 [0127]
- **LIND, K. ; M. KUBISTA.** Development and evaluation of three real-time immuno-PCR assemblages for quantification of PSA. *J Immunol Methods*, 2005, vol. 304 (1-2), 107-16
- **SCHIAVO, S. et al.** Comparison of fluorometric detection methods for quantitative polymerase chain reaction (PCR). *J Immunoassay Immunochem*, 2005, vol. 26 (1), 1-12
- **BARLETTA, J.M. ; D.C. EDELMAN ; N.T. CONSTANTINE.** Lowering the detection limits of HIV-1 viral load using real-time immuno-PCR for HIV-1 p24 antigen. *Am J Clin Pathol*, 2004, vol. 122 (1), 20-7
- **MCKIE, A. et al.** A quantitative immuno-PCR assay for the detection of mumps-specific IgG. *J Immunol Methods*, 2002, vol. 270 (1), 135-41
- **CHAO, H.Y. et al.** A highly sensitive immuno-polymerase chain reaction assay for Clostridium botulinum neurotoxin type A. *Toxicon*, 2004, vol. 43 (1), 27-34
- **WU, H.C. et al.** Detection of Clostridium botulinum neurotoxin type A using immuno-PCR. *Lett Appl Microbiol*, 2001, vol. 32 (5), 321-5
- **LIANG, H. et al.** A highly sensitive immuno-PCR assay for detecting Group A Streptococcus. *J Immunol Methods*, 2003, vol. 279 (1-2), 101-10
- **ADLER, M. ; R. WACKER ; C.M. NIEMEYER.** A real-time immuno-PCR assay for routine ultrasensitive quantification of proteins. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, vol. 308 (2), 240-50
- **ALLEN, R.C. et al.** An immuno-PCR method for detecting Bacillus thuringiensis CryIAC toxin. *J Immunol Methods*, 2006, vol. 308 (1-2), 109-15
- **HENDRICKSON, E.R. et al.** High sensitivity multianalyte immunoassay using covalent DNA-labeled antibodies and polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res*, 1995, vol. 23 (3), 522-9
- **JOERGER, R.D. et al.** Analyte detection with DNA-labeled antibodies and polymerase chain reaction. *Clin Chem*, 1995, vol. 41 (9), 1371-7