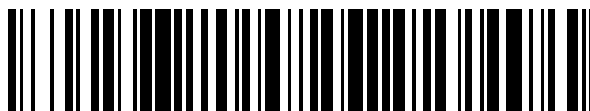


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 583 135**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C12M 1/38 (2006.01)

B01L 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.04.2012 E 12774413 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.04.2016 EP 2699700**

54 Título: **Dispositivo integrado para la detección e identificación de ácidos nucleicos**

30 Prioridad:

20.04.2011 US 201161477357 P

20.04.2011 US 201161477437 P

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

19.09.2016

73 Titular/es:

**MESA BIOTECH, INC. (100.0%)
6181 Cornerstone Court, Suite 101
San Diego, California 92121-4727, US**

72 Inventor/es:

**DEJOHN, MARC;
CARY, ROBERT B. y
COBB, NATHAN J.**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 583 135 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

Dispositivo integrado para la detección e identificación de ácidos nucleicos

Antecedentes de la invención

Campo de la invención (Campo técnico):

- 5 Las realizaciones de la presente invención se refieren a un dispositivo integrado y a procedimientos relacionados para detectar e identificar ácidos nucleicos. El dispositivo puede ser totalmente desechable o puede comprender una porción desechable y una porción reutilizable.

Antecedentes de la técnica

- 10 Obsérvese que la siguiente discusión hace referencia a una serie de publicaciones y referencias. La discusión de dichas publicaciones en la presente memoria se da para unos antecedentes más completos de los principios científicos, y no ha de considerarse como la admisión de que dichas publicaciones son técnica anterior con fines de determinación de la patentabilidad.

- 15 A medida que ha aumentado el impacto sobre la salud pública y la concienciación sobre enfermedades infecciosas emergentes, amenazas biológicas, enfermedades genéticas y reservorios ambientales de patógenos, la necesidad de ensayos rápidos más informativos en el punto de uso, sensibles y específicos ha aumentado la demanda de herramientas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La prueba molecular basada en ácido nucleico mediante procedimientos tales como amplificación basada en PCR es extremadamente sensible, específica e informativa. Desgraciadamente, los ensayos de ácido nucleico disponibles actualmente son inadecuados o de utilidad limitada para uso de campo debido a que requieren una instrumentación elaborada y costosa, materiales de laboratorio especializados y/o múltiples manipulaciones dependientes de la intervención del usuario. Por
- 20 consiguiente, la mayoría de muestras para prueba molecular se envían a laboratorios centralizados, dando como resultado tiempos de respuesta prolongados para obtener la información requerida.

- 25 Para enfrentarse a la necesidad de pruebas moleculares rápidas en el punto de uso, los esfuerzos anteriores se han centrado en diseños de producto que emplean un cartucho desechable y un instrumento asociado relativamente caro. El uso de instrumentación externa para lograr el movimiento de fluido, control de la temperatura de amplificación y detección simplifica muchos de los retos de ingeniería inherentes a la integración de los múltiples procesos requeridos para la prueba molecular. Desgraciadamente, la dependencia de una instrumentación elaborada impone enormes barreras económicas para clínicas pequeñas, agencias de gobiernos locales y estatales y cuerpos de seguridad. Además, la dependencia de un pequeño número de instrumentos para hacer funcionar las
- 30 pruebas podría causar retrasos innecesarios durante periodos de gran necesidad, como ocurre durante la sospecha de liberación de un agente de guerra bacteriológica o una epidemia emergente. Es más, el modelo de instrumento y cartucho de reactivo desechable presenta un cuello de botella potencialmente significativo cuando un brote demanda capacidad de reacción y producción aumentada. Adicionalmente, la dependencia de la instrumentación complica la distribución *ad hoc* de dispositivos de prueba en los sitios de despliegue cuando las limitaciones logísticas impiden el
- 35 transporte de equipos asociados voluminosos o están ausentes requisitos de infraestructura (p.ej., fuentes de energía fiables).

- 40 Se ha descrito la gravedad como un medio de movimiento de fluido en los dispositivos microfluídicos existentes. Sin embargo, el dispositivo típico no permite un control programable o electrónico de dicho movimiento de fluido, ni la mezcla de más de dos fluidos. También algunos dispositivos utilizan una caída de presión generada por una caída de fluido inerte o preempaquetado para inducir un ligero vacío y extraer los reactantes hasta cámaras de procesamiento cuando están orientadas verticalmente, lo que aumenta las complejidades de almacenamiento y transporte para asegurar la estabilidad de los fluidos preempaquetados. Los dispositivos existentes que enseñan a mover un fluido en una pluralidad de etapas discretas requieren sellos o válvulas frágiles entre cámaras, lo que complica la operación y fabricación. Estos dispositivos no enseñan el uso de ventiladeros separados localizados
- 45 remotamente para cada cámara empleada en procedimientos de laboratorio estándares. La PCR u otras reacciones de amplificación de ácido nucleico tales como amplificación mediada por bucle (LAMP), amplificación de secuencia basada en ácido nucleico (NASBA) y otros procedimientos de ciclación isotérmica y térmica se realizan típicamente en laboratorios de análisis e investigación usando volúmenes de reacción de 5 a 100 microlitros. Estos volúmenes de reacción admiten volúmenes de espécimen de prueba suficientes para asegurar la detección de dianas de
- 50 ensayo escasas en especímenes diluidos. Los sistemas microfluídicos que reducen los volúmenes de reacción respecto a los empleados en las pruebas moleculares de laboratorio tradicionales reducen necesariamente también el volumen del espécimen que puede añadirse a la reacción. El resultado del menor volumen de reacción es una reducción de la capacidad de admitir un volumen de espécimen suficiente para asegurar la presencia de cantidades detectables de diana en especímenes diluidos o cuando las dianas de ensayo son escasas.

- 55 El documento US2008/124720 A1 da a conocer un procedimiento y un aparato para procesar y analizar muestras, particularmente muestras de ADN, en los que la muestra se introduce en un conducto, en que el conducto tiene al menos un reactivo de procesamiento de muestra encapsulado por un material hidrófobo sólido o semisólido. Se aplica calor de modo que el material sólido o semisólido se licúe, lo que provoca que el reactivo de procesamiento

de muestra se mueva a lo largo del conducto permitiendo que el reactivo de procesamiento de muestra entre en contacto con la muestra formando una mezcla de productos, seguido de la detección de la presencia y la concentración de un cierto producto en la mezcla de productos. Se provoca el movimiento del reactivo de procesamiento de muestra a lo largo del conducto mediante la aplicación de una presión aumentada o reducida al conducto.

Sumario de la invención

Es una realización de la presente invención una plataforma desechable para detectar un ácido nucleico diana, comprendiendo la plataforma desechable una cámara de muestras para recibir una muestra que comprende el ácido nucleico diana; una cámara de amplificación conectada a través de un primer canal con la cámara de muestras y conectada a través de un segundo canal con un primer recinto de ventilación; una cámara de marcaje conectada a través de un tercer canal con la cámara de amplificación y conectada a través de un cuarto canal con un segundo recinto de ventilación; un subsistema de detección conectado con la cámara de marcaje a través de un quinto canal y conectado a través de un sexto canal con un tercer recinto de ventilación; una pluralidad de elementos de calentamiento resistivo y uno o más dispositivos de medida de la temperatura; en la que los recintos de ventilación se sellan cada uno a baja presión por una membrana termolábil localizada en la cercanía de uno de los elementos de calentamiento resistivo. La plataforma desechable comprende opcionalmente además una etapa de preparación de muestra que comprende una salida en conexión de fluido directa con una entrada de la cámara de muestras. Las dimensiones de la superficie sustancialmente plana de la cámara de amplificación son preferiblemente aproximadamente las mismas que las dimensiones de la superficie sustancialmente plana del elemento de calentamiento resistivo en contacto térmico con la cámara de amplificación. La cámara de amplificación preferiblemente no se enfría por un dispositivo de enfriamiento activo. La cámara de amplificación contiene opcionalmente una solución de amplificación, la cámara de muestras comprende opcionalmente una mezcla reactiva de amplificación líquida o una mezcla reactiva de amplificación liofilizada y/o la cámara de marcaje comprende opcionalmente partículas de detección. La cámara de marcaje es preferiblemente calentable usando uno de los elementos de calentamiento resistivo. El subsistema de detección comprende una tira de flujo lateral que preferiblemente no comprende partículas de detección. Las cámaras, los canales y los recintos de ventilación están preferiblemente localizados sobre una capa de ensamblaje de fluido y los elementos electrónicos están preferiblemente localizados sobre una capa separada que comprende una placa de circuito impreso, con la capa separada unida a la capa de ensamblaje de fluido. El subsistema de detección está preferiblemente localizado sobre la capa de ensamblaje de fluido u opcionalmente sobre una segunda capa de ensamblaje de fluido. El volumen de al menos una de las cámaras está preferiblemente entre aproximadamente 1 microlitro y aproximadamente 50 microlitros. La plataforma desechable comprende preferiblemente además un conector para acoplar la plataforma desechable con una unidad básica que no es un instrumento externo y que mantiene la plataforma desechable en orientación vertical o inclinada.

Una realización de la presente invención es un procedimiento para detectar un ácido nucleico diana, consistiendo el procedimiento en disponer una muestra que comprende el ácido nucleico diana en una cámara de muestras de una plataforma desechable de la invención; orientar la plataforma desechable verticalmente o inclinada; hacer reaccionar la muestra con una mezcla reactiva de amplificación líquida o anteriormente liofilizada; abrir a la atmósfera un primer recinto de ventilación conectado con una cámara de amplificación, posibilitando así que la muestra reaccionada fluya a la cámara de amplificación; amplificar el ácido nucleico diana en la cámara de amplificación; abrir a la atmósfera un segundo recinto de ventilación conectado con una cámara de marcaje, posibilitando así que el ácido nucleico diana amplificado fluya a la cámara de marcaje; marcar el ácido nucleico diana amplificado usando partículas de detección en la cámara de marcaje; abrir a baja presión un tercer recinto de ventilación conectado con un subsistema de detección, posibilitando así que el ácido nucleico diana marcado fluya al subsistema de detección, y detectar el ácido nucleico diana amplificado. La etapa de amplificación comprende preferiblemente amplificar el ácido nucleico diana usando un elemento de calentamiento resistivo localizado dentro de la plataforma desechable en la cercanía de la cámara de amplificación. El procedimiento comprende preferiblemente además enfriar pasivamente la cámara de amplificación. El procedimiento comprende preferiblemente además calentar la cámara de marcaje durante la etapa de marcaje usando un elemento de calentamiento resistivo localizado dentro de la plataforma desechable en la cercanía de la cámara de marcaje. El subsistema de detección preferiblemente no comprende partículas de detección. El procedimiento comprende preferiblemente además controlar la operación de la plataforma desechable usando una estación de acoplamiento que no es un instrumento externo.

Los objetos, ventajas y rasgos novedosos y el alcance adicional de la aplicabilidad de la presente invención se expondrán en parte en la descripción detallada siguiente, tomada junto con los dibujos acompañantes, y en parte resultarán evidentes para los especialistas en la materia tras el examen de lo siguiente, o puede aprenderse mediante la práctica de la invención. Los objetos y ventajas de la invención pueden realizarse y alcanzarse mediante instrumentaciones y combinaciones particularmente señaladas en las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

Los dibujos acompañantes, que se incorporan a y forman parte de la memoria descriptiva, ilustran realizaciones de la presente invención y, junto con la descripción, sirven para explicar los principios de la invención. Los dibujos son solo con fines de ilustración de ciertas realizaciones de la invención y no han de considerarse como limitantes de la

invención. En los dibujos:

5 La FIG. 1 es un dibujo que ilustra las capas fluidica y electrónica para una realización de la presente invención. El fluido de muestra preparada entra en la cámara de muestras, donde se mezcla con reactivos preferiblemente liofilizados. En orientación vertical, la presión de la columna de fluido se equilibra con el volumen sellado de aire debajo de la misma. La capilaridad evita el escape de aire y el avance adicional de fluido. Cuando se rompe el sello de recinto apropiado debajo del correspondiente recinto de ventilación, el fluido se mueve a través del canal de salida a la siguiente cámara para procesamiento adicional. El control de temperatura y fluido se consigue preferiblemente usando componentes de ensamblaje de circuito impreso (PCA) y técnicas de ensamblaje estándares.

10 La FIG. 2A es una representación esquemática de un mecanismo de ventilación empleado en una realización de la presente invención para lograr un movimiento de fluido controlado dentro de la capa fluidica. La FIG. 2B es un dibujo que ilustra la localización y construcción del ventiladero en una realización de la presente invención. Una membrana mantiene la presión de la columna de fluido por encima de la ambiental. Cuando se aplica suficiente calor, se rompe la membrana y permite que se equilibre la presión. El fluido se mueve a lo largo del gradiente de presión hidrostática. Las presiones pueden ser menores de unos pocos mbar.

15 La FIG. 3 muestra detalles adicionales del calentador resistivo de una realización de la presente invención. Dos resistores (elementos de calentamiento) de dispositivo de montaje superficial (SMD) de película gruesa de tamaño 2512 flanquean un termistor (sensor de temperatura) de tamaño 0402 sobre la placa de circuito impreso (PCB). Una capa fina de compuesto térmico en la interfaz del resistor o resistores y la cámara de amplificación mantiene la conductividad térmica con los calentadores y el sensor. Las dimensiones de la cámara se eligen preferiblemente para maximizar la relación de área/volumen.

20 La FIG. 4 representa realizaciones de la presente invención que respaldan metodologías de termociclación o amplificación de ácido nucleico de base isotérmica. La FIG. 4A muestra un PCA con cuatro pares de resistor/termistor. Cuatro resistores de montaje superficial sirven como cuatro calentadores controlables independientemente (flechas). La FIG. 4B muestra un ensamblaje fluidoico enlazado con el PCA de la FIG. 4A consecuente con el detalle de calentador resistivo de la FIG. 3. La capa fluidica interacciona con los resistores de montaje superficial del PCA proporcionando cámaras de reacción para amplificación de ácido nucleico. La FIG. 4C muestra la electroforesis en gel de reacciones de amplificación que producen un producto de ~150 pb (pares de bases) a partir de una máquina de PCR (LAB) o mediante una realización de la presente invención (μ Heater) por termociclación. El carril más a la izquierda es un patrón de tamaño. La FIG. 4D es una gráfica de temperatura frente al tiempo en segundos para el fluido dentro de la cámara de amplificación de las presentes realizaciones. La línea más oscura indica la temperatura de la solución en la cámara de reacción obtenida por termopar. La línea más clara es la temperatura medida por el termistor usado por el microcontrolador para el control de la temperatura. Pueden lograrse 40 ciclos de una reacción PCR de dos temperaturas en menos de 20 minutos usando un volumen de reacción de 20 μ l. La FIG. 4E muestra la electroforesis en gel de reacciones de amplificación isotérmica basada en secuencias de ácido nucleico (NASBA) que producen un producto de ~150 pb a partir de una máquina de PCR (control positivo) o mediante el uso de una realización de la presente invención. Cuatro reacciones separadas indican tanto el ajuste del sensor de temperatura como el tratamiento de superficie particular aplicado al interior de la cámara fluidica.

30 La FIG. 5 ilustra una realización de la presente invención que comprende la técnica de transportar fluido sin el uso de un ventiladero. Al calentar la cámara debajo de la columna de fluido, el gas se expandirá y se autopurgará a través del canal de entrada. Tras enfriar, el gas en el volumen de la cámara se contraerá y se extraerá un volumen de fluido proporcional al de gas purgado. El fluido cae al suelo de la cámara. Sucesivas repeticiones de este ciclo pueden mover todo el volumen de reacción. La operación de esta técnica depende del tamaño del canal, la longitud, el tiempo y la temperatura de calentamiento, los volúmenes de cámara y las energías superficiales de los componentes.

35 La FIG. 6 muestra el detalle y el funcionamiento de una cámara de marcaje de una realización de la presente invención. El fluido que contiene amplicón entra en la cámara de marcaje a través del canal de entrada y se pone en contacto con partículas de detección. Se logra un mezclado suficiente calentando o hirviendo el fluido. Las burbujas nacientes nucleadas en el fondo y los lados de la cámara, preferiblemente por un rasgo texturado tal como una línea o serie de líneas grabadas con láser, agitan preferiblemente la mezcla eficazmente. En esta realización, los componentes de SMD son los mismos que los usados en el calentador de amplificación.

40 La FIG. 7 muestra los componentes de la capa fluidica de una realización de la presente invención. Se une un componente de pared de grosor elegido por los dos lados con componentes de cara. En una realización, el componente de pared es acrílico cortado con láser de 0,5 mm y las caras son película de poliéster (PET) de 0,10 mm. Las piezas se unen preferiblemente entre sí con un adhesivo de transferencia de silicona. Las superficies interiores se tratan para controlar la humectación. Los reactivos y el ensamblaje de flujo lateral se añaden durante la fabricación. Se sella preferiblemente una membrana adhesiva sobre los recintos de ventilación.

45 La FIG. 8 muestra el lado del PCA hacia el ensamblaje fluidoico de una realización de la presente invención en que

los elementos de calentamiento son resistores de película gruesa. El sensor de temperatura es un termistor de SMD pequeño colocado en estrecha proximidad de los calentadores. El PCA puede incorporar opcionalmente LED indicadores para monitorizar la progresión del ensayo, el calentamiento y la apertura de ventilación.

5 La FIG. 9 es un dibujo que ilustra el módulo fluido unido al PCA con un relleno adhesivo de acuerdo con una realización de la presente invención. El grosor del relleno puede ser importante para un distanciamiento y funcionamiento apropiados de los ventiladores y calentadores.

10 La FIG. 10A muestra el PCA desechable de una realización de configuración de la invención semidesechable. El PCA contiene solo componentes electrónicos que interactúan con el ensamblaje fluido desechable. Este incluye los elementos de calentamiento, sensores de temperatura y opcionalmente indicadores LED. Está presente un conector para completar el circuito y opcionalmente para añadir soporte en la orientación vertical.

15 La FIG. 10B muestra el PCA desechable/ensamblaje fluido de la FIG. 10A en su sitio de una estación de acoplamiento. La estación de acoplamiento contiene la electrónica de control y el suministro de energía y es opcionalmente fácilmente portátil y de mano. Se inserta la porción desechable que contiene el PCA y los ensamblajes fluidos en el conector, preferiblemente en una orientación vertical. Puede estar opcionalmente presentes en algunas realizaciones una interfaz de usuario, que incluye LED indicadores, LCD y controles de usuario. La estación de acoplamiento puede incluir botones para iniciar los procesos electrónicos requeridos para el ensayo.

20 La FIG. 11A es un dibujo del lado frontal del PCA de una realización de configuración de la invención desechable. Este lado hace frente al ensamblaje fluido. Están presentes en esta realización elementos de calentamiento y sensores, así como los componentes de interfaz de usuario tales como indicadores LED.

25 La FIG. 11 B es un dibujo que ilustra la disposición del lado posterior del PCA de la configuración de la invención desechable de la FIG. 11A. Este lado de la PCB contiene los circuitos de control tales como microcontrolador, interruptores MOSFET y circuitos secundarios. En esta realización, están presentes terminales para una batería de 9 V, así como dispositivos de interfaz de usuario opcionales tales como interruptores táctiles útiles para la iniciación del ensayo.

La FIG. 11C es un dibujo del PCA de la FIG. 11B con una pila de 9 V instalada. La carcasa de plástico no se muestra. La colocación de la pila es preferiblemente como se muestra para reducir el centro de masa y para ayudar a prevenir la inclinación o volcado del dispositivo durante la operación.

30 La FIG. 12 es una ilustración de una realización semidesechable de la presente invención en la que un subsistema de preparación de muestra interactúa con las capas fluida y electrónica de amplificación y detección.

La FIG. 13 muestra los componentes de una realización de una capa fluida multicapa incorporada a un ensayo desechable.

La FIG. 14 muestra una vista despiezada de un cartucho de ensayo desechable que incorpora la capa fluida de la FIG. 13.

35 La FIG. 15 es una ilustración del PCA desechable/ensamblaje fluido ensamblados de la FIG. 14 en su sitio de una estación de acoplamiento.

40 La FIG. 16 son fotografías de las capas fluidas de una realización de la presente invención que respaldan la amplificación y detección de ácido nucleico basadas en termociclación. Se añadió a la cámara de muestras una solución de reacción que contenía todos los reactivos necesarios para respaldar la amplificación de ácido nucleico. En la FIG. 16A, se añadieron las enzimas requeridas a la solución de reacción en forma líquida. En la FIG. 16B, se suministraron las enzimas requeridas mediante la incorporación de un aglomerado liofilizado a la cámara de muestras. Se efectuó la amplificación y detección de ácido nucleico como se describe en el Ejemplo 1. La línea superior del ensamblaje de tira de detección representa el control positivo, un oligonucleótido complementario de la sonda de detección. La línea inmediatamente debajo del control positivo representa la línea de captura, un oligonucleótido inmovilizado complementario de la misma hebra de producto de amplificación que la sonda de detección.

45 Las FIG. 17A y 17B son fotografías de un dispositivo de prueba de ácido nucleico de muestra a resultado integrado fabricado haciendo interactuar un subsistema de preparación de muestra con la invención. Las realizaciones de la presente invención respaldan el aislamiento, amplificación y detección de ácido nucleico en un solo dispositivo integrado. Se efectuaron el aislamiento, amplificación y detección de ácido nucleico como se describe en el Ejemplo 2. La línea superior del ensamblaje de flujo lateral representa el control positivo, un oligonucleótido complementario de la sonda de detección. La línea inmediatamente debajo del control positivo representa la línea de captura, un oligonucleótido inmovilizado complementario de la misma hebra de producto de amplificación que la sonda de detección. El dispositivo se muestra después de la terminación del procesamiento de tejido de hoja macerado de un árbol cítrico que padece la enfermedad de enverdecimiento de los cítricos y ensayando los ácidos nucleicos aislados mediante el sistema de preparación de muestra integrado para *Candidatus liberibacter*, el agente etiológico del

enverdeamiento de cítricos.

Descripción detallada de la invención

5 Las realizaciones de la presente invención comprenden una plataforma desechable que integra medios de instrumentación independientes para realizar todas las etapas necesarias de un ensayo molecular de ácido nucleico y complementan los inmunoensayos rápidos de flujo lateral actuales con una nueva generación de pruebas de ácido nucleico que ofrecen análisis más informativos y sensibles. Las realizaciones de la presente invención facilitan un uso más amplio de las pruebas de ácido nucleico rápidas en clínicas pequeñas y con ajustes austeros donde es más probable que tengan un gran impacto enfermedades infecciosas, amenazas biológicas, pruebas agrícolas y ambientales. Ciertas realizaciones de la presente invención son completamente autocontenidas y desechables, lo que posibilita la "capacidad de respuesta" en momentos de demanda aumentada al permitir hacer funcionar pruebas paralelas sin cuellos de botella impuestos por la instrumentación. Adicionalmente, en aquellas áreas de aplicación en que sea preferible un cartucho desechable de bajo coste acoplado con una estación de acoplamiento económica alimentada a pilas o activada por un adaptador de CA, una realización de la invención en que se emplea una estación de acoplamiento sencilla reduce además los costes de la prueba al hacer los componentes reutilizables reutilizables y además económicos. La tecnología de plataforma dada a conocer en la presente memoria ofrece una sensibilidad similar a los procedimientos basados en la amplificación de ácido nucleico de laboratorio, unos mínimos intervención del usuario y requisitos de formación, especificidad de secuencia conferida tanto por amplificación como detección, múltiple capacidad, reactivos estables, compatibilidad con la fabricación a gran escala de bajo coste, operación con pilas para permitir el uso con ajustes austeros y una tecnología de plataforma flexible que permite la incorporación de biomarcadores adicionales o alternativos sin rediseño del dispositivo.

20 Las realizaciones de la presente invención proporcionan sistemas y procedimientos para la detección e identificación de bajo coste de ácido nucleico en el punto de uso adecuados para efectuar análisis en localizaciones remotas del entorno de laboratorio en que se efectuarían ordinariamente los ensayos. Ventajosamente, los volúmenes de reacción de amplificación de ácido nucleico pueden estar en el mismo intervalo de volumen usado comúnmente en las pruebas de laboratorio tradicionales (p.ej. 5-100 µl). La reacción realizada en realizaciones de la presente invención es por tanto directamente comparable con los ensayos de laboratorio aceptados, y permite la admisión de los mismos volúmenes de espécimen empleados típicamente en las pruebas moleculares tradicionales.

25 Las realizaciones de la presente invención pueden usarse para detectar la presencia de una secuencia o secuencias de ácido nucleico diana en una muestra. Las secuencias diana pueden ser ADN tal como ADN cromosómico o ADN extracromosómico (p.ej., ADN mitocondrial, ADN de cloroplasto, ADN de plásmido, etc.) o ARN (p.ej., ARNr, ARNm, ARN pequeños y ARN vírico). De forma similar, pueden usarse realizaciones de la invención para identificar polimorfismos de ácido nucleico, incluyendo polimorfismos de un solo nucleótido, deleciones, inserciones, inversiones y duplicaciones de secuencia. Además, pueden usarse realizaciones de la invención para detectar eventos de regulación génica tales como regulación positiva y negativa de genes al nivel de transcripción. Por tanto, las realizaciones de la invención pueden emplearse para aplicaciones tales como: 1) la detección e identificación de ácidos nucleicos patogénicos en muestras agrícolas, clínicas, alimentarias, ambientales y veterinarias; 2) la detección de biomarcadores genéticos de enfermedad y 3) el diagnóstico de enfermedad o estado metabólico mediante la detección de biomarcadores relevantes de la enfermedad o estado metabólico, tales como eventos de regulación génica (regulación positiva o negativa de ARNm o inducción de ARNm pequeños u otras moléculas de ácido nucleico generadas o reprimidas durante una enfermedad o estado metabólico) en respuesta a la presencia de un patógeno, toxina, otro agente etiológico, estímulo ambiental o estado metabólico.

30 Las realizaciones de la presente invención comprenden un medio de preparación, amplificación y detección de muestra de ácido nucleico diana tras la adición de una muestra de ácido nucleico, que comprende todos los aspectos de control de fluido, control de temperatura y mezclado de reactivos.

35 En algunas realizaciones de la invención, el dispositivo proporciona un medio para efectuar una prueba de ácido nucleico usando un suministro de energía portátil tal como una pila, y es totalmente desechable. En otras realizaciones de la invención, funciona un cartucho de prueba de ácido nucleico desechable junto con un componente electrónico reutilizable sencillo que no efectúa todas las funciones de una instrumentación de laboratorio típica.

40 Las realizaciones de la presente invención proporcionan un dispositivo de amplificación y detección de ácido nucleico que comprende, pero sin limitación, una carcasa, una placa de circuito y una capa fluídica o microfluídica. En ciertas realizaciones, la placa de circuito puede contener una variedad de componentes montados en superficie tales como resistores, termistores, diodos emisores de luz (LED), fotodiodos y microcontroladores. La capa fluídica o microfluídica es responsable de mover los volúmenes de reacción acuosa y puede elaborarse a partir de una variedad de plásticos y mediante una variedad de técnicas de fabricación, incluyendo la unión, fusión o laminación de piezas cortadas con láser, cortadas con chorro de agua o moldeadas por inyección. Los componentes fluídicos y de placa de circuito se mantienen juntos y su acoplamiento térmico puede potenciarse mediante materiales o compuestos termoconductores. La carcasa sirve preferiblemente como parte de un funda cosmética y protectora, que esconde los componentes delicados de las capas microfluídica y de placa de circuito, y puede servir también para facilitar la entrada de muestra, la liberación de tampón, la elución de ácido nucleico y la iniciación de los

procesos requeridos para la funcionalidad del dispositivo. Por ejemplo, la carcasa puede incorporar un puerto de entrada de muestra, un botón o rasgo mecánico similar para permitir la activación del usuario, la liberación de tampón, la iniciación del flujo de muestra y/o la elución de ácido nucleico.

5 En algunas realizaciones de la invención, la capa fluidica o microfluidica comprende preferiblemente cuatro cámaras, incluyendo una cámara de entrada de muestra, una cámara de amplificación, una cámara de marcaje de ácido nucleico y una cámara de detección. La cámara de entrada de solución comprende preferiblemente un orificio de entrada de muestra en que puede añadirse una muestra que contiene ácido nucleico, y un conducto de salida que conduce a la cámara de amplificación. La cámara de entrada de muestra puede comprender también reactivos liofilizados que pueden incluir tampones adecuados, sal, desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, cebadores oligonucleotídicos y enzimas tales como ADN polimerasa y transcriptasa inversa. Dichos reactivos liofilizados se solubilizan preferiblemente tras la adición de la muestra de ácido nucleico. La cámara de amplificación se sitúa preferiblemente alineada y en contacto térmico con los elementos calentadores sobre la placa de circuito. De forma similar, los componentes electrónicos presentes sobre la placa de circuito están colocados en contacto físico o proximidad de los ventiladeros o estructuras de válvula de la capa fluidica para posibilitar el control electrónico. La disposición física de la placa de circuito se diseña para proporcionar el alineamiento con los elementos de la capa fluidica o microfluidica de tal modo que los elementos de calentamiento resistivo de la placa de circuito para amplificación y/o control del flujo de fluido estén situados para formar contactos con los elementos del componente fluidico con los que interaccionan.

10 Otras realizaciones de la invención comprenden un dispositivo de amplificación y detección de ácido nucleico que está integrado con un dispositivo de preparación de muestra. Las realizaciones que incluyen el dispositivo de preparación de muestra proporcionan un medio para la comunicación de fluidos entre los puertos o válvulas de salida del subsistema de preparación de muestra y el puerto o puertos de entrada de los componentes fluidicos o microfluidicos del dispositivo.

15 A menos que se definan de otro modo, todos los términos de la técnica, notaciones y otra terminología científica usada en la presente memoria pretenden tener los significados entendidos comúnmente por los especialistas en la materia a la que pertenece esta invención. Las técnicas y procedimientos descritos o referidos en la presente memoria son generalmente bien entendidos y comúnmente empleados usando metodologías convencionales por los especialistas en la materia tales como, por ejemplo, las metodologías de clonación molecular ampliamente utilizadas descritas en Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" 3ª edición (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. y "Current Protocols in Molecular Biology" (Ausbel *et al.*, eds., John Wiley & Sons, Inc. 2001. Según sea apropiado, los procedimientos que implican el uso de kits y reactivos comercialmente disponibles se llevan a cabo generalmente de acuerdo con los protocolos y/o parámetros definidos por el fabricante, a menos que se observe otra cosa.

20 Como se usan a lo largo de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, los términos "ácido nucleico diana" o "ácido nucleico molde" significan un fragmento o secuencia de ADN o ARN monocatenario o bicatenario que se pretende detectar.

25 Como se usan a lo largo de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, los términos "micropartícula" o "partícula de detección" significan cualquier compuesto usado para marcar un producto de ácido nucleico generado durante una reacción de amplificación, incluyendo tintes fluorescentes específicos de ácido nucleico dúplex, oligonucleótidos modificados fluorescentemente y puntos cuánticos conjugados con oligonucleótido o elementos en fase sólida tales como poliestireno, látex o partículas paramagnéticas o microesferas.

30 Como se usa a lo largo de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, el término "cámara" significa un compartimento fluidico donde reside el fluido durante cierto periodo de tiempo antes de dirigirse a otra cámara. Por ejemplo, una cámara puede ser la cámara de muestras, cámara de amplificación, cámara de marcaje o cámara de detección.

35 Como se usa a lo largo de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, el término "recinto" significa un compartimento encima de un resistor u otro mecanismo que sirve como mecanismo de ventilación. Por ejemplo, al contrario que las cámaras fluidicas como se describen anteriormente, un recinto creado en la capa fluidica puede tener una cara abierta que se alinea con un resistor en el PCA. Esta cara abierta está preferiblemente cubierta con una membrana fina, creando una cavidad sellada que se rompe fácilmente al activar al resistor debajo.

40 Como se usa a lo largo de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, el término "canal" significa un conducto estrecho dentro del ensamblaje fluidico que conecta típicamente dos o más cámaras y/o recintos o combinaciones de los mismos incluyendo, por ejemplo, un canal de entrada, salida o ventilación. En el caso de un canal de entrada o salida, la muestra de fluido migra a través del canal. En el caso de un canal de ventilación, el conducto permanece libre de fluido y conecta una cámara fluidica con un recinto de ventilación.

45 Como se usa a lo largo de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, el término "instrumento externo" significa un instrumento reutilizable que calienta y/o enfría un ensayo desechable y/o efectúa una acción mecánica sobre un ensayo desechable incluyendo, pero sin limitación, perforar paquetes de tampón y/o bombear o proporcionar

activamente de otro modo una fuerza de transporte para fluidos.

Son realizaciones de la presente invención dispositivos para una prueba de ácido nucleico de bajo coste en el punto de uso adecuada para efectuar análisis en localizaciones remotas de un entorno de laboratorio en que la prueba se efectuaría ordinariamente. Ciertos dispositivos comprenden componentes o capas fluidicas y electrónicas, opcionalmente encerradas en una carcasa protectora. En realizaciones de la presente invención, la capa fluidica está compuesta por plástico y es una serie de cámaras y recintos conectados por canales estrechos en que las cámaras se orientan verticalmente entre sí durante la operación. La capa fluidica está encima o colocada de otro modo en contacto físico con los componentes electrónicos tales como una placa de circuito impreso que contiene dispositivos de montaje superficial (SMD) a la venta y controlados a través de un microcontrolador. En algunas realizaciones del dispositivo, todo el ensamblaje es desechable. En otras realizaciones, las capas fluidica y electrónica unidas físicamente son desechables, mientras que la unidad de control pequeña y barata es reutilizable. En otra realización, la capa fluidica es desechable y la unidad básica de control pequeña es reutilizable. Para todas las realizaciones, la presente invención puede estar integrada con un dispositivo de preparación de muestra de ácido nucleico tal como se describe en la publicación internacional nº WO 2009/137059 A1, titulada "Highly Simplified Lateral Flow-Based Nucleic Acid Sample Preparation and Passive Fluid Flow Control" (incorporada a la presente memoria como referencia) y/o en procedimientos de uso descritos en la misma.

Las realizaciones de la presente invención comprenden un dispositivo de prueba de ácido nucleico integrado que puede fabricarse económicamente con procesos de fabricación establecidos. La invención proporciona datos de pruebas moleculares reteniendo la simplicidad desde la perspectiva del usuario final de inmunoensayos de mano ampliamente aceptados, superando los retos de regulación de las temperaturas de fluido dentro del dispositivo, transporte de pequeños volúmenes de muestra en etapas secuenciales, mezclado de reactivos y detección de ácidos nucleicos. Las realizaciones de la presente invención están excepcionalmente adaptadas para utilizar elementos a la venta que pueden construirse mediante técnicas de ensamblaje estándares y no requieren piezas móviles. Además, el diseño de la capa fluidica posibilita el uso de plásticos y técnicas de fabricación fácilmente disponibles. El resultado es un dispositivo económico, desechable y fiable capaz de aislamiento, amplificación y detección de ácido nucleico sin necesidad de una infraestructura de laboratorio dedicada.

Los dispositivos de prueba de ácido nucleico existentes generalmente usan elementos de calentamiento sofisticados tales como calentadores de película depositada y dispositivos de Peltier que suman un coste significativo y/o requieren procedimientos de fabricación especializados. En las realizaciones de la invención, el calentamiento de la solución de reacción se logra preferiblemente mediante el uso de dispositivos de montaje superficial resistivos sencillos que pueden adquirirse por céntimos o menos y que se ensamblan y ensayan mediante estándares de fabricación comunes. Al poner cámaras fluidicas sobre estos elementos resistivos y elementos sensores asociados, puede regularse convenientemente la temperatura de fluido de las soluciones de reacción. El amplio uso de resistores de SMD en la industria electrónica asegura que la presente invención es susceptible de procedimientos de control de calidad bien establecidos. Muchas técnicas de amplificación de ácido nucleico, tales como PCR, requieren no solo un calentamiento rápido de la solución de reacción, sino también un enfriamiento rápido. Las cámaras de reacción en la presente invención se calientan preferiblemente por un lado y se usa la temperatura ambiente a través de la cara opuesta para ayudar a reducir la temperatura del fluido. Además, la orientación vertical de las realizaciones del dispositivo permite un enfriamiento más rápido por convección pasiva que si el dispositivo se orientara horizontalmente, reduciendo por tanto el periodo de ciclo térmico sin el uso de costosos ventiladores o dispositivos de Peltier.

El control de fluido es otro reto asociado a los diseños de dispositivo de prueba de ácido nucleico de bajo coste. Los dispositivos conocidos en la materia emplean generalmente mecanismos de bombeo electromecánico, electrocinético o piezoeléctrico para manipular los fluidos durante la operación del dispositivo. Estos elementos de bombeo aumentan tanto la complejidad como el coste del dispositivo. De forma similar, las válvulas que hacen uso de diseños micromecánicos elaborados o piezas móviles pueden aumentar los costes de fabricación y reducir la fiabilidad debido a complicaciones tales como un fallo de la pieza móvil o bioensuciamiento. Al contrario que los dispositivos de prueba de ácido nucleico anteriormente descritos, las realizaciones de la presente invención utilizan la presión hidrostática bajo el control del microcontrolador junto con las fuerzas capilares y la tensión superficial para manipular los volúmenes de fluido. La orientación vertical de algunas realizaciones de la presente invención permite que la solución de reacción caiga en cascada de cámara a cámara bajo el control del microcontrolador para admitir las manipulaciones requeridas del ensayo. El fluido puede mantenerse en las cámaras de reacción individuales mediante un equilibrio de tamaño de canal y tensión superficial, en que la tensión superficial evita el avance de fluido por desplazamiento de gas. La muestra avanza a la cámara inferior preferiblemente solo después de la activación de un mecanismo de ventilación sencillo bajo control del microcontrolador. Una vez abierta, el ventiladero permite que el fluido se mueva de una primera cámara a una segunda cámara al proporcionar una ruta para que el aire desplazado escape de la segunda cámara a medida que entra fluido. Cada cámara dentro de la capa fluidica se conecta preferiblemente con un recinto de ventilación sellado a través de un canal de ventilación estrecho. El recinto de ventilación está preferiblemente sellado por una cara con una membrana de plástico fino que se rompe fácilmente al calentar un resistor de montaje superficial pequeño debajo de la membrana. Una vez se abre el ventiladero de una cámara inferior, prosigue el avance de fluido, incluso a bajas presiones hidrostáticas.

Como se describe más específicamente a continuación, el mecanismo de válvula fluidica o microfluidica usado en

5 algunas realizaciones de la presente invención emplea preferiblemente un elemento de calentamiento en contacto
término y (opcionalmente) físico con un sello termolábil para posibilitar el control electrónico del movimiento de fluido
mediante la ventilación de una cámara de menor elevación, para permitir que un fluido de una cámara de mayor
elevación fluya a la cámara inferior. En una realización, se monta un resistor de montaje superficial sobre una placa
de circuito integrado, usando procedimientos de fabricación de electrónica ampliamente usados y bien establecidos,
y se coloca en contacto físico con un sello de canal compuesto por material termolábil. Cuando se activa, el resistor
de montaje superficial genera suficiente calor para romper el sello, lo que da como resultado la ventilación de la
cámara a menor presión, tal como a presión ambiental, permitiendo así el movimiento de fluido de una cámara de
mayor elevación a una cámara de menor elevación. Preferiblemente, no se emplea un sello directo entre las
10 cámaras de mayor y menor elevación. El canal y el sello pueden localizarse remotamente de las cámaras de fluido,
facilitando así la disposición del dispositivo fluido en configuraciones eficaces para fabricación. El material de sello
puede comprender cualquier material que pueda sellar el canal de ventilación y romperse por calentamiento como se
describe, por ejemplo una lámina de plástico fino. Este enfoque al control del movimiento de fluido en el aparato se
beneficia de los bajos costes del material, idoneidad para fabricación al usar técnicas de laminación y fabricación de
15 electrónica establecidas, mientras que proporciona la capacidad de mover fluidos a través de una serie de cámaras
bajo el control de circuitos de control electrónicos tales como microprocesadores o microcontroladores. El uso de
ventiladeros, un material termolábil para sellar los ventiladeros (y no sellar las cámaras de fluido o microcanales de
fluido mismos) y un medio electrónico de romper dicho sello con calor proporciona un medio de control del flujo de
fluido a través del dispositivo para posibilitar el movimiento de fluido en momentos predeterminados o después de la
20 terminación de eventos específicos (por ejemplo, alcanzar una temperatura, un cambio de temperatura o una serie
de cambios de temperatura, o la terminación de un tiempo o tiempos de incubación u otros eventos).

Además, el enfoque de ventiladero tiene una serie de ventajas frente al sellado de las cámaras de fluido mismas.
Los recintos de ventilación pueden localizarse en cualquier lugar sobre la disposición fluidica y simplemente se
comunican con la cámara que regulan a través de un canal de ventilación. Desde el punto de vista de la fabricación,
25 los recintos de ventilación pueden localizarse de modo que se fije una única membrana de sellado en la capa fluidica
para todos los recintos de ventilación (que puede comprender un colector de recintos de ventilación),
preferiblemente mediante procedimientos bien establecidos tales como adhesivos, laminación térmica, soldado por
ultrasonidos, soldado por láser, etc. En contraposición, el sellado directo de una cámara de fluido requiere que el
material de sello se coloque en diferentes localizaciones correspondientes a cada localización de cámara, lo que es
30 más difícil de fabricar. Esto presenta una situación más exigente durante la fabricación en comparación con un solo
colector de recintos de ventilación sellado con una sola membrana. Además, el material de sellado localizado en la
cámara entrará probablemente en contacto con la solución mantenida en la cámara. Esto requiere el uso de un
material que (i) no interfiera con las reacciones realizadas en la cámara y (ii) no se afecte por la solución. Dada la
sensibilidad de las reacciones bioquímicas a los inhibidores químicos y las temperaturas elevadas usadas tanto para
35 amplificación como marcaje antes de la detección, la lista de materiales aceptables se vuelve limitada. Además, la
proximidad física de material termosensible asociado directamente a cámaras de reacción usadas para realizar
reacciones a temperaturas elevadas presenta el reto significativo de asegurar el aislamiento térmico del material
sellante de válvula de las temperaturas elevadas empleadas durante las reacciones, además de prevenir que la
solución se caliente cuando se funde el material sellante. Para evitar el fallo de válvula, el material termosensible
40 debe estar localizado remotamente respecto a la fuente de calor o el material termosensible debe activarse a
temperaturas muy por encima de la temperatura máxima empleada en las reacciones. Localizar remotamente los
sellos directamente asociados a las cámaras en un dispositivo miniaturizado impone limitaciones a las disposiciones
fluidicas que impiden el uso de diseños físicos compactos. Y el uso de temperaturas mayores para accionar válvulas
localizadas en el sitio de la cámara de reacción puede ser nocivo para los componentes bioquímicos, que pierden
45 estabilidad ligeramente por encima de las temperaturas de reacción empleadas. Finalmente, si las cámaras de
sellan directamente, el material sellante fundido puede permanecer en los canales entre cámaras, bloqueando el
flujo. La viscosidad del material sellante puede requerir más presión en la columna de fluido que la obtenida en un
aparato impulsado por la gravedad miniaturizado.

En realizaciones de la presente invención, el mezclado de reactivos no requiere más complejidad que otros
50 sistemas. Los reactivos necesarios para la amplificación de ácido nucleico, tales como tampones, sales,
desoxirribonucleótidos, cebadores oligonucleotídicos y enzimas, preferiblemente se incorporan establemente
mediante el uso de aglomerados o tortas liofilizados. Estos reactivos liofilizados, sellados en una cámara fluidica,
pueden solubilizarse fácilmente tras contacto con solución acuosa. En el caso de requerir mezclado adicional, la
orientación vertical de las realizaciones de la presente invención ofrece oportunidades para procedimientos
55 novedosos de mezclado de soluciones. Al utilizar calentadores bajo las cámaras fluidicas, puede calentarse el gas,
suministrando burbujas a la solución de reacción en la cámara superior cuando la solución contiene componentes
termosensibles. Como alternativa, los calentadores pueden usarse para calentar directamente una solución al punto
en que ocurre la ebullición, en el caso de que la solución no contenga componentes termosensibles. La aparición de
burbujas de aire es a menudo indeseable en los dispositivos fluidicos y microfluidicos anteriormente dados a
60 conocer, ya que pueden acumularse en las cámaras y canales fluidicos y desplazar las soluciones de reacción o
impedir el movimiento de fluido dentro del dispositivo. El diseño vertical de las realizaciones de la invención
presentado en la presente memoria permite también que las burbujas suban hasta la superficie del fluido, dando
como resultado un desplazamiento de fluido solo mínimo y transitorio, y mejorando eficazmente cualquier impacto
desventajoso de las burbujas sobre el sistema fluidico o microfluidico. El mezclado por ebullición es también

conveniente con este diseño vertical, ya que el fluido desplazado durante el proceso simplemente vuelve a la cámara fluidica original por gravedad después de desconectar los elementos calentadores.

En realizaciones de la invención, se usa una tira de detección colorimétrica para detectar los ácidos nucleicos amplificados. Se usan comúnmente ensayos de flujo lateral en pruebas de inmunoensayo debido a su facilidad de uso, fiabilidad y bajo coste. La técnica anterior contiene descripciones del uso de tiras de flujo lateral para la detección de ácidos nucleicos usando materiales porosos como zona receptora de muestra que está en o cerca de la zona de marcaje, que también comprende un material poroso y está dispuesta en o cerca de un extremo del dispositivo de ensayo de flujo lateral. En estas invenciones anteriores, los restos de marcaje están en la zona de marcaje. El uso de materiales porosos que comprenden la zona receptora de muestra y la zona de marcaje da como resultado la retención de algo de solución de muestra así como de partículas de detección en los materiales porosos. Aunque pueden usarse en realizaciones de la presente invención zonas de marcaje que comprenden materiales porosos que tienen restos inmovilizados reversiblemente requeridos para la detección, las realizaciones de la presente invención utilizan preferiblemente partículas o restos de detección mantenidos en una región del dispositivo distinta de la zona receptora de muestra de la tira de flujo lateral y que comprende materiales no porosos con bajas características de retención de fluido. Este enfoque permite marcar muestras que contienen ácido nucleico diana antes de la introducción en los componentes porosos del extremo receptor de muestra del componente de flujo lateral del dispositivo, y elimina así la retención y/o pérdida de material de muestra y partículas de detección en una zona de marcaje porosa. Este procedimiento posibilita además el uso de diversos tratamientos de la muestra en presencia de restos de detección, tales como tratamiento a altas temperaturas para lograr la desnaturalización de dianas bicatenarias o de estructuras secundarias dentro de una diana monocatenaria sin preocupación por el impacto de la temperatura sobre los materiales porosos de la zona receptora de muestra o de marcaje o los materiales de la tira de detección de flujo lateral. Adicionalmente, el uso de una zona de marcaje no en contacto de flujo lateral con la zona receptora de muestra, sino sometida al control de los componentes fluidicos tales como ventiladeros o válvulas, permite que diana y marcaje permanezcan en contacto durante periodos de tiempo controlados por los sistemas de control de flujo de fluido. Por tanto, las realizaciones de la presente invención pueden ser diferentes a las tiras de prueba de flujo lateral tradicionales en las que los tiempos y condiciones de interacción de muestra y partícula de detección se determinan por las propiedades de transporte capilar de los materiales. Mediante la incorporación de las partículas de detección a una cámara de temperatura regulada, es posible la desnaturalización de ácido nucleico dúplex, permitiendo una detección eficaz basada en la hibridación. En realizaciones alternativas, se usa la fluorescencia para detectar la amplificación de ácido nucleico usando una combinación de LED, fotodiodos y filtros ópticos. Estos sistemas de detección óptica pueden usarse para efectuar una detección y cuantificación de ácido nucleico instantáneas durante la amplificación y una detección de punto final después de la amplificación.

Las realizaciones de la invención comprenden proporcionar un sistema en el punto de uso de bajo coste en el que una muestra de ácido nucleico puede amplificarse y detectarse selectivamente. Realizaciones adicionales incluyen la integración con un dispositivo de preparación de muestra de ácido nucleico tal como el descrito en la publicación internacional nº WO 2009/137059 A1, titulada "Highly Simplified Lateral Flow-Based Nucleic Acid Sample Preparation and Passive Fluid Flow Control". Una realización del dispositivo comprende preferiblemente tanto un componente fluidico plástico como un ensamblaje de circuito impreso (PCA), y se encierran opcionalmente en una carcasa que protege a los componentes activos. La regulación de temperatura, mezclado de fluido y reactivos se coordinan preferiblemente mediante un microcontrolador. El módulo de reacción se orienta y hace funcionar preferiblemente verticalmente de modo que la presión hidrostática, fuerzas capilares y tensión superficial, junto con las ventiladeros accionados por microcontrolador, controlen el movimiento de fluido dentro del dispositivo.

Con respecto al esquema representativo de la FIG. 1, se añade una muestra de ácido nucleico a la cámara de muestras 10. La muestra de ácido nucleico puede derivar de un proceso de preparación de ácido nucleico en línea (concretamente, subsistema de preparación de ácido nucleico integrado), separado (tal como uno de muchos procedimientos comercialmente disponibles, p.ej. columnas de centrifugación) seguido de la adición del ácido nucleico purificado al dispositivo por pipeta, o de una muestra que contiene ácido nucleico no procesado. Está preferiblemente ya presente en la cámara de muestras, o como alternativa se añade después, una mezcla reactiva que puede estar en forma líquida o seca, que contiene todos los componentes necesarios para la reacción de amplificación, tales como agentes de tamponación, sales, dNTP, rNTP, cebadores oligonucleotídicos y/o enzimas. En algunas realizaciones, la mezcla reactiva se liofiliza formando reactivos liofilizados 20. La introducción de la muestra en la cámara de muestras causa que los reactivos y muestras se combinen de tal modo que los reactivos actúen sobre la muestra. Puede efectuarse opcionalmente una etapa de mezclado por burbujas opcional para mezclar adicionalmente la muestra con los reactivos o resuspender los reactivos. Se dirige entonces preferiblemente el fluido a través del canal de entrada 40 a una o más cámaras de amplificación 30 que residen debajo de la cámara de muestras cuando el dispositivo está en orientación vertical. El canal de salida 45 conecta la cámara de amplificación 30 con la cámara posterior. Para facilitar pruebas múltiples, en las que se generan múltiples amplicones, puede lograrse la amplificación múltiple mediante la deposición de múltiples conjuntos de cebadores dentro de las cámaras de amplificación. Adicionalmente, placas de circuitos y diseños fluidicos en que se incorporan múltiples cámaras de amplificación y detección al dispositivo respaldan múltiples reacciones de amplificación paralelas que pueden ser reacciones individuales o múltiples. Este enfoque reduce o elimina las complicaciones conocidas por los especialistas en la materia que son el resultado de la amplificación múltiple usando múltiples pares

de cebadores en la misma reacción. Además, el uso de múltiples cámaras de reacción de amplificación permite la amplificación simultánea en diferentes regímenes de temperatura para admitir los requisitos para una amplificación óptima, tales como las diferentes temperaturas de fusión o reasociación requeridas para diferentes secuencias de diana y/o cebador.

5 El movimiento de fluido desde una primera cámara a una segunda cámara del dispositivo se logra preferiblemente mediante la apertura de un ventiladero conectado con la segunda cámara como se muestra en las FIG. 1-2. Una
 10 realización del ventiladero comprende dos componentes, el recinto de ventilación **50**, una cara del cual comprende una membrana tal como poliolefina y está en contacto con un resistor montado en el ensamblaje de placa de circuito impreso (PCA) **75**, y el canal de ventilación **60**, que conecta el recinto de ventilación **50** con el compartimento
 15 microfluídico bajo su control. Cuando se añade en primer lugar fluido al sistema en la cámara de muestras, se sella el ventiladero conectado con la cámara siguiente, y el fluido no pasará a través del canal que conecta las dos cámaras. Un microcontrolador es responsable de enviar una corriente eléctrica a un elemento calentador, tal como el resistor **70**, localizado en o cerca de la membrana que comprende una cara del recinto de ventilación **50**. El calor
 20 producido por el resistor activado rompe la membrana fina **80**, abriendo por tanto el ventiladero. Una vez abierto, el ventiladero permite que el fluido caiga desde la primera cámara a la segunda cámara mediante la provisión de una ruta para que el aire desplazado escape de la segunda cámara a medida que entra fluido. Otras realizaciones del recinto de ventilación pueden comprender sellos distintos de una membrana termosensible, y pueden utilizar otros procedimientos de ruptura de los sellos, tales como punción, desgarro o disolución.

La cámara de amplificación está preferiblemente en contacto con elementos calentadores para proporcionar un
 20 medio para la regulación de temperatura necesario para respaldar la amplificación de ácido nucleico. En algunas realizaciones de la invención, la cámara de amplificación puede contener oligonucleótidos sobre al menos una porción de la superficie interior. Como se muestra en las FIG. 1-3, una realización del dispositivo comprende el canal de entrada **30** que conduce desde la cámara de muestras **10** a la cámara de amplificación **30**, el canal de salida **45** que conduce preferiblemente desde la cámara de amplificación **30** a la cámara de marcaje **90** y el canal de ventilación **60** que conduce al recinto de ventilación **50** como se describe anteriormente. En la interfaz entre la pared
 25 de la cámara de amplificación **95** y el elemento o elementos calentadores **100**, puede ser ventajoso colocar un material termoconductor tal como una grasa o compuesto térmico. Un microcontrolador modula preferiblemente la corriente al elemento o elementos de calentamiento resistivo, preferiblemente mediante transistores de efecto de campo semiconductor de óxido metálico (MOSFET), basándose en los datos recogidos por el sensor de temperatura **110**, preferiblemente usando procedimientos de control de la temperatura de encendido/apagado o derivados integrales proporcionales (PID) u otros procedimientos de control algorítmico de la temperatura conocidos por los especialistas en la materia.

Los sistemas existentes emplean dispositivos de calentamiento y enfriamiento activos localizados en un instrumento reutilizable para lograr el control de la temperatura para la amplificación de ácido nucleico que tiene lugar en un
 35 cartucho desechable, lo que requiere necesariamente un instrumento de suficiente precisión que sea capaz de formar fiablemente un contacto térmico reproducible con un cartucho desechable extraíble. Esto da como resultado un coste y complejidad instrumentales aumentados, así como una fiabilidad reducida de la interfaz térmica entre el subsistema de control de la temperatura del instrumento y el subsistema fluídico del cartucho desechable. Al contrario que estos sistemas, las realizaciones de la presente invención comprenden preferiblemente elementos de calentamiento resistivo para el control de la temperatura colocados sobre la porción desechable del aparato, tales como los ilustrados en la FIG. 11 y como se describen anteriormente. Colocar los elementos de calentamiento y los correspondientes sensores de temperatura sobre el componente desechable posibilita la fabricación de un acoplamiento térmico altamente reproducible entre el subsistema de control de la temperatura y las cámaras de amplificación y detección con las que interaccionan. Este enfoque posibilita un medio altamente fiable de acoplamiento del subsistema fluídico con el subsistema de control térmico electrónico al formar la interfaz termoconductor durante la fabricación. El contacto térmico superior resultante entre los elementos de control electrónico de la temperatura y el subsistema fluídico da como resultado un rápido equilibrado de la temperatura, y por lo tanto ensayos rápidos.

Las realizaciones de la cámara de amplificación comprenden preferiblemente materiales capaces de soportar un calentamiento y enfriamiento repetidos a temperaturas en el intervalo de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 110 °C. Aún más preferiblemente, la cámara de amplificación comprende materiales capaces de soportar un calentamiento y enfriamiento repetidos a temperaturas en el intervalo de aproximadamente 30 a aproximadamente 110 °C a una velocidad de cambio de temperatura del orden de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 °C por segundo. La cámara de amplificación es preferiblemente capaz de mantener las soluciones en la misma a temperaturas adecuadas para protocolos de ciclación térmica (FIG. 4A-D) o amplificación isotérmica (FIG. 4E), dependiendo de la programación del microcontrolador. En algunas aplicaciones de amplificación de ácido nucleico, es deseable proporcionar una incubación inicial a temperatura elevada, por ejemplo una temperatura entre aproximadamente 37 y aproximadamente 110 °C, durante un periodo de 1 segundo a 5 minutos, para desnaturalizar el ácido nucleico diana. Posteriormente, se varía la temperatura de la solución de reacción entre al menos dos temperaturas que incluyen, pero sin limitación, una temperatura que da como resultado la desnaturalización de ácido nucleico dúplex y una temperatura adecuada para la reasociación de cebador mediante hibridación con la diana y la extensión del cebador mediante polimerización de ácido nucleico catalizada

por polimerasa. La duración de las incubaciones a cada temperatura necesaria en un régimen de termociclación puede variar con la composición de secuencia del ácido nucleico diana y la composición de la mezcla de reacción, pero está preferiblemente entre aproximadamente 0,1 segundos y aproximadamente 20 segundos. Se efectúa típicamente el calentamiento y enfriamiento repetidos durante aproximadamente 20 ciclos a aproximadamente 50 ciclos. En realizaciones que implican procedimientos de amplificación isotérmica, se mantiene la temperatura de la solución de reacción a temperatura constante (en algunos casos después de una incubación inicial a temperatura elevada) durante entre aproximadamente 3 minutos y aproximadamente 90 minutos, dependiendo de la técnica de amplificación usada. Una vez se completa la reacción de amplificación, se transporta la solución de reacción de amplificación, abriendo el ventiladero que está en comunicación con la cámara de marcaje, a la cámara de marcaje que se localiza debajo de la cámara de amplificación.

En algunas realizaciones, pueden realizarse reacciones bioquímicas adicionales en la cámara de amplificación antes, durante o después de la reacción de amplificación. Dichos procesos pueden incluir, pero sin limitación, transcripción inversa en la que se transcribe ARN a ADNc, multiplexación en la que múltiples pares cebadores amplifican simultáneamente múltiples ácidos nucleicos diana, y amplificación instantánea, en la que se detectan productos de amplificación durante el proceso de reacción de amplificación. En el último caso, la cámara de amplificación puede no contener una válvula o canal de salida, y la cámara de amplificación comprendería preferiblemente una ventana óptica o configurada de otro modo para posibilitar el examen de la concentración de amplicón durante el proceso de reacción de amplificación. En una realización de amplificación instantánea, se monitoriza, en oligonucleótidos marcados fluorescentemente complementarios del ácido nucleico diana o en tintes fluorescentes específicos de ADN dúplex, la intensidad de fluorescencia mediante una fuente de luz de excitación tal como LED o láser o láseres de diodo y un detector tal como un fotodiodo y componentes ópticos apropiados incluyendo, pero sin limitación, filtros ópticos.

En realizaciones alternativas de la invención, se facilita el movimiento de fluido usando calentamiento resistivo para expandir gases dentro de las cámaras de dispositivo (FIG. 5). Por ejemplo, al calentar la cámara de amplificación **30**, se expandirá el gas dentro de la cámara y escapará a través del canal ventilado, en este caso el canal de entrada **40**, en forma de burbujas **120**. En algunas realizaciones de la invención, dicho calentamiento de la cámara más abajo puede usarse para generar burbujas suficientes para mezclar los reactivos presentes en el volumen de fluido de una cámara más arriba, tal como la cámara de muestras **10**. Una vez se desconecta el elemento de calentamiento, el gas dentro de la cámara de amplificación **30** se enfriará y contraerá, extrayendo el fluido **125** de la cámara de muestras **10** superior a la cámara de amplificación **30**. Al repetir el proceso varias veces, todo el volumen de fluido puede dirigirse desde una cámara a otra. En realizaciones alternativas de la invención, puede usarse dicho mecanismo junto con un mecanismo de ventilación con resistor para desplazar volúmenes de fluido.

Las realizaciones de la cámara de marcaje proporcionan preferiblemente el marcaje específico de ácidos nucleicos diana amplificados generados en la cámara de amplificación, que funciona junto con la cámara de detección proporcionando los resultados analíticos de la prueba. Como se muestra en la FIG. 6A, la cámara de marcaje **90** puede contener partículas de detección **130** que están secadas, liofilizadas o presentes en al menos una porción de la superficie interior en forma de una mezcla secada de partículas de detección en un portador tal como un polisacárido, detergente, proteína u otro compuesto conocido por los especialistas en la materia por facilitar la resuspensión de las partículas de detección. La cámara de marcaje está preferiblemente conectada con el canal de entrada **135** que conduce desde la cámara de amplificación **30**, el canal de salida **140** que conduce a la cámara de detección y el canal de ventilación **150** que conduce a un recinto de ventilación como se describe anteriormente. El canal de entrada **135** es típicamente el mismo canal que el canal de salida **45** de la cámara de amplificación **30**. En la interfaz con el PCA, se coloca preferiblemente una capa fina de material termoconductor tal como grasa térmica entre una cara de la cámara de marcaje y un elemento de calentamiento resistivo.

Las partículas de detección adecuadas incluyen, pero sin limitación, tintes fluorescentes específicos de ácido nucleico dúplex, oligonucleótidos modificados fluorescentemente o micropartículas tintadas conjugadas con oligonucleótido u oro coloidal. La detección de amplicón implica un "oligonucleótido de detección" u otra "sonda de detección" que es complementario o capaz de otro modo de unirse específicamente al amplicón para detectar. La conjugación de un oligonucleótido de detección con una micropartícula puede ocurrir mediante el uso de partículas recubiertas con estreptavidina y oligonucleótidos biotinilados, o mediante la química de carbodiimida mediante la que se activan partículas carboxiladas en presencia de carbodiimida y se hacen reaccionar específicamente con aminos primarios presentes en el oligonucleótido de detección. La conjugación del oligonucleótido de detección con el resto detectable puede ocurrir internamente o en el extremo 5' o 3'. Los oligonucleótidos de detección pueden enlazarse directamente a la micropartícula o, más preferiblemente, a través de un resto espaciador tal como etilenglicol o polinucleótidos.

En el caso de un producto de amplificación de ADN dúplex, calentar la solución de reacción después de la introducción en la cámara de detección facilita la detección. Fundir el ADN dúplex y enfriar entonces en presencia del oligonucleótido de detección da como resultado un marcaje específico de secuencia del ácido nucleico diana amplificado. El elemento resistivo debajo de la cámara de detección puede usarse para calentar el volumen de fluido durante aproximadamente 1 a aproximadamente 120 segundos para iniciar la fusión del ADN dúplex. A medida que la solución se deja enfriar a temperatura ambiente, el ácido nucleico diana amplificado puede hibridar específicamente con micropartículas de detección. El volumen de reacción se dirige preferiblemente entonces a una

región de la cámara de detección debajo de la cámara de marcaje abriendo el ventiladero de la cámara de detección.

Para que ocurra un marcaje eficaz, se mezclan preferiblemente bien las partículas de detección solubilizadas con la solución de reacción. En realizaciones de la invención, puede emplearse un segundo procedimiento de mezclado que implica calentadores resistivos durante el marcaje para tanto desnaturalizar ácido nucleico diana bicatenario como mezclar suficientemente las micropartículas de detección en la solución de reacción. El calentamiento de la solución en la cámara de marcaje por encima del punto de ebullición puede usarse para inducir turbulencia y mezclado en solución. Las burbujas nacientes nucleadas en el fondo y los lados de la cámara por un rasgo texturado tal como una línea grabada con láser **132**, mostrada en la FIG. 6B (o una serie de dichas líneas), preferiblemente agitan eficazmente la solución. Este efecto se ha demostrado que funciona a muchas altitudes, independientemente de las correspondientes variaciones de la temperatura de ebullición. Cualquier solución desplazada a las cámaras superiores por la ebullición preferiblemente fluye de vuelta abajo a la cámara de marcaje durante el posterior enfriamiento. En algunas realizaciones de la invención, las regiones de la cara interna o las paredes de la cámara de marcaje pueden texturizarse o tratarse de otro modo para localizar la ebullición de nucleación en una pared o cara de la cámara específica. En otras realizaciones, pueden colocarse una o más perlas de ebullición en la cámara de marcaje para localizar la ebullición de nucleación en un punto o puntos específicos.

Las realizaciones de la cámara de detección de la presente invención proporcionan la detección específica de ácidos nucleicos diana amplificados que se han marcado en la cámara de marcaje. En ciertas realizaciones de la invención, se logra la detección mediante imbibición capilar de la solución que contiene amplicón marcado mediante una tira absorbente que comprende un material poroso (tal como celulosa, nitrocelulosa, polietersulfona, poli(fluoruro de vinilideno), nailon, nailon modificado con carga o politetrafluoroetileno) estampado con líneas, puntos u otros elementos visualmente discernibles que comprenden un resto de unión capaz de unirse específicamente al amplicón marcado directa o indirectamente. En algunas realizaciones, el componente de tira absorbente del dispositivo comprende hasta tres sustratos porosos en contacto físico: una almohadilla de tensioactivo que comprende reactivos anfipáticos para potenciar la imbibición, una zona de detección que comprende un material poroso (tal como celulosa, nitrocelulosa, polietersulfona, poli(fluoruro de vinilideno), nailon, nailon modificado con carga o politetrafluoroetileno) en el que se inmoviliza al menos un resto de unión capaz de unión selectiva con el amplicón marcado y/o una almohadilla absorbente para proporcionar una capacidad absorbente adicional. Al contrario que los dispositivos de detección de flujo lateral anteriormente descritos, las partículas de detección preferiblemente no se incorporan a los materiales porosos de flujo lateral en la cámara de detección, sino que en lugar de ello se mantienen más arriba en la cámara de marcaje, en que pueden realizarse manipulaciones para potenciar sustancialmente la formación de complejos de unión entre el amplicón y las partículas de detección, tales como calentamiento/ebullición, antes de la introducción de los ácidos nucleicos marcados resultantes en los componentes porosos del dispositivo.

Se inmoviliza preferiblemente un "oligonucleótido de captura" o "sonda de captura" en el elemento de tira de detección del dispositivo mediante cualquiera de una variedad de medios conocidos por los especialistas en la materia, tales como irradiación UV. Se diseña la sonda de captura para capturar el ácido nucleico marcado a medida que la solución que contiene el ácido nucleico marcado se embebe a través de la zona de captura, dando como resultado una concentración aumentada del marcaje en el sitio de inmovilización de la sonda de captura, produciendo por tanto una señal detectable indicativa de la presencia del amplicón o amplicones de ácido nucleico diana marcado. Puede estamparse una sola tira de detección con una o múltiples sondas de captura para posibilitar la detección múltiple de múltiples amplicones, la determinación de la secuencia del amplicón y el control de calidad del ensayo (controles positivos y negativos).

Capa de subensamblaje fluídico

Los componentes de realizaciones del subensamblaje fluídico comprenden preferiblemente plástico tal como acrílico, policarbonato, PETG, poliestireno, poliéster, polipropileno y/u otros materiales similares. Estos materiales están fácilmente disponibles y pueden fabricarse mediante procedimientos estándares. Como se ilustra en las FIG. 3 y 7, los subensamblajes fluídicos comprenden tanto cámaras como canales. Las cámaras fluídicas comprenden paredes, dos caras **160**, y se conectan con uno o más canales tal como una entrada, salida o ventiladero. Los canales pueden conectar dos cámaras fluídicas y comprenden paredes y dos caras. El diseño de la cámara fluídica maximiza preferiblemente la relación de área superficial a volumen para facilitar el calentamiento y enfriamiento. El volumen interno de la cámara está preferiblemente entre aproximadamente 1 μ l y aproximadamente 50 μ l. El área de la cara de cámara **160** en contacto con la solución corresponde preferiblemente al área con el que los elementos de calentamiento interaccionan para asegurar una temperatura de fluido uniforme durante el calentamiento. La forma de las cámaras fluídicas puede seleccionarse para coincidir con los elementos de calentamiento y para proporcionar geometrías favorables para la entrada y salida de solución. En algunas realizaciones, el volumen de la cámara puede ser mayor que el volumen de fluido para proporcionar un espacio para las burbujas que aparecen en el transcurso de la operación del dispositivo. Las cámaras fluídicas pueden tener extensiones ampliadas que conducen a canales de ventilación, para asegurar que el fluido no invade el canal por acción capilar o bloquea de otro modo el mecanismo de ventilación. Las porciones de aquellas cámaras con las que se comunican los canales de ventilación pueden incluir opcionalmente una o más caras no humectantes o hidrófobas para reducir adicionalmente la invasión de fluido en el canal de ventilación.

En algunas realizaciones, cada subensamblaje fluídico comprende tres láminas de plástico laminado, donde un componente **200** forma las paredes de las cámaras fluídicas y los otros dos componentes de cara **210** y **220** se laminan con la primera formando las caras. El componente de cara **210** puede comprender opcionalmente los orificios **212** para ver los indicadores LED **214**. El componente de cara **220** comprende preferiblemente los reactivos liofilizados **20**, las partículas de detección **130** y el ensamblaje de tira de detección **230**, y preferiblemente interacciona con la PCB **75** a través de un relleno adhesivo **222**, que puede incluir una membrana con borde adhesivo **224**. En realizaciones alternativas, cada subensamblaje fluídico puede comprender dos componentes de plástico, en que un componente forma las paredes y una cara y el otro componente se lamina con el primero sellando la cámara y formando la segunda cara. En realizaciones de la presente invención, los componentes de plástico del subensamblaje fluídico pueden fabricarse mediante procesos industriales de corte con láser o chorro de agua, punzón o troquel y moldeo por inyección.

En algunas realizaciones de la invención, el grosor de las cámaras fluídicas y de las paredes de canal está en el intervalo de aproximadamente 0,025 mm a aproximadamente 1 mm, y preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 0,1 mm a aproximadamente 0,5 mm. Este grosor satisface preferiblemente los requisitos tanto de integridad estructural de la capa fluídica como de respaldo del sellado de la cámara cerrada a altas temperaturas y presiones asociadas. El grosor de las paredes del canal, particularmente de las paredes del canal de ventilación, es preferiblemente menor del de las cámaras y en el intervalo de aproximadamente 0,025 mm a aproximadamente 0,25 mm. La anchura de los canales de entrada y salida se elige preferiblemente para potenciar la capilaridad. Un canal de ventilación estrecho confiere una rigidez mejorada a la capa fluídica sin efecto adverso sobre la ventilación a presión atmosférica. El plástico que forma las caras de la capa fluídica es preferiblemente más fino que el que forma las paredes para maximizar la transferencia de calor. Roturas térmicas opcionales **170** atraviesan algunos componentes de la capa fluídica y rodean las cámaras de amplificación y detección, contribuyendo al aislamiento térmico de las cámaras de temperatura controlada.

Los plásticos usados en el ensamblaje de la capa fluídica, tales como acrílico y poliéster, comprenden preferiblemente materiales hidrófobos. En realizaciones de la invención, los componentes de la capa fluídica pueden tratarse para potenciar la humectabilidad (concretamente, disminuir la hidrofobicidad). Dichos tratamientos aseguran un control de fluido apropiado junto con las dimensiones del canal fluídico. En algunas realizaciones, puede aplicarse un tensioactivo biocompatible tal como Triton X-100 a materiales no recubiertos. El tratamiento de descarga de plasma es otro tratamiento opcional para alterar la hidrofobicidad de las superficies en contacto con fluido.

En algunas realizaciones de la invención, puede usarse película adhesiva de doble cara para sellar los diversos componentes de la capa fluídica. Se aplica película adhesiva, tal como aquella que comprende el relleno adhesivo **222** o la membrana **224**, a los lados del componente interior en el caso de una capa fluídica de tres componentes, o a un lado en el caso de una capa fluídica de dos componentes. Antes de añadir el componente de cara **220** a las demás capas, pueden incorporarse componentes adicionales de la capa fluídica tales como el ensamblaje de tira de detección **230**, las partículas de detección **130** y los reactivos liofilizados **20**. En algunas realizaciones, los componentes pueden laminarse aplicando presión para asegurar una buena adhesión. Los adhesivos conocidos por afectar o que se encuentra que afectan negativamente el rendimiento de las reacciones de amplificación de ácido nucleico deben evitarse. Los adhesivos basados en acrílico o silicona se han usado exitosamente en la invención. Es una película adhesiva preferida SI7876 suministrada por Advanced Adhesives Research. Pueden usarse otros adhesivos si se encuentra que son químicamente compatibles con los tampones, plásticos y químicas de reacción empleados mientras que proporcionan un sellado robusto a las temperaturas encontradas durante la operación del dispositivo.

Con respecto a la FIG. 2 y 3, los recintos de ventilación se diferencian preferiblemente de otras cámaras en su construcción. Después de la construcción de la capa fluídica como se describe anteriormente, los recintos de ventilación poseen una cara abierta por el lado de la capa fluídica que se junta con la capa de PCA **75**. Para formar el recinto de ventilación, se lamina un componente plástico adicional para sellar la cámara, preferiblemente que comprende una membrana termolábil fina **80** con una cara adhesiva para aplicación al lado de la capa fluídica adyacente al resistor de ventilación **70** del PCA. La membrana **80** comprende poliolefina de entre aproximadamente 5 μm y aproximadamente 200 μm de grosor, aunque pueden usarse otras películas similares. Esta membrana fina es bien adecuada tanto para sellar el recinto de ventilación como para permitir una fácil perforación y, por tanto, la ventilación a la atmósfera cuando se pasa corriente a través del resistor de ventilación, generando un rápido aumento de temperatura.

Componentes adicionales de la capa fluídica

Como se describe anteriormente, se incorporan preferiblemente varios componentes adicionales a la capa fluídica de la presente invención antes de la laminación y sellado finales. Los reactivos, incluyendo tampones, sales, dNTP, cebadores oligonucleotídicos y enzimas tales como ADN polimerasa y transcriptasa inversa, pueden liofilizarse en aglomerados o tortas antes del ensamblaje del dispositivo. La liofilización de reactivos es bien conocida en la materia e implica la deshidratación de alícuotas de reactivos congeladas mediante sublimación bajo vacío aplicado. Al añadir formulaciones específicas de lioprotectores tales como azúcares (disacáridos y polisacáridos) y polialcoholes a los reactivos antes de congelar, puede conservarse la actividad de las enzimas y puede aumentarse

la velocidad de rehidratación. Los aglomerados o tortas de reactivos liofilizados se fabrican mediante procedimientos estándares y, una vez formados, son razonablemente duraderos y pueden colocarse fácilmente en cámaras específicas de la capa fluidica antes de laminar la cara final.

5 En algunas realizaciones de la invención, las micropartículas de detección son otro componente adicional de la capa fluidica. En algunas realizaciones, estas micropartículas pueden liofilizarse como se describe para los reactivos de reacción anteriores. En otras realizaciones, las micropartículas en tampón líquido pueden aplicarse directamente a la cara interior de una cámara fluidica y secarse antes de sellar. El tampón líquido que contiene micropartículas preferiblemente comprende también azúcares o polialcoholes que ayudan a la rehidratación. La incorporación de micropartículas al tampón acuoso directamente en la capa fluidica antes de secar puede simplificar y reducir el coste final de fabricación, y puede requerir el calentamiento o ebullición de nucleados como se describe anteriormente tanto para mezclar adecuadamente las micropartículas con la solución de reacción como para desnaturalizar el producto de ácido nucleico bicatenario para hibridación con las partículas de detección.

15 En algunas realizaciones de la presente invención, se incorpora también un ensamblaje de tira de detección de flujo lateral a la capa fluidica. La tira de detección comprende preferiblemente un ensamblaje de membrana que comprende al menos un componente poroso y opcionalmente puede comprender una almohadilla absorbente, una membrana de detección, una almohadilla de tensioactivo y una película de soporte. La membrana de detección está compuesta por nitrocelulosa, celulosa, polietersulfona, poli(fluoruro de vinilideno), nailon, nailon modificado con carga o politetrafluoroetileno, y puede soportarse en una película de plástico. Como se describe anteriormente, la sonda de captura puede depositarse e inmovilizarse irreversiblemente sobre la membrana de detección en líneas, puntos o cualquier patrón que pueda visualizarse por el ojo humano a simple vista. Los oligonucleótidos depositados pueden inmovilizarse permanentemente mediante irradiación UV de la membrana de detección después de la deposición de la sonda de captura. La almohadilla de tensioactivo puede comprender un sustrato poroso, preferiblemente con una unión a ácido nucleico y propiedades de retención de fluido mínimas que permitan la migración sin trabas del producto de ácido nucleico y las micropartículas de detección. La almohadilla de tensioactivo puede comprender materiales tales como fibra de vidrio, celulosa o poliéster. En realizaciones de la invención, se secan formulaciones que incluyen al menos un reactivo anfipático sobre la almohadilla de tensioactivo para permitir una migración uniforme de muestra a través de la membrana de detección. La almohadilla absorbente puede comprender cualquier material absorbente, y ayuda a inducir la imbibición de muestra mediante el ensamblaje de membrana de detección. Usando una película de soporte adhesiva, tal como una película adhesiva de doble cara, como base, se ensambla el componente de membrana de detección colocando en primer lugar la membrana de detección, seguida de la almohadilla absorbente opcional y/o la almohadilla de tensioactivo en contacto físico con la membrana de detección con un solapamiento de entre aproximadamente 1 mm y aproximadamente 2 mm.

Capa de subensamblaje electrónico

35 En algunas realizaciones, la placa de circuito impreso (PCB) comprende un material laminado chapado con cobre FR4 de 1,57 mm de grosor estándar, aunque pueden usarse otros materiales de placa y grosores estándares. Los componentes electrónicos tales como resistores, termistores, LED y microcontroladores comprenden preferiblemente dispositivos de montaje superficial (SMD) a la venta y se colocan según la metodología estándar en la industria.

40 En realizaciones alternativas, el PCA podría integrarse con la pared del módulo y comprender un circuito de plástico flexible. Pueden usarse materiales de circuito flexibles tales como PET y poliimida. El uso de circuitos de plástico flexible es bien conocido en la materia. En otra realización, los elementos de calentamiento y sensores de temperatura pueden serigrafarse sobre la capa fluidica plástica con tecnología desarrollada por compañías tales como Soligie, Inc.

45 En algunas realizaciones de la invención, el grosor de PCB, así como la cantidad y colocación del cobre en las regiones que rodean los calentadores resistivos, se adaptan para la gestión térmica de la solución de reacción en la capa fluidica. Esto puede lograrse mediante el uso de técnicas de fabricación estándares ya mencionadas.

50 Se muestran ensamblajes de calentador resistor ejemplares en la FIG. 2 y la FIG. 3. En algunas realizaciones de la invención, el resistor es un paquete de película gruesa 2512, aunque pueden usarse otros resistores. Las cámaras de calentamiento en la capa fluidica son preferiblemente de dimensiones similares a las del resistor para asegurar un calentamiento uniforme a lo largo de la cámara. Un solo resistor de este tamaño es suficiente para calentar aproximadamente 15 μ l de solución, suponiendo un grosor de capa fluidica de 0,5 mm. El esquema de la FIG. 3 muestra dos resistores 100 que forman un calentador suficiente para calentar aproximadamente 30 μ l de solución, suponiendo una capa fluidica de 0,5 mm de grosor. En este caso, los resistores son cada uno preferiblemente de 40 ohmios y dispuestos en configuración paralela.

55 En algunas realizaciones de la invención, el sensor de temperatura **110** comprende preferiblemente un termistor tal como un dispositivo 0402 NTC, que tiene una altura similar al paquete resistor 2512. El termistor se alinea preferiblemente adyacentemente a o entre los calentadores del resistor en el caso de disposición de un resistor o dos resistores, respectivamente; véase por ejemplo la FIG. 8. Al alinear estrechamente estos elementos electrónicos, solo se da como resultado un hueco de aire muy fino entre ellos. Además, la aplicación de un

compuesto térmico antes de ensamblar la capa fluidica con la electrónica asegura un buen contacto térmico entre capa fluidica, resistor y termistor.

En algunas realizaciones de la invención, el resistor de ventilación **70** es un paquete de película gruesa 0805, aunque pueden usarse resistores similares.

- 5 En algunas realizaciones de la invención, el microcontrolador es un AVR Atmega32. El microcontrolador está preferiblemente emparejado con la complejidad del sistema fluidico. Por ejemplo, con multiplexación, el número de ventiladeros y calentadores individuales es proporcional al número de líneas de E/S del microcontrolador. El tamaño de memoria puede elegirse para admitir el tamaño del programa.

- 10 En ciertas realizaciones de la invención, se usan MOSFET de canal N del paquete SOT-23 que operan en modo ENCENDIDO-APAGADO para modular la carga de corriente a ventiladero y resistores calentadores. Las señales de modulación se envían a través del microcontrolador. En realizaciones alternativas, podría usarse un esquema de modulación de la anchura de pulso y/u otros algoritmos de control para una gestión térmica más avanzada de la fluidica. Esto se manejaría típicamente por el microcontrolador y puede requerir hardware y/o aplicaciones de software adicionales conocidos por los especialistas en la materia.

15 Ensamblaje de dispositivo final

- El ensamblaje final de componentes fluidicos, electrónicos y de carcasa en un dispositivo acabado empieza preferiblemente mediante la laminación de la capa o capas fluidicas **250** y la capa electrónica **75** para asegurar un buen contacto térmico entre los elementos de calentamiento de PCA y las cámaras y/o recintos presentes en la capa fluidica. Como se muestra en la FIG. 9, el relleno adhesivo **222** une conjuntamente las dos capas y asegura el nivel de contacto entre la capa fluidica plana y los componentes electrónicos topográficamente elevados presentes en el PCA. Puede colocarse compuesto o grasa térmica sobre los elementos de calentamiento antes de la laminación para mejorar adicionalmente el contacto térmico. Después del ensamblaje de las capas fluidica y electrónica, puede fijarse una carcasa de plástico protectora para dar como resultado el dispositivo final.

- 25 Dependiendo de la aplicación, pueden ser de la mayor utilidad diferentes realizaciones de la invención. Algunas realizaciones comprenden un dispositivo en que una unidad básica de control pequeña dirige una unidad desechable menor que contiene los sistemas de amplificación y detección de ácido nucleico. Esta realización particular ayuda a reducir el coste de una prueba de diagnóstico individual. Se muestra en la FIG. 10 un dispositivo representativo diseñado con este fin. Como se describe anteriormente, las funciones electrónicas de dicho dispositivo se dividen preferiblemente en dos subensamblajes separados. El subensamblaje desechable **260** comprende el conector de clavijas **270** u otro conector electrónico similar y componentes electrónicos de bajo coste tales como elementos de calentamiento de la cámara de amplificación **100**, elementos de calentamiento de la cámara de marcaje **265**, elementos de calentamiento del ventiladero **70**, sensores de temperatura tales como termistores y opcionalmente indicadores LED **214**, incluyendo aquellos componentes que interaccionan directamente con los componentes del sistema fluidico. El conector **270** proporciona preferiblemente corriente a los calentadores resistivos junto con una línea de energía y señal al termistor o termistores. El subensamblaje reutilizable o unidad básica **280** incorpora preferiblemente componentes reutilizables tales como microcontrolador, MOSFET, interruptores, suministro de energía o toma de alimentación **275** y/o pila, ventilador de enfriamiento opcional, interfaz de usuario opcional y el conector **272** compatible con el conector **270** del subensamblaje desechable **260**. Cuando los subensamblajes se emparejan a través de los conectores **270** y **272**, la unidad básica **280** respalda preferiblemente el subensamblaje desechable **260** en una orientación sustancialmente vertical o casi vertical. Aunque es preferible una orientación sustancialmente vertical en algunas de las realizaciones descritas en la presente memoria, pueden obtenerse resultados similares si el dispositivo funciona inclinado, especialmente si se recubren ciertas rutas para reducir el ángulo de humectación de las soluciones usadas.

- 45 Otra realización comprende un dispositivo en que todo el ensamblaje es desechable, como se muestra en la FIG. 11. En esta realización, hay un solo ensamblaje electrónico que está alimentado por una pila de 9 voltios **305** preferiblemente enlazado con el lado posterior del dispositivo a través de las terminales **307**, como se muestra en la FIG. 11C. El microcontrolador **300**, el circuito de acondicionamiento de energía **302** y los MOSFET **310** se localizan preferiblemente también en el lado posterior del dispositivo mostrado en la FIG. 11 B, mientras que el lado opuesto, que está en contacto con la capa fluidica y se muestra en la FIG. 11A, comprende los elementos de calentamiento de la cámara de amplificación **100**, los elementos de calentamiento de la cámara de marcaje **265**, los elementos de calentamiento del ventiladero **70** y sensores de temperatura. El dispositivo representado en la FIG. 11 está diseñado para incorporar cámaras y otros componentes requeridos para realizar dos reacciones, las reacciones de amplificación y marcaje, en paralelo para aplicaciones múltiples. Esta realización particular es ideal para aplicaciones en que se efectúa la prueba en localizaciones remotas. El dispositivo puede alimentarse como alternativa por un adaptador de pared u otra pila o pilas con suficiente capacidad.

Para proporcionar una prueba molecular de muestra a resultado completa, puede hacerse interaccionar cualquiera de las realizaciones anteriores de la invención con un sistema de preparación de muestra **320** que proporciona ácidos nucleicos como salida a la cámara de muestras **10** a través del canal **325**. Esto se ha demostrado usando la tecnología de preparación de muestra descrita en la publicación internacional nº WO 2009/137059 A1, titulada

“Highly Simplified Lateral Flow-Based Nucleic Acid Sample Preparation and Passive Fluid Flow Control”. Se ilustra una realización del dispositivo integrado resultante en la FIG. 12.

Subensamblaje fluido con múltiples componentes de pared

5 En algunas realizaciones, tales como la ilustrada en la FIG. 7, el subensamblaje fluido puede comprender tres láminas de plástico laminadas, en que una lámina forma las paredes de las cámaras fluidas y los otros dos componentes se laminan con la primera formando las caras. En realizaciones alternativas, el subensamblaje fluido puede comprender dos componentes plásticos, en que un componente forma las paredes y una cara y el otro componente se lamina con el primero para sellar la cámara y formar la segunda cara. En realizaciones de la presente invención, los componentes plásticos del subensamblaje fluido pueden fabricarse mediante procesos industriales de corte por láser o chorro de agua, punzón o troquel y moldeo por inyección. En otras realizaciones alternativas, el subensamblaje fluido puede comprender capas laminadas de tal modo que la cámara de detección se sitúe en una capa separada del dispositivo de modo que se disponga delante de la capa que comprende las cámaras de amplificación y marcaje. Esta configuración física reduce la anchura del dispositivo confiriendo también una funcionalidad adicional. Específicamente, esta realización coloca una tira de detección en la cámara de detección de tal modo que esté situada sobre la cámara de marcaje, permitiendo usar los elementos calentadores debajo de la cámara de marcaje (durante la etapa de detección de un ensayo) para el control de la temperatura en la cámara de detección. El control de la temperatura de la cámara de detección posibilita el uso de temperaturas elevadas durante la hibridación con la tira de detección. La modulación mediada por la temperatura del rigor de hibridación durante la detección basada en hibridación puede usarse para conseguir una especificidad de hibridación potenciada que es de utilidad, por ejemplo, en la discriminación de secuencias de ácido nucleico estrechamente relacionadas (p.ej. polimorfismo de un solo nucleótido).

La FIG. 13 muestra los componentes de un ensamblaje de módulo fluido multicapa **290** de una realización de la presente invención tal como se describe inmediatamente antes. El primer componente de pared **300** comprende la cámara de detección **302** para admitir la tira de detección **305** y la porción **304** de la cámara de muestras. El segundo componente de pared **310** comprende otra porción **306** de la cámara de muestras, la cámara de amplificación **314**, la cámara de marcaje **316**, los recintos de ventilación **318** y los correspondientes canales. Tres componentes de cara, **330**, **335** y **340**, forman las cámaras, recintos y canales. El componente de cara **335** actúa como cara trasera del componente de pared **300** y cara frontal del componente de pared **310** y comprende la abertura **303** para formar la cámara de muestras y la abertura **345** para que la solución que comprende ácidos nucleicos diana marcados se transfiera de la cámara de marcaje **316** a la cámara de detección **302**. Las capas componentes se unen preferiblemente entre sí con un adhesivo de transferencia de silicona. Las superficies interiores se tratan preferiblemente para controlar la humectación. Se añaden preferiblemente durante la fabricación los reactivos, el ensamblaje de flujo lateral que comprende la tira de detección **305** y las válvulas de ventilación termoplásticas termofusibles **320**. Se sella preferiblemente una membrana adhesiva sobre los recintos de ventilación.

La FIG. 14 muestra una vista despiezada de un cartucho de ensayo desechable **350** que incorpora la capa fluida **290** de la FIG. 13. El cartucho de ensayo **350** comprende cubierta frontal, ensamblaje de módulo microfluido **290**, cinta adhesiva **360**, placa de circuito **370** y cubierta posterior **380**. La FIG. 15 es una ilustración del PCA desechable/ensamblaje fluido **350** en su sitio de la estación de acoplamiento **400**. Se añade muestra a la cámara de muestras a través del puerto de muestra **390**. La estación de acoplamiento contiene preferiblemente la electrónica de control y el suministro de energía y puede incluir botones para iniciar los procesos electrónicos requeridos para el ensayo.

Ejemplo 1: Procedimiento de amplificación y detección de un ácido nucleico diana para el diagnóstico de infección por *Candidatus liberibacter* en cítricos

45 Se empleó una realización de la invención en la que un componente desechable interacciona con un acoplamiento reutilizable para ensayar en tejido de hoja de cítrico la presencia de *Candidatus Liberibacter asiaticus*, el agente etiológico del enverdecimiento cítrico.

Se construyó un dispositivo parcialmente desechable como se describe anteriormente. La unidad reutilizable comprendía una PCB recubierta con cobre estándar de 42,5 g. Los componentes del circuito incluían un microcontrolador ATmega328, MOSFET de canal N de 0,5 A, resistores de SMD y componentes acondicionadores de energía. Una cubierta de plástico formada por estereolitografía (SLA) cubría la placa y los interruptores táctiles. Se montó un conector de clavija hembra en la superficie superior para permitir una conexión vertical con el PCA desechable. El PCA desechable comprendía una PCB similar junto con resistores de película gruesa, el termistor 0402 y LED 0603. Se colocó un conector de clavija macho en el ángulo correcto en un extremo de la placa para permitir la orientación vertical cuando se insertaba en el enchufe hembra de la unidad reutilizable.

La capa fluida comprendía dos componentes de cara, un componente de pared y una membrana fina. Los componentes de cara estaban compuestos por poliéster (PET) de 0,10 mm. Los componentes de pared estaban compuestos por acrílico de 0,5 mm que se laminaba con película de transferencia de silicona de 0,05 mm de Advanced Adhesives, Inc. La membrana de ventilación estaba compuesta por poliolefina de 0,01 mm con adhesivo

acrílico resistente a disolventes de 0,10 mm de 3M, Inc. Se cortaron los componentes individuales a su forma usando un cortador láser VersaLaser 3.5 de Universal Laser Systems, Inc. Antes del ensamblaje, se colocaron todos los componentes fluidicos plásticos cortados con láser, excepto el componente de membrana, en un baño sonicador que contenía hidróxido de sodio 100 mM y dodecilsulfato de sodio al 0,1 %, y se sonicaron durante 30 minutos para retirar cualquier desecho, ácidos nucleicos contaminantes o nucleasas. Se lavaron finalmente los componentes plásticos limpiados con agua libre de nucleasa. Se laminaron en primer lugar los componentes de pared y cara (orientados a PCA) aplicando una presión de 34,5 MPa. Se depositaron perlas de poliestireno conjugadas con el oligonucleótido de detección en sacarosa 500 mM en la cámara de marcaje y se secaron a vacío. Después de secar, se colocó un trozo de cinta de doble cara en la cámara de detección y se ensambló el componente de membrana de detección usando una tira de membrana de nitrocelulosa, una almohadilla de tensioactivo Accuflow-P y papel secante para servir como almohadilla absorbente. En algunos casos, se añadió a la cámara de muestras una perla liofilizada compuesta por enzimas de reacción y excipientes. Finalmente, se selló la capa fluidica con el otro componente de cara y se laminó el componente de membrana de ventilación para sellar los recintos de ventilación. Se aplicó ligeramente compuesto térmico de silicona (Radio Shack, Inc.) a los resistores de amplificación y marcaje, y se laminaron las capas fluidica y electrónica usando un relleno adhesivo.

Después de la terminación del ensamblaje del dispositivo, se añadieron 28 µl de una mezcla de reacción a la cámara de muestras. Dependiendo del experimento, se añadieron las enzimas necesarias para la amplificación a esta mezcla de reacción en forma líquida (FIG. 16A) o presentes en una torta liofilizada incorporada a la cámara de muestras de la capa fluidica (FIG. 16B). En ambos casos, se extrajo el molde de ácido nucleico usado de tejido de planta infectada usando un QIAshredder y kit de columna de centrifugación (Qiagen, Inc.). Se usaron los cebadores *hyvl_For* y *hyvl_Rev* para amplificar una secuencia de ácido nucleico de 139 pb que diagnostica la presencia de la bacteria patogénica vegetal *Candidatus liberibacter asiaticus*. Se efectuó la química de reacción de amplificación registrada usando un tampón de amplificación preelaborado (10X) que comprende Tris-HCl 400 mM (pH 8,4), sulfato de amonio 10 mM, cloruro de potasio 100 mM y Triton X-100 al 0,25 %. Cada 20 µl de solución de reacción contenían:

- 9,4 µl de agua
- 2,0 µl de tampón de amplificación 10x
- 2,0 µl de DMSO
- 0,4 µl de cloruro de potasio (2 M)
- 0,5 µl de cloruro de magnesio (100 mM)
- 0,5 µl de ditiotreitól (100 mM)
- 0,5 µl de dNTP (10 mM)
- 2,0 µl del conjunto de cebadores *hyvl_For* y *hyvl_Rev* (8 µM cada uno)
- 0,5 µl de ARN polimerasa VentR (exo) (2 U/µl)*
- 0,2 µl de Et SSB, proteína de unión a monocatenario extremadamente termoestable (500 µg/ml)*
- 2,0 µl de ADN extraído de tejido sano o infectado por *C. liberibacter* (17,2 ng/µl)

*incluido en solución, o en el caso de usar enzima liofilizada, sustituido por agua

Se logró la ventilación de la cámara de amplificación y la iniciación del programa de amplificación y detección apretando un interruptor táctil sobre la unidad reutilizable que sirve como botón de inicio. Después de la ventilación, la solución de reacción entró en la cámara de amplificación, donde se calentó la solución a 85 °C durante 2 minutos, seguido de 40 ciclos de: 76 °C durante 10 segundos y 60 °C durante 25 segundos. Después de completar la ciclación térmica, se permitió fluir la reacción en la cámara de marcaje mediante ventilación iniciada por microcontrolador. La cámara de marcaje contenía microesferas de detección de poliestireno teñidas de azul secadas por la cara interior de la cámara de marcaje en presencia de sacarosa 500 mM. El oligonucleótido de detección conjugado con las microesferas teñidas era complementario de la hebra codificante del producto de amplificación de ácido nucleico. Se calentó la cámara de marcaje a 105 °C durante 2 minutos y se mantuvo entonces a 90 °C durante 30 segundos, para inducir la ebullición y mezcla completa de las perlas de poliestireno y desnaturalizar el producto de ADN bicatenario. Después de calentar, se permitió enfriar durante 2 minutos la solución de reacción en la cámara de marcaje. Se ventiló la cámara de detección, causando que la solución fluyese desde la cámara de marcaje a la cámara de detección y sobre el ensamblaje de tira de detección. Se inmovilizaron tres líneas de captura sobre la membrana de flujo lateral; desde el fondo del dispositivo eran: un oligonucleótido de control negativo no complementario de ninguna diana ensayada; sonda de captura complementaria del producto de amplificación y oligonucleótido de control positivo complementario de la sonda de detección. Como puede observarse claramente en la FIG. 16, la invención amplificaba y detectaba exitosamente el ácido nucleico diana sin hibridación cruzada

detectable con la línea de control negativo.

Las secuencias de los cebadores de amplificación usados fueron:

hyvl_For

ggccggttta acacaaaaga tgaatatcat agatggggta
gtcaa (SEQ ID NO 1)

5 hyvl_Rev

cggccatttt agataaatca attgttcta gtttagatac at-
caatttgt t (SEQ ID NO 2)

Las secuencias de los oligonucleótidos de captura y detección usados fueron:

Captura

togtttgagt agctagatcc nnnnnnnnnn nt (SEQ ID
NO 3)

10 Detección

/5AmMC12/ aattgatgga tgaocgtgata gtttaocgacc
aacatctt/3Phos/ (SEQ ID NO 4)

15 Puede encontrarse una descripción más completa del proceso de amplificación en la solicitud de patente provisional de EE.UU. de propiedad común con la presente nº de serie 61/477.437, titulada "Oscillating Amplification Reaction for Nucleic Acids", incorporada a la presente memoria como referencia. Este proceso posibilita el uso de volúmenes de solución mayores con mayores sensibilidades, y no requiere un enfriamiento activo para efectuar el ciclamiento térmico. Debido a que el proceso requiere solo enfriamiento pasivo, un intervalo estrecho de temperatura de ciclamiento y no se afecta sustancialmente por tolerancias de temperatura más amplias que las usadas típicamente en PCR, pueden usarse elementos de calentamiento resistivo sencillos, posibilitando por tanto que el dispositivo sea compacto y económico. Además, es conseguible un superior acoplamiento térmico debido a que la cámara de
20 amplificación es preferiblemente plana en el lado adyacente al resistor de calentamiento, proporcionando por tanto un buen contacto térmico. Esta interfaz térmica puede potenciarse mediante el uso de un compuesto adhesivo termoconductor.

Ejemplo 2: Procedimiento de aislamiento, amplificación y detección de un ácido nucleico diana para el diagnóstico de infección por *Candidatus liberibacter* en cítricos

25 Se construyó un dispositivo parcialmente desechable como se describe anteriormente. La unidad reutilizable comprendía una PCB recubierta con cobre estándar de 42,5 g. Los componentes de circuito incluían un microcontrolador ATmega328, MOSFET de canal N de 0,5 M, resistores de SMD y componentes de acondicionamiento de energía. Una cubierta de plástico formada por estereolitografía (SLA) cubre la placa y los interruptores táctiles. Se montó un conector de clavija hembra en la superficie superior para permitir una conexión
30 vertical con el PCA desechable. El PCA desechable comprendía una PCB similar junto con resistores de película gruesa, el termistor 0402 y LED 0603. Se colocó un conector de clavija macho en el ángulo correcto en un extremo de la placa para permitir la orientación vertical cuando se insertaba en el enchufe hembra de la unidad reutilizable.

35 La capa fluidica comprendía dos componentes de cara, un componente de pared y una membrana fina. Los componentes de cara comprendían poliéster de 0,10 mm. Los componentes de pared comprendían acrílico de 0,5 mm que se laminaba con película de transferencia de silicona de 0,05 mm de Advanced Adhesives, Inc. Para admitir la integración de la capa fluidica con el subsistema de preparación de muestra, se fabricaron los componentes de pared y cara para proporcionar una abertura y un canal situados de tal modo que, cuando se laminaran con el subsistema de preparación de muestra, los ácidos nucleicos purificados se comunicarían con la cámara de muestras de la invención durante la fase de elución del proceso de preparación de muestra. La membrana de ventilación
40 estaba compuesta por poliolefina de 0,01 mm con adhesivo acrílico resistente a disolvente de 0,10 mm de 3M, Inc. Se cortaron los componentes individuales a su forma usando un cortador láser VersaLaser 3.5 de Universal Laser Systems, Inc. Antes del ensamblaje, se colocaron todos los componentes fluidicos plásticos cortados con láser, excepto el componente de membrana, en un baño sonicador que contenía hidróxido de sodio 100 mM y dodecilsulfato de sodio al 0,1 %, y se sonicaron durante 30 minutos para retirar cualquier desecho, ácidos nucleicos contaminantes o nucleasas. Se lavaron finalmente los componentes plásticos limpiados con agua libre de nucleasa.
45 Se laminaron en primer lugar los componentes de pared y cara (orientados a PCA) aplicando una presión de 34,5 MPa. Se depositaron perlas de poliestireno conjugadas con el oligonucleótido de detección en sacarosa 500 mM en la cámara de marcaje y se secaron a vacío. Después de secar, se dispuso un trozo de cinta de doble cara en la

cámara de detección y se ensambló el componente de membrana de detección usando una tira de membrana de nitrocelulosa, una almohadilla de tensioactivo Accuflow-P y papel secante para servir como almohadilla absorbente. En algunos casos, se añadió a la cámara de muestras una perla liofilizada compuesta por enzimas de reacción y excipientes. Finalmente, se selló la capa fluidica con el otro componente de cara y se laminó el componente de membrana de ventilación para sellar los recintos de ventilación. Se aplicó ligeramente compuesto térmico de silicona (Radio Shack, Inc.) a los resistores de amplificación y marcaje, y se laminaron las capas fluidica y electrónica usando un relleno adhesivo.

Se fabricó el subsistema de preparación de muestra, con el que interaccionaba la capa fluidica de la invención, a partir de acrílico cortado por láser laminado para formar reservorios de tampón y soportes físicos para los componentes de material absorbente del subsistema. Se cortó una estructura de intercambio pasivo de tampón con una geometría descrita en la publicación internacional nº WO 2009/137059 A1, titulada "Highly Simplified Lateral Flow-Based Nucleic Acid Sample Preparation and Passive Fluid Flow Control". Se usó nailon no tejido como material intercambiador de tampón. Se empleó filtro de fibra de vidrio Whatman GF/B como matriz de afinidad de ácido nucleico. Se usó gasa de algodón como almohadilla absorbente, proporcionando un sumidero absorbente de capacidad adecuada.

Se molió brevemente tejido vegetal, específicamente cuatro punciones de biopsia de 1,5 mm recogidas de la vena media de hoja de cítrico cerca del peciolo, en un tubo de microcentrífuga con 150 µl de tampón de extracto (tiocianato de guanidinio 4 M, Tris 25 mM, pH 6,4). Se introdujo el extracto bruto resultante en el reservorio de muestra del subsistema de preparación de muestra inmediatamente después de la adición de 200 µl de tampón de lavado 1 (tiocianato de guanidinio 2 M, 30 % de etanol, Tris 25 mM, pH 7,4) y 800 µl de tampón de lavado 2 (NaCl 400 mM, 50 % de etanol, Tris 50 mM, pH 6,4) a sus reservorios respectivos. 15 minutos después de la adición de muestra, se "puncionó" la matriz de unión a ácido nucleico del componente de preparación de muestra en la cámara de elución inferior y se eluyeron los ácidos nucleicos con 50 µl de tampón de reacción. Se logró la punción e inyección del tampón de reacción empujando una jeringuilla de tuberculina de 1 cm³ (sin aguja) a través del orificio por encima de la matriz de afinidad para desplazar la matriz a la cámara de elución de debajo. Se conectó la cámara de elución con la cámara de muestras de la invención mediante un canal en la capa fluidica especialmente diseñado. Apretar el émbolo de la jeringuilla dio como resultado la elución del ácido nucleico capturado, que fluía a través de dicho canal a la cámara de muestras.

Con la excepción de las enzimas, el tampón de elución contenía todos los reactivos necesarios para la amplificación de diana mediante una técnica de amplificación registrada, incluyendo los cebadores *hyvl_For* y *hyvl_Rev*, que amplifican selectivamente una secuencia de 139 pb que diagnostica la presencia de la bacteria patógena vegetal *Candidatus Liberibacter asiaticus*. Se preelaboró el tampón de amplificación (10X) y contenía Tris-HCl 400 mM (pH 8,4), sulfato de amonio 10 mM, cloruro de potasio 100 mM y 0,25 % de Triton X-100. 20 µl de tampón de elución contenían:

12,1 µl de agua

2,0 µl de tampón de amplificación 10x

2,0 µl de DMSO

0,4 µl de cloruro de potasio (2 M)

0,5 µl de cloruro de magnesio (100 mM)

0,5 µl de ditiotreititol (100 mM)

0,5 µl de dNTP (10 mM)

2,0 µl del conjunto de cebadores *hyvl_For* y *hyvl_Rev* (8 µM cada uno)

Antes de activar el dispositivo, se añadieron las siguientes enzimas a la muestra de ácido nucleico eluida en la cámara de muestras y se mezclaron brevemente usando una punta de pipeta de carga de gel.

1,0 µl de ADN polimerasa VentR (exo) (2 U/µl)

0,4 µl de Et SSB, proteína de unión a monocatenario extremadamente termoestable (500 µg/ml)

Se logró la ventilación de la cámara de amplificación y la iniciación del programa de amplificación y detección apretando un interruptor táctil sobre la unidad reutilizable que sirve como botón de inicio. Después de la ventilación, la solución entró en la cámara de amplificación, donde se calentó la solución a 85 °C durante 2 minutos, seguido de 40 ciclos de: 76 °C durante 10 segundos y 60 °C durante 25 segundos. Después de completar la ciclación térmica, se permitió fluir la reacción en la cámara de marcaje mediante ventilación iniciada por microcontrolador. La cámara de marcaje contenía microsferas de detección de poliestireno teñidas de azul secadas por la cara interior de la cámara de marcaje en presencia de sacarosa 500 mM. El oligonucleótido de detección conjugado con las

microesferas teñidas era complementario de la hebra de codificación del producto de amplificación de ácido nucleico. Se calentó la cámara de marcaje a 105 °C durante 2 minutos y se mantuvo entonces a 90 °C durante 30 segundos para inducir la ebullición y mezcla completa de las perlas de poliestireno y desnaturalizar el producto de ADN bicatenario. Después de calentar, se permitió enfriar durante 2 minutos la solución de reacción en la cámara de marcaje. Se ventiló la cámara de detección, causando que la solución fluyese desde la cámara de marcaje a la cámara de detección y sobre el ensamblaje de tira de detección. Se inmovilizaron tres líneas de captura sobre la membrana de flujo lateral, desde el fondo del dispositivo eran: un oligonucleótido de control negativo no complementario de ninguna diana ensayada, sonda de captura complementaria del producto de amplificación y un oligonucleótido de control positivo complementario de la sonda de detección. Como puede observarse claramente en la FIG. 14, el dispositivo totalmente integrado daba como resultado un aislamiento, amplificación y detección de ácido nucleico exitosos del ácido nucleico diana.

Ejemplo 3: Procedimiento de amplificación y detección de un ácido nucleico diana para el diagnóstico de infección por *Candidatus liberibacter* en cítricos

Se empleó una realización de la invención en la que un componente desechable interacciona con un acoplamiento reutilizable para ensayar en extractos de tejido de hoja de cítrico brutos la presencia de *Candidatus liberibacter asiaticus*, el agente etiológico del enverdecimiento cítrico, sin una etapa precedente de aislamiento de ácido nucleico.

Se construyó un dispositivo parcialmente desechable como se describe anteriormente. La unidad reutilizable comprendía una PCB recubierta con cobre estándar de 42,5 g. Los componentes del circuito incluían un microcontrolador ATmega328, MOSFET de canal N de 0,5 A, resistores de SMD y componentes acondicionadores de energía. Una cubierta de plástico formada por estereolitografía (SLA) cubría la placa y los interruptores táctiles. Se montó un conector de clavija hembra en la superficie superior para permitir una conexión vertical con el PCA desechable. El PCA desechable comprendía una PCB similar junto con resistores de película gruesa, el termistor 0402 y LED 0603. Se colocó un conector de clavija macho en el ángulo correcto en un extremo de la placa para permitir la orientación vertical cuando se insertaba en el enchufe hembra de la unidad reutilizable.

La capa fluidica comprendía dos componentes de cara, un componente de pared y una membrana fina. Los componentes de cara estaban compuestos por poliéster de 0,10 mm. Los componentes de pared estaban compuestos por acrílico de 0,5 mm que se laminaba con película de transferencia de silicona de 0,05 mm de Advanced Adhesives, Inc. La membrana de ventilación estaba compuesta por poliolefina de 0,01 mm con adhesivo acrílico resistente a disolventes de 0,10 mm de 3M, Inc. Se cortaron los componentes individuales a su forma usando un cortador láser VersaLaser 3.5 de Universal Laser Systems, Inc. Antes del ensamblaje, se dispusieron todos los componentes fluidicos plásticos cortados con láser, excepto el componente de membrana, en un baño sonicador que contenía hidróxido de sodio 100 mM y dodecilsulfato de sodio al 0,1 %, y se sonicaron durante 30 minutos para retirar cualquier desecho, ácidos nucleicos contaminantes o nucleasas. Se lavaron finalmente los componentes plásticos limpiados con agua libre de nucleasa. Se laminaron en primer lugar los componentes de pared y cara (orientados a PCA) aplicando una presión de 34,5 MPa. Se depositaron perlas de poliestireno conjugadas con el oligonucleótido de detección en sacarosa 500 mM en la cámara de marcaje y se secaron a vacío. Después de secar, se colocó un trozo de cinta de doble cara en la cámara de detección y se ensambló el componente de membrana de detección usando una tira de membrana de nitrocelulosa, una almohadilla de tensioactivo Accuflow-P y papel secante para servir como almohadilla absorbente. En algunos casos, se añadió a la cámara de muestras una perla liofilizada compuesta por enzimas de reacción y excipientes. Finalmente, se selló la capa fluidica con el otro componente de cara y se laminó el componente de membrana de ventilación para sellar los recintos de ventilación. Se aplicó ligeramente compuesto térmico de silicona (Radio Shack, Inc.) a los resistores de amplificación y marcaje, y se laminaron las capas fluidica y electrónica usando un relleno adhesivo.

Después de la terminación del ensamblaje del dispositivo, se añadieron 40 µl de mezcla de reacción a la cámara de muestras. Dependiendo del experimento, las enzimas requeridas para la amplificación estaban presentes en esta mezcla de reacción en forma líquida o presentes en una torta liofilizada incorporada a la cámara de muestras de la capa fluidica. En ambos casos, el espécimen ensayado comprendía 4 µl de extracto de tejido cítrico bruto preparado triturando 5 punciones de biopsia de 1,5 mm de diámetro en 500 µl de agua libre de nucleasa. Se usaron los cebadores *hyvl_For* y *hyvl_Rev* para amplificar una secuencia de ácido nucleico de 139 pb que diagnostica la presencia de la bacteria patogénica vegetal *Candidatus liberibacter asiaticus*. Se efectuó una química de reacción de amplificación registrada. Se preelaboró el tampón de amplificación (10X) y contenía Tris-HCl 400 mM (pH 8,4), sulfato de amonio 10 mM, cloruro de potasio 100 mM y Triton X-100 al 0,25 %. Cada 40 µl de solución de reacción contenían:

- 55 18,8 µl de agua
- 4,0 µl de tampón de amplificación 10x
- 4,0 µl de DMSO
- 0,8 µl de cloruro de potasio (2 M)

1,0 µl de cloruro de magnesio (100 mM)

1,0 µl de ditiotreitolo (100 mM)

1,0 µl de dNTP (10 mM)

4,0 µl del conjunto de cebadores *hyvl_For* y *hyvl_Rev* (8 µM cada uno)

5 1,0 µl de ARN polimerasa VentR (exo) (2 U/µl)*

0,4 µl de Et SSB, proteína de unión a monocatenario extremadamente termoestable (500 µg/ml)*

4,0 µl de extracto de tejido cítrico generado triturando brevemente 5 punciones de biopsia (1,5 mm de diámetro, obtenidas de peciolo de hoja de cítrico o de la vena central proximal al peciolo de hoja de cítrico de árboles cítricos sanos o infectados por *C. liberibacter*) o tejido de peciolo de ~4 mm de longitud en 500 µl de agua libre de nucleasa

10 *incluido en la solución o, en el caso de usar enzima liofilizada, sustituido por agua

Se logró la ventilación de la cámara de amplificación y la iniciación del programa de amplificación y detección apretando un interruptor táctil sobre la unidad reutilizable que sirve como botón de inicio. Después de la ventilación, la solución de reacción entró en la cámara de amplificación, donde se calentó la solución a 85 °C durante 2 minutos, seguido de 40 ciclos de 76 °C durante 10 segundos y 60 °C durante 25 segundos. Después de completar la ciclación térmica, se permitió fluir la reacción en la cámara de marcaje mediante ventilación iniciada por microcontrolador. La cámara de marcaje contenía microesferas de detección de poliestireno teñidas de azul secadas por la cara interior de la cámara de marcaje en presencia de sacarosa 500 mM. El oligonucleótido de detección conjugado con las microesferas teñidas era complementario de la hebra codificante del producto de amplificación de ácido nucleico. Se calentó la cámara de marcaje a 105 °C durante 2 minutos y se mantuvo entonces a 90 °C durante 30 segundos, para inducir la ebullición y mezcla completa de las perlas de poliestireno y desnaturalizar el producto de ADN bicatenario. Después de calentar, se permitió enfriar durante 2 minutos la solución de reacción en la cámara de marcaje. Se ventiló la cámara de detección, causando que la solución fluyese desde la cámara de marcaje a la cámara de detección y sobre el ensamblaje de tira de detección. Se inmovilizaron tres líneas de captura sobre la membrana de flujo lateral; desde el fondo del dispositivo eran: un oligonucleótido de control no complementario de ninguna diana ensayada; sonda de captura complementaria del producto de amplificación y oligonucleótido de control positivo complementario de la sonda de detección. La invención amplificaba y detectaba exitosamente el ácido nucleico diana sin hibridación cruzada detectable con las líneas de control negativo de la tira de detección.

Ejemplo 4: Procedimiento de amplificación y detección de ácido nucleico diana para la detección de *Candidatus liberibacter* en el psílido asiático *Diaphorina citri* Kuwayama

30 Se fabricó una realización de la invención en la que un componente desechable interacciona con una conexión reutilizable como se describe en el Ejemplo 3, y se empleó para ensayar en extractos de insecto entero brutos preparados a partir de *Diaphorina citri* Kuwayama la presencia de *Candidatus liberibacter asiaticus*, el agente etiológico del enverdecimiento cítrico, sin una etapa precedente de aislamiento de ácido nucleico.

35 En algunos casos, se añadió a la cámara de muestras una perla liofilizada compuesta por enzimas de reacción y excipientes. Después de la terminación del ensamblaje del dispositivo, se añadieron 40 µl de mezcla de reacción a la cámara de muestras. Dependiendo del experimento, las enzimas requeridas para amplificación estaban presentes en esta mezcla de reacción en forma líquida o presentes en una torta liofilizada incorporada a una cámara de muestras de la capa fluidica. En ambos casos, la muestra comprendía 4 µl de una solución preparada triturando 5 *Diaphorina citri* Kuwayama vivos enteros en 500 µl de agua libre de nucleasa. Se usaron los cebadores *hyvl_For* y *hyvl_Rev* para amplificar una secuencia de ácido nucleico de 139 pb que diagnostica la presencia de la bacteria patogénica vegetal *Candidatus liberibacter asiaticus*. Se efectuó la química de reacción de amplificación registrada. Se preelaboró el tampón de amplificación (10X) y contenía Tris-HCl 400 mM (pH 8,4), sulfato de amonio 10 mM, cloruro de potasio 100 mM y Triton X-100 al 0,25 %. Cada 40 µl de solución de reacción contenían:

18,8 µl de agua

45 4,0 µl de tampón de amplificación 10x

4,0 µl de DMSO

0,8 µl de cloruro de potasio (2 M)

1,0 µl de cloruro de magnesio (100 mM)

1,0 µl de ditiotreitolo (100 mM)

50 1,0 µl de dNTP (10 mM)

4,0 µl del conjunto de cebadores *hyvl_For* y *hyvl_Rev* (8 µM cada uno)

1,0 µl de ADN polimerasa VentR (exo) (2 U/µl)*

0,4 µl de Et SSB, proteína de unión a monocatenario extremadamente termoestable (500 µg/ml)*

5 4,0 µl de extracto de *Diaphorina citri* Kuwayama enteros generado triturando brevemente 5 insectos enteros en 500 µl de agua libre de nucleasa

*incluido en la solución o, en el caso de usar enzima liofilizada, sustituido por agua

10 Se logró la ventilación de la cámara de amplificación y la iniciación del programa de amplificación y detección apretando un interruptor táctil sobre la unidad reutilizable que sirve como botón de inicio. Después de la ventilación, la solución de reacción entró en la cámara de amplificación, donde se calentó la solución a 85 °C durante 2 minutos, seguido de 40 ciclos de 76 °C durante 10 segundos y 60 °C durante 25 segundos. Después de completar la ciclación térmica, se permitió fluir la reacción en la cámara de marcaje mediante ventilación iniciada por microcontrolador. La cámara de marcaje contenía microesferas de detección de poliestireno teñidas de azul secadas por la cara interior de la cámara de marcaje en presencia de sacarosa 500 mM. El oligonucleótido de detección conjugado con las microesferas teñidas era complementario de la hebra codificante del producto de amplificación de ácido nucleico. Se
15 calentó la cámara de marcaje a 105 °C durante 2 minutos y se mantuvo entonces a 90 °C durante 30 segundos, para inducir la ebullición y mezcla completa de las perlas de poliestireno y desnaturalizar el producto de ADN bicatenario. Después de calentar, se permitió enfriar durante 2 minutos la solución de reacción en la cámara de marcaje. Se ventiló la cámara de detección, causando que la solución fluyese desde la cámara de marcaje a la cámara de detección y sobre el ensamblaje de tira de detección. Se inmovilizaron tres líneas de captura sobre la membrana de flujo lateral; desde el fondo del dispositivo eran: un oligonucleótido de control negativo no complementario de ninguna diana ensayada; sonda de captura complementaria del producto de amplificación y oligonucleótido de control positivo complementario de la sonda de detección. La invención amplificaba y detectaba exitosamente el
20 ácido nucleico diana sin hibridación cruzada detectable con las líneas de control negativo de la tira de detección.

25 **Ejemplo 5: Procedimiento de amplificación y detección de un ácido nucleico diana para la detección de *Candidatus liberibacter* en vinca rosa (*Catharanthus roseus*)**

Se fabricó una realización de la invención en la que un componente desechable interacciona con un acoplamiento reutilizable como se describe en el Ejemplo 3 y se empleó para ensayar en extractos de tejido de vinca rosa (*Catharanthus roseus*) brutos la presencia de *Candidatus liberibacter asiaticus*, el agente etiológico del enverdecimiento cítrico, sin una etapa precedente de aislamiento de ácido nucleico.

30 En algunos casos, se añadió a la cámara de muestras una perla liofilizada compuesta por enzimas de reacción y excipientes. Después de la terminación del ensamblaje del dispositivo, se añadieron 40 µl de mezcla de reacción a la cámara de muestras. Dependiendo del experimento, las enzimas requeridas para amplificación estaban presentes en esta mezcla de reacción en forma líquida o presentes en una torta liofilizada incorporada a una cámara de muestras de la capa fluida. En ambos casos, la muestra comprendía 4 µl de una solución preparada triturando 5
35 punciones de biopsia de 1,5 mm de diámetro cada uno en 500 µl de agua libre de nucleasa. Se obtuvieron las punciones de biopsia de vinca rosa (*Catharanthus roseus*) infectada por *Candidatus liberibacter asiaticus* o no infectada. Se usaron los cebadores *hyvl_For* y *hyvl_Rev* para amplificar una secuencia de ácido nucleico de 139 pb que diagnostica la presencia de la bacteria patógena vegetal *Candidatus liberibacter asiaticus*. Se efectuó la química de reacción de amplificación registrada. Se preelaboró el tampón de amplificación (10X) y contenía Tris-HCl 400 mM (pH 8,4), sulfato de amonio 10 mM, cloruro de potasio 100 mM y Triton X-100 al 0,25 %. Cada 40 µl de
40 solución de reacción contenían:

18,8 µl de agua

4,0 µl de tampón de amplificación 10x

4,0 µl de DMSO

45 0,8 µl de cloruro de potasio (2 M)

1,0 µl de cloruro de magnesio (100 mM)

1,0 µl de ditiotreitól (100 mM)

1,0 µl de dNTP (10 mM)

4,0 µl del conjunto de cebadores *hyvl_For* y *hyvl_Rev* (8 µM cada uno)

50 1,0 µl de ADN polimerasa VentR (exo) (2 U/µl)*

0,4 µl de Et SSB, proteína de unión a monocatenario extremadamente termoestable (500 µg/ml)*

4,0 µl de extracto de tejido de vinca rosa generado triturando brevemente 5 punciones de biopsia de 1,5 mm de diámetro (tomadas del peciolo de una hoja de vinca rosa) en 500 µl de agua libre de nucleasa

*incluido en la solución o, en el caso de usar enzima liofilizada, sustituido por agua

5 Se logró la ventilación de la cámara de amplificación y la iniciación del programa de amplificación y detección apretando un interruptor táctil sobre la unidad reutilizable que sirve como botón de inicio. Después de la ventilación, la solución de reacción entró en la cámara de amplificación, donde se calentó la solución a 85 °C durante 2 minutos, seguido de 40 ciclos de 76 °C durante 10 segundos y 60 °C durante 25 segundos. Después de completar la ciclación térmica, se permitió fluir la reacción en la cámara de marcaje mediante ventilación iniciada por microcontrolador. La cámara de marcaje contenía microesferas de detección de poliestireno teñidas de azul secadas por la cara interior de la cámara de marcaje en presencia de sacarosa 500 mM. El oligonucleótido de detección conjugado con las microesferas teñidas era complementario de la hebra codificante del producto de amplificación de ácido nucleico. Se calentó la cámara de marcaje a 105 °C durante 2 minutos y se mantuvo entonces a 90 °C durante 30 segundos, para inducir la ebullición y mezcla completa de las perlas de poliestireno y desnaturalizar el producto de ADN bicatenario. Después de calentar, se permitió enfriar durante 2 minutos la solución de reacción en la cámara de marcaje. Se ventiló la cámara de detección, causando que la solución fluyese desde la cámara de marcaje a la cámara de detección y sobre el ensamblaje de tira de detección. Se inmovilizaron tres líneas de captura sobre la membrana de flujo lateral; desde el fondo del dispositivo eran: un oligonucleótido de control negativo no complementario de ninguna diana ensayada; sonda de captura complementaria del producto de amplificación y oligonucleótido de control positivo complementario de la sonda de detección. La invención amplificaba y detectaba exitosamente el ácido nucleico diana sin hibridación cruzada detectable con las líneas de control negativo de la tira de detección.

Ejemplo 6: Procedimiento de amplificación y detección de un ácido nucleico diana para la detección de *Candidatus liberibacter asiaticus* en *Cuscuta pentagona*

25 Se fabricó una realización de la invención en la que un componente desechable interacciona con un acoplamiento reutilizable como se describe en el Ejemplo 3 y se empleó para ensayar en extractos de tejido de vinca rosa (*Catharanthus roseus*) brutos la presencia de *Candidatus liberibacter asiaticus*, el agente etiológico del enverdecimiento cítrico, sin una etapa precedente de aislamiento de ácido nucleico.

30 En algunos casos, se añadió a la cámara de muestras una perla liofilizada compuesta por enzimas de reacción y excipientes. Después de la terminación del ensamblaje del dispositivo, se añadieron 40 µl de mezcla de reacción a la cámara de muestras. Dependiendo del experimento, las enzimas requeridas para amplificación estaban presentes en esta mezcla de reacción en forma líquida o presentes en una torta liofilizada incorporada a una cámara de muestras de la capa fluidica. En ambos casos, la muestra comprendía 4 µl de una solución preparada triturando una cepa de *Cuscuta pentagona* de 1 cm de longitud en 500 µl de agua libre de nucleasa. Se obtuvieron las punciones de biopsia de vinca rosa (*Catharanthus roseus*) infectada por *Candidatus liberibacter asiaticus* o no infectada. Se usaron los cebadores *hyvI_For* y *hyvI_Rev* para amplificar una secuencia de ácido nucleico de 139 pb que diagnostica la presencia de la bacteria patógena vegetal *Candidatus liberibacter asiaticus*. Se efectuó la química de reacción de amplificación registrada. Se preelaboró el tampón de amplificación (10X) y contenía Tris-HCl 400 mM (pH 8,4), sulfato de amonio 10 mM, cloruro de potasio 100 mM y Triton X-100 al 0,25 %. Cada 40 µl de solución de reacción contenían:

18,8 µl de agua

40 4,0 µl de tampón de amplificación 10x

4,0 µl de DMSO

0,8 µl de cloruro de potasio (2 M)

1,0 µl de cloruro de magnesio (100 mM)

1,0 µl de ditiotreitól (100 mM)

45 1,0 µl de dNTP (10 mM)

4,0 µl de conjunto de cebadores *hyvI_For* y *hyvI_Rev* (8 µM cada uno)

1,0 µl de ADN polimerasa VentR (exo) (2 U/µl)*

0,4 µl de Et SSB, proteína de unión a monocatenario extremadamente termoestable (500 µg/ml)*

50 4,0 µl de extracto de *Cuscuta pentagona* generado triturando brevemente una cepa de 1 cm de longitud en 500 µl de agua libre de nucleasa

Aunque la invención se ha descrito con detalle con referencia particular a las realizaciones descritas, otras realizaciones pueden conseguir los mismos resultados. Las variaciones y modificaciones de la presente invención

serán obvias para los especialistas en la materia y se pretende que cubra todas dichas modificaciones y equivalentes. Todas las divulgaciones de todas las patentes y publicaciones citadas anteriormente se incorporan por la presente como referencia.

Listado de secuencias

- 5 <110> Mesa Tech International, Inc.
- <120> DISPOSITIVO INTEGRADO PARA LA DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE ÁCIDO NUCLEICO
- <130> 33106-PCT1
- <140> 61/477.357
- <141> 20-04-2011
- 10 <150> 61/477.437
- <151> 20-04-2011
- <160> 4
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- 15 <211> 45
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> cebador de codificación "hyvl_For"
- 20 <400> 1
- ggccgtttta acacaaaaga tgaatatcat agatggggta gtcaa**
- 45**
- <210> 2
- <211> 51
- <212> ADN
- 25 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> cebador inverso "hyvl_Rev"
- <400> 2
- cggccatttt agataaatca attgttcta gtttagatac atcaattgt**
- t 51**
- 30 <210> 3
- <211> 32
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 35 <223> captura

<220>

<221> misc_feature

<222> (21)..(31)

<223> n e s a, c, g o t

5 <400> 3

tcgtttgagt agctagatcc nnnnnnnnnn nt 32

<210> 4

<211> 38

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> detección

<400> 4

aattgatgga tgacgtgata gtttacgacc aacatctt 38

15

REIVINDICACIONES

1. Una plataforma desechable para detectar un ácido nucleico diana, comprendiendo la plataforma desechable:
- una cámara de muestras para recibir una muestra que comprende el ácido nucleico diana;
- 5 una cámara de amplificación conectada a través de un primer canal con dicha cámara de muestras y conectada a través de un segundo canal con un primer recinto de ventilación;
- una cámara de marcaje conectada a través de un tercer canal con dicha cámara de amplificación y conectada a través de un cuarto canal con un segundo recinto de ventilación;
- 10 un subsistema de detección conectado con dicha cámara de marcaje a través de un quinto canal y conectado a través de un sexto canal con un tercer recinto de ventilación;
- una pluralidad de elementos de calentamiento resistivos y uno o más dispositivos medidores de la temperatura;
- caracterizada porque** dichos recintos de ventilación se sellan cada uno a baja presión por un material termolábil localizada en la cercanía de uno de dichos elementos de calentamiento resistivos y
- 15 opcionalmente en la que dicha cámara de marcaje es calentable usando uno de dichos elementos de calentamiento resistivos.
2. La plataforma desechable de la reivindicación 1, que comprende además una etapa de preparación de muestra que comprende una salida en conexión directa de fluido con una entrada de dicha cámara de muestras.
3. La plataforma desechable de la reivindicación 1, en la que las dimensiones de una superficie sustancialmente plana de dicha cámara de amplificación son aproximadamente las mismas que las dimensiones de la superficie sustancialmente plana de un elemento de calentamiento resistivo en contacto térmico con dicha cámara de amplificación.
- 20 4. La plataforma desechable de la reivindicación 1, en la que dicha cámara de amplificación no se enfría mediante un dispositivo de enfriamiento activo.
5. La plataforma desechable de la reivindicación 1, en la que dicha cámara de amplificación contiene una solución de amplificación, dicha cámara de muestras comprende una mezcla líquida de reactivos de amplificación o una mezcla liofilizada de reactivos de amplificación, y/o dicha cámara de marcaje comprende partículas de detección.
- 25 6. La plataforma desechable de la reivindicación 1, en la que dicho subsistema de detección comprende una tira de flujo lateral que no comprende partículas de detección.
- 30 7. La plataforma desechable de la reivindicación 1, en la que dichas cámaras, dichos canales y dichos recintos de ventilación están localizados sobre una capa de ensamblaje de fluido y dichos elementos electrónicos están localizados sobre una capa separada que comprende una placa de circuito impreso, estando dicha capa separada unida a dicha capa de ensamblaje de fluido.
- 35 8. La plataforma desechable de la reivindicación 1, en la que dicho subsistema de detección está localizado sobre dicha capa de ensamblaje de fluido o sobre una segunda capa de ensamblaje de fluido.
9. La plataforma desechable de la reivindicación 1, en la que un volumen de al menos una de dichas cámaras está entre aproximadamente 1 microlitro y aproximadamente 50 microlitros.
- 40 10. La plataforma desechable de la reivindicación 1, que comprende además un conector para acoplar dicha plataforma desechable con una unidad básica que no es un instrumento externo y que mantiene la plataforma desechable en una orientación vertical o inclinada.
11. Un procedimiento para detectar un ácido nucleico diana, consistente el procedimiento en:
- colocar una muestra que comprende el ácido nucleico diana en una cámara de muestras de una plataforma desechable según la reivindicación 1;
- orientar la plataforma desechable verticalmente o inclinada;
- 45 hacer reaccionar la muestra con una mezcla líquida o previamente liofilizada de reactivos de amplificación;
- caracterizado por** las etapas de:
- abrir un primer recinto de ventilación conectado con una cámara de amplificación a baja presión, posibilitando así

que la muestra reaccionada fluya al interior de la cámara de amplificación;

amplificar el ácido nucleico diana en la cámara de amplificación;

abrir un segundo recinto de ventilación conectado con una cámara de marcaje a baja presión, posibilitando así que el ácido nucleico diana amplificado fluya al interior de la cámara de marcaje;

5 marcar el ácido nucleico diana amplificado usando partículas de detección en la cámara de marcaje;

abrir un tercer recinto de ventilación conectado con un subsistema de detección a baja presión, posibilitando así que el ácido nucleico diana marcado fluya al interior del subsistema de detección y

detectar el ácido nucleico diana amplificado;

10 opcionalmente en el que la plataforma desechable es controlable mediante el uso de una estación de acoplamiento que no es un instrumento externo.

12. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que la etapa de amplificación comprende amplificar el ácido nucleico diana usando un elemento de calentamiento resistivo localizado dentro de la plataforma desechable en una cercanía de la cámara de amplificación.

15 **13.** El procedimiento de la reivindicación 11, que comprende además enfriar pasivamente la cámara de amplificación.

14. El procedimiento de la reivindicación 11, que comprende además calentar la cámara de marcaje durante la etapa de marcaje usando un elemento de calentamiento resistivo localizado dentro de la plataforma desechable en una cercanía de la cámara de marcaje.

20 **15.** El procedimiento de la reivindicación 11, en el que el subsistema de detección no comprende partículas de detección.

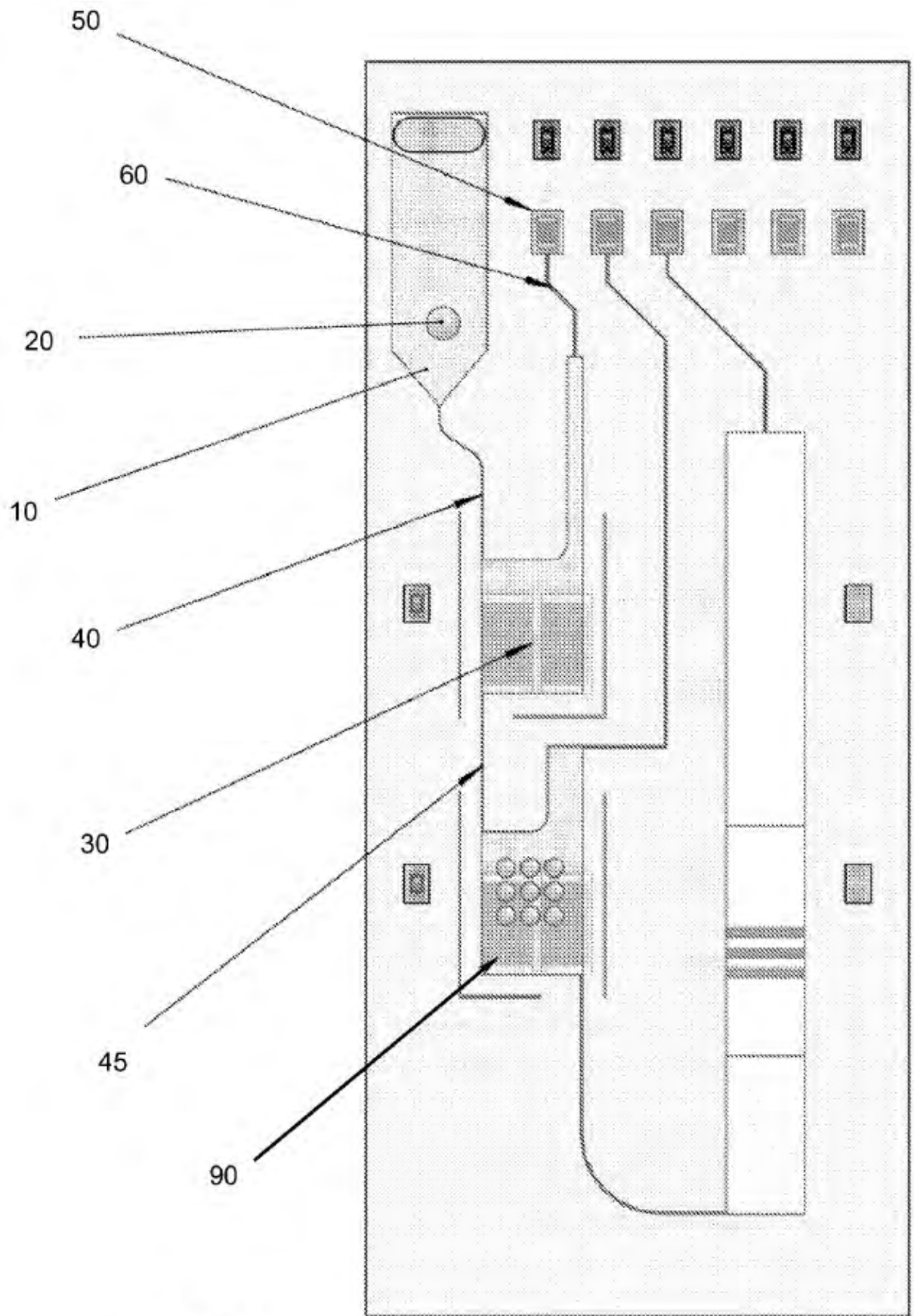


FIG. 1

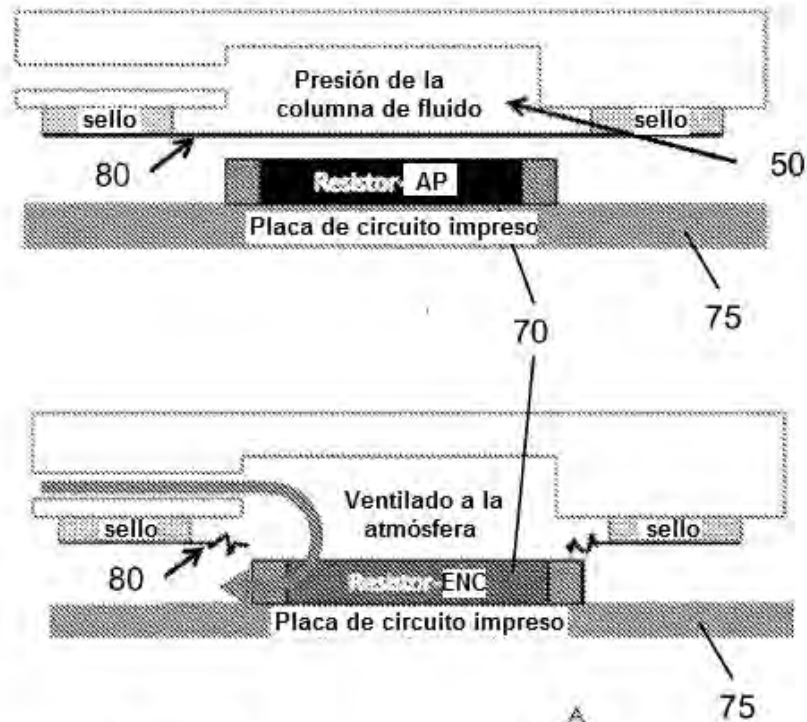


FIG. 2A

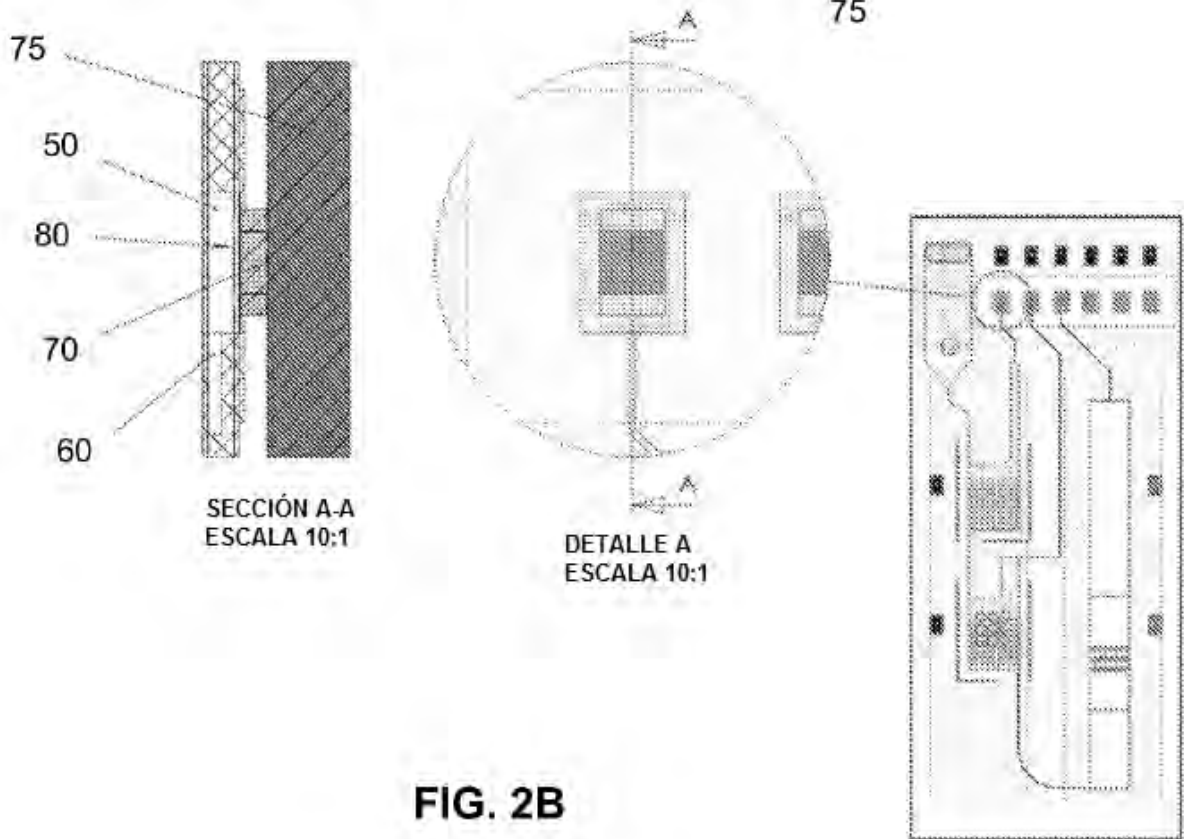


FIG. 2B

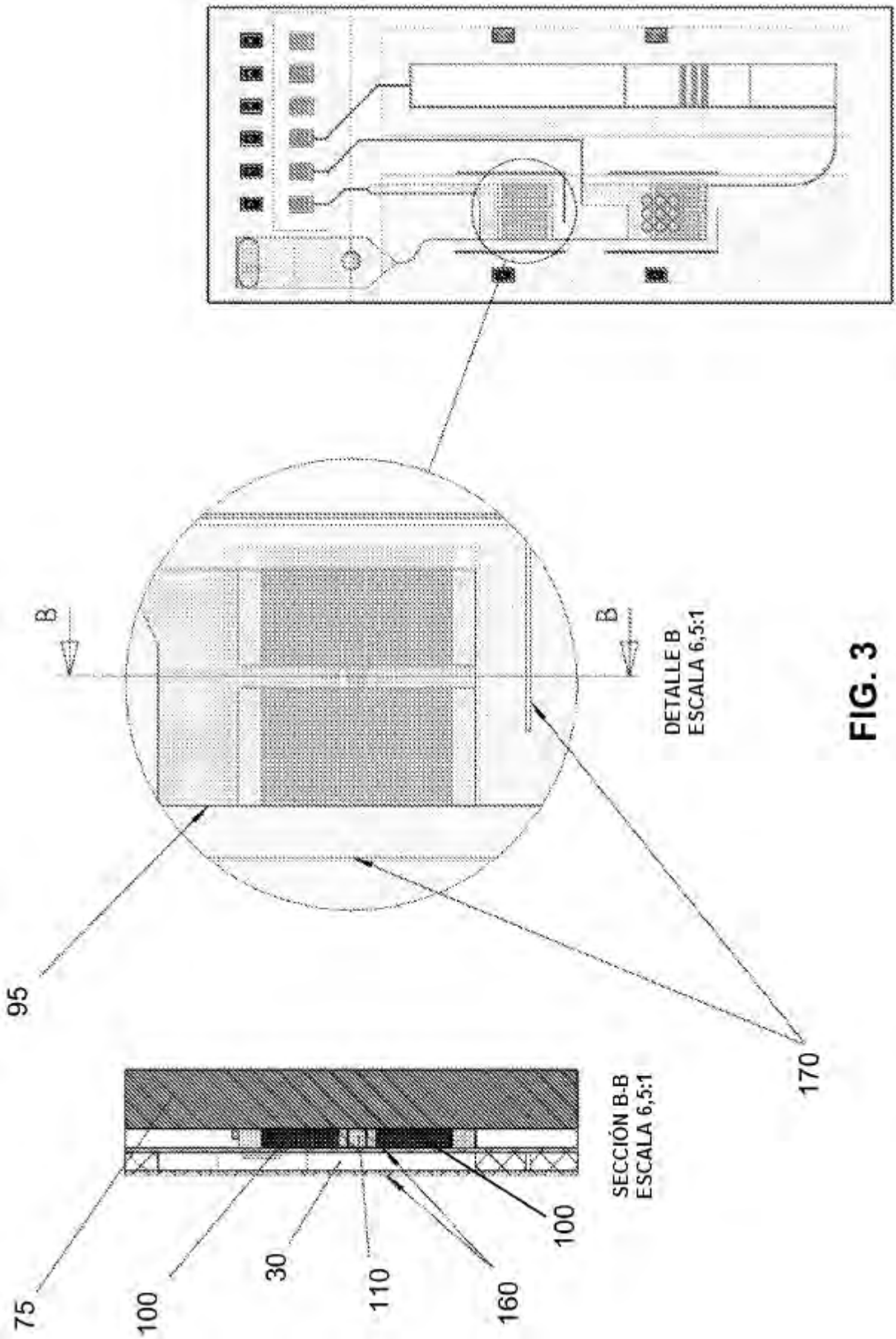


FIG. 3

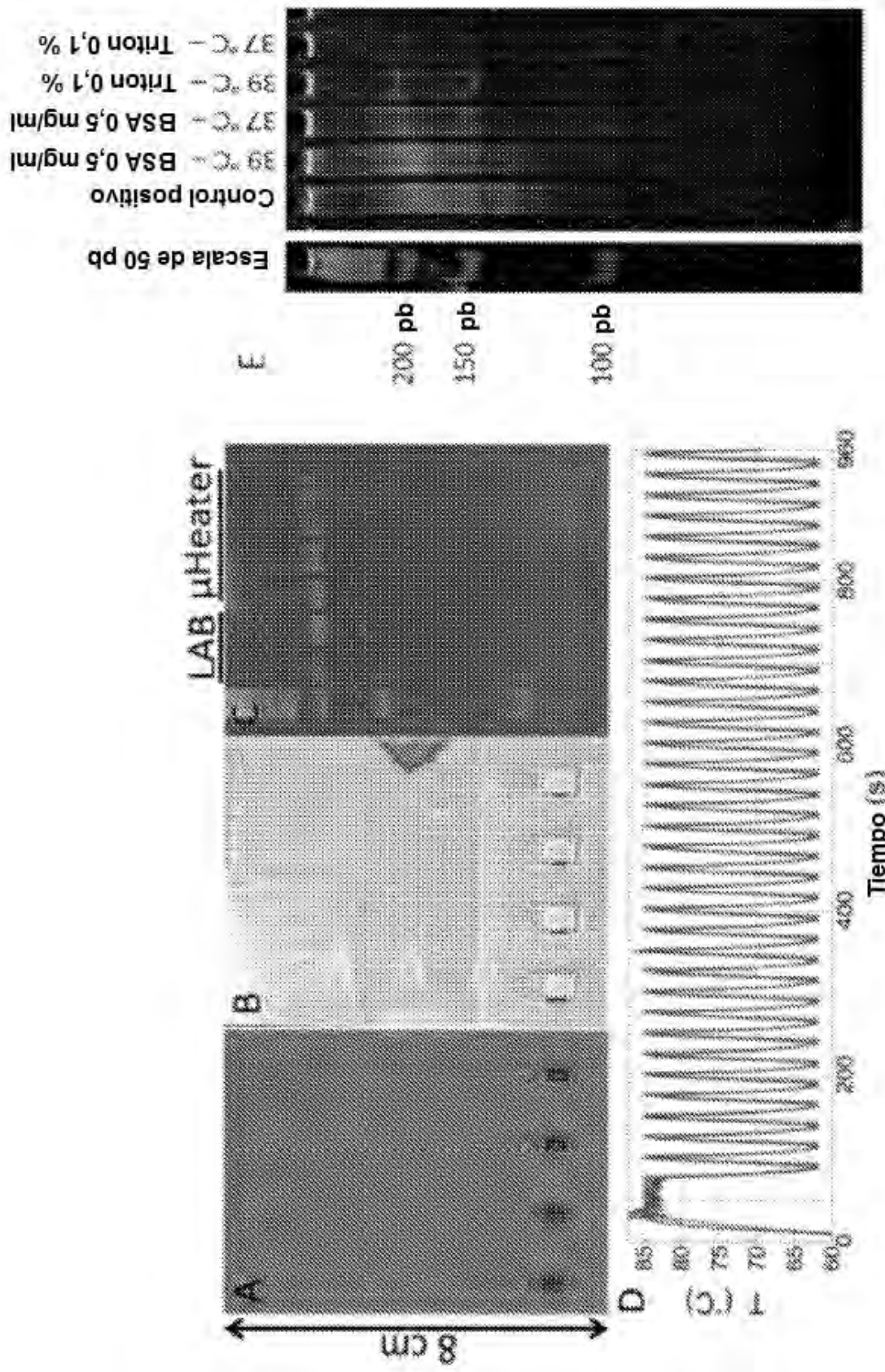


FIG. 4

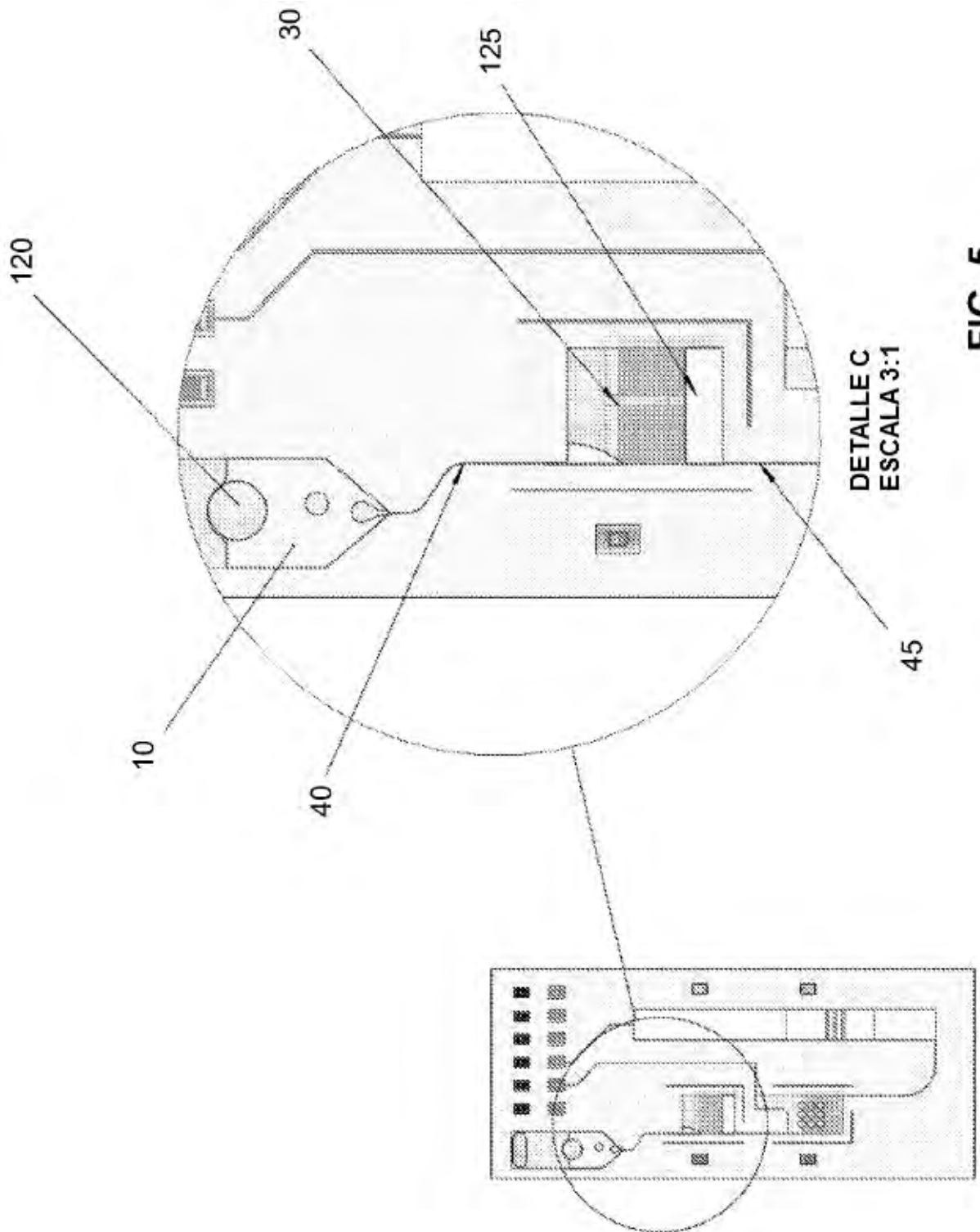
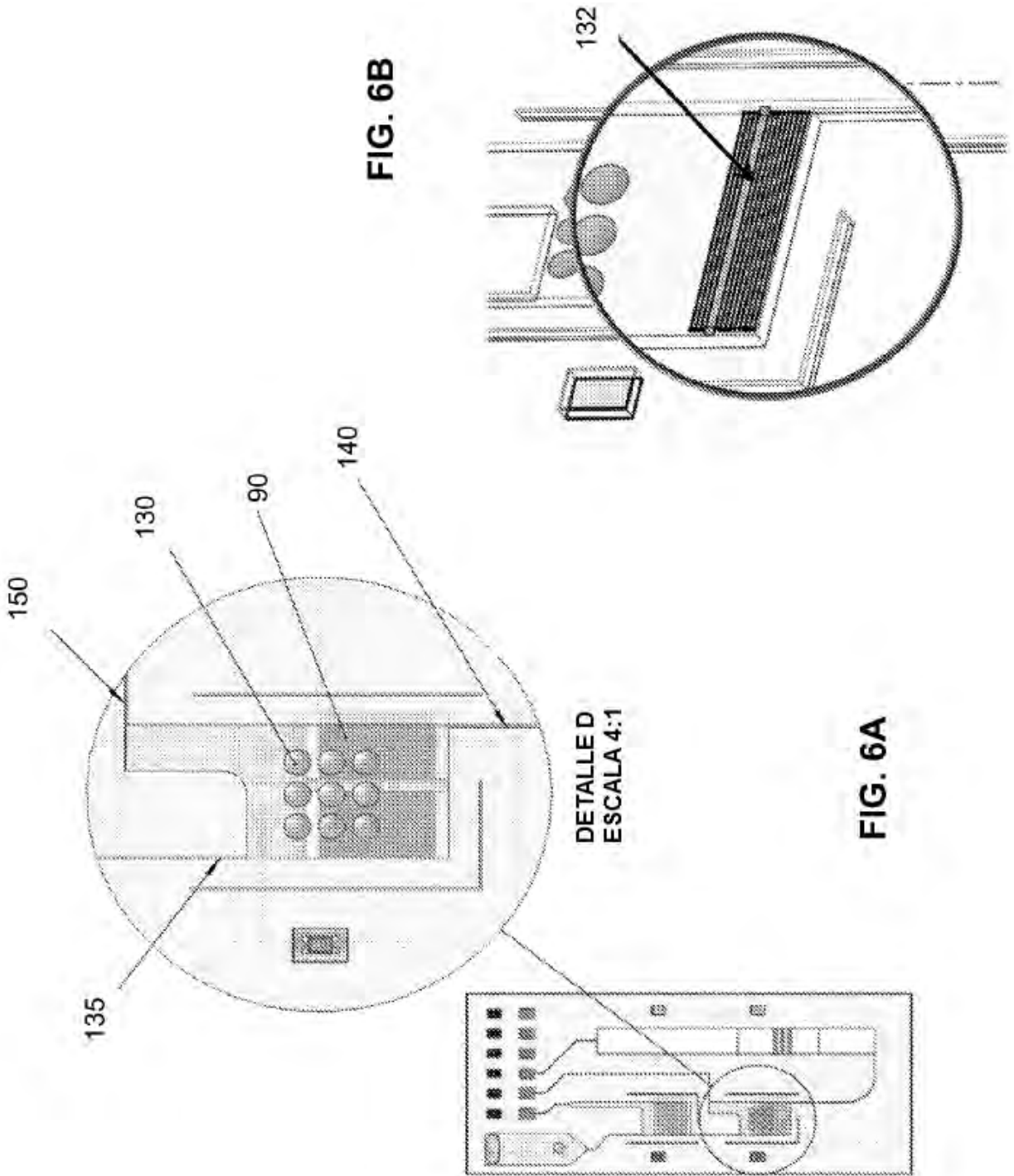


FIG. 5



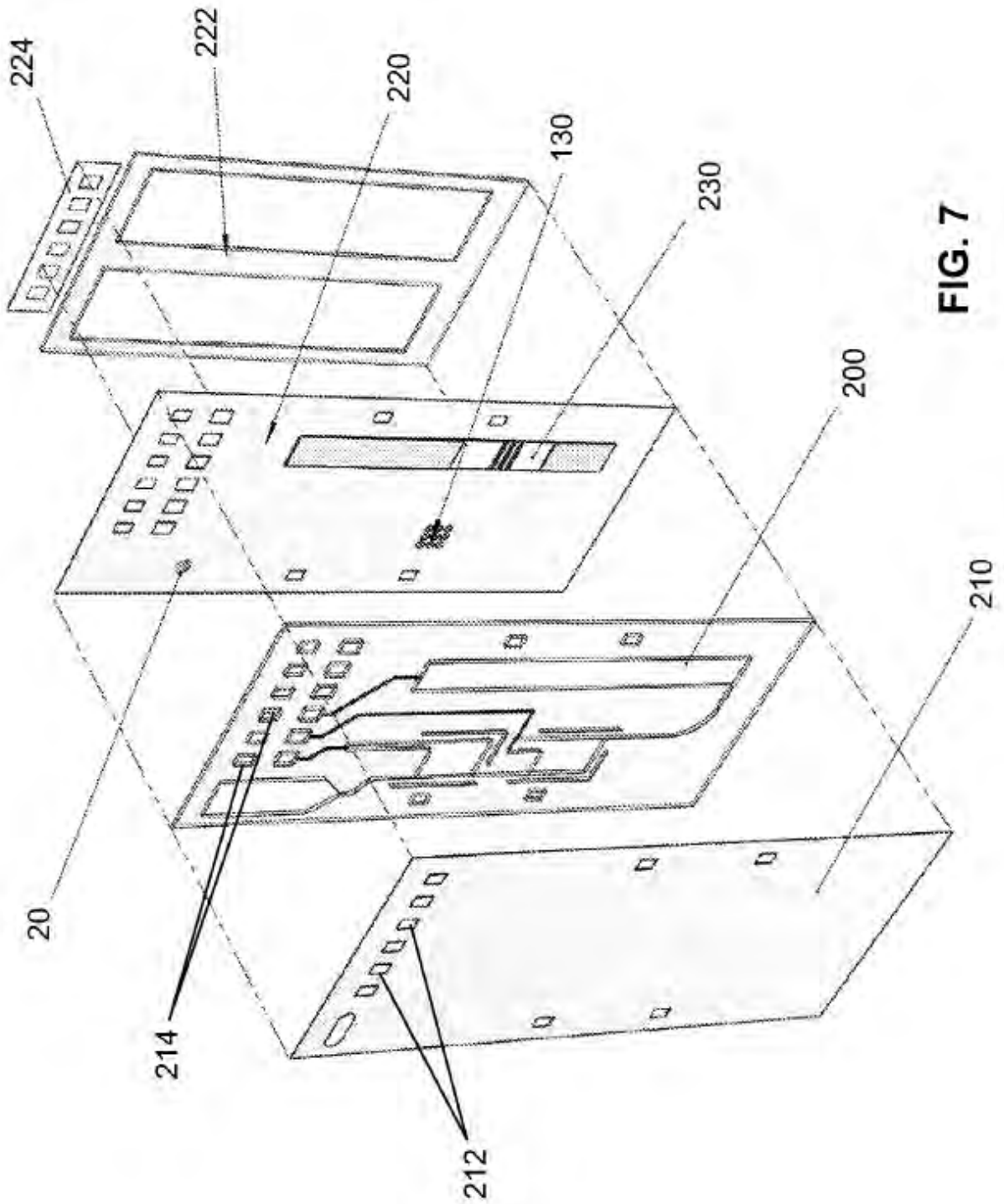


FIG. 7

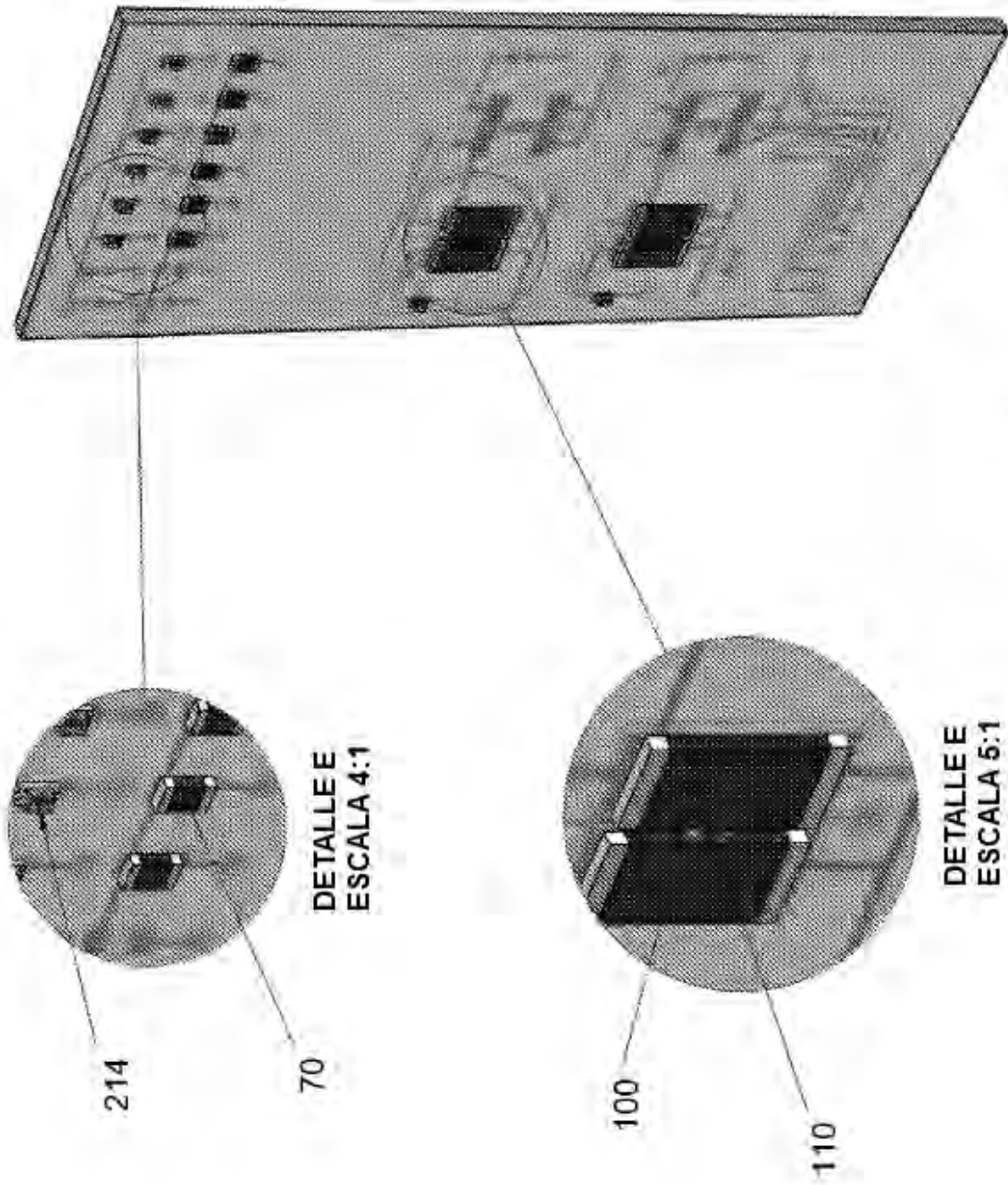


FIG. 8

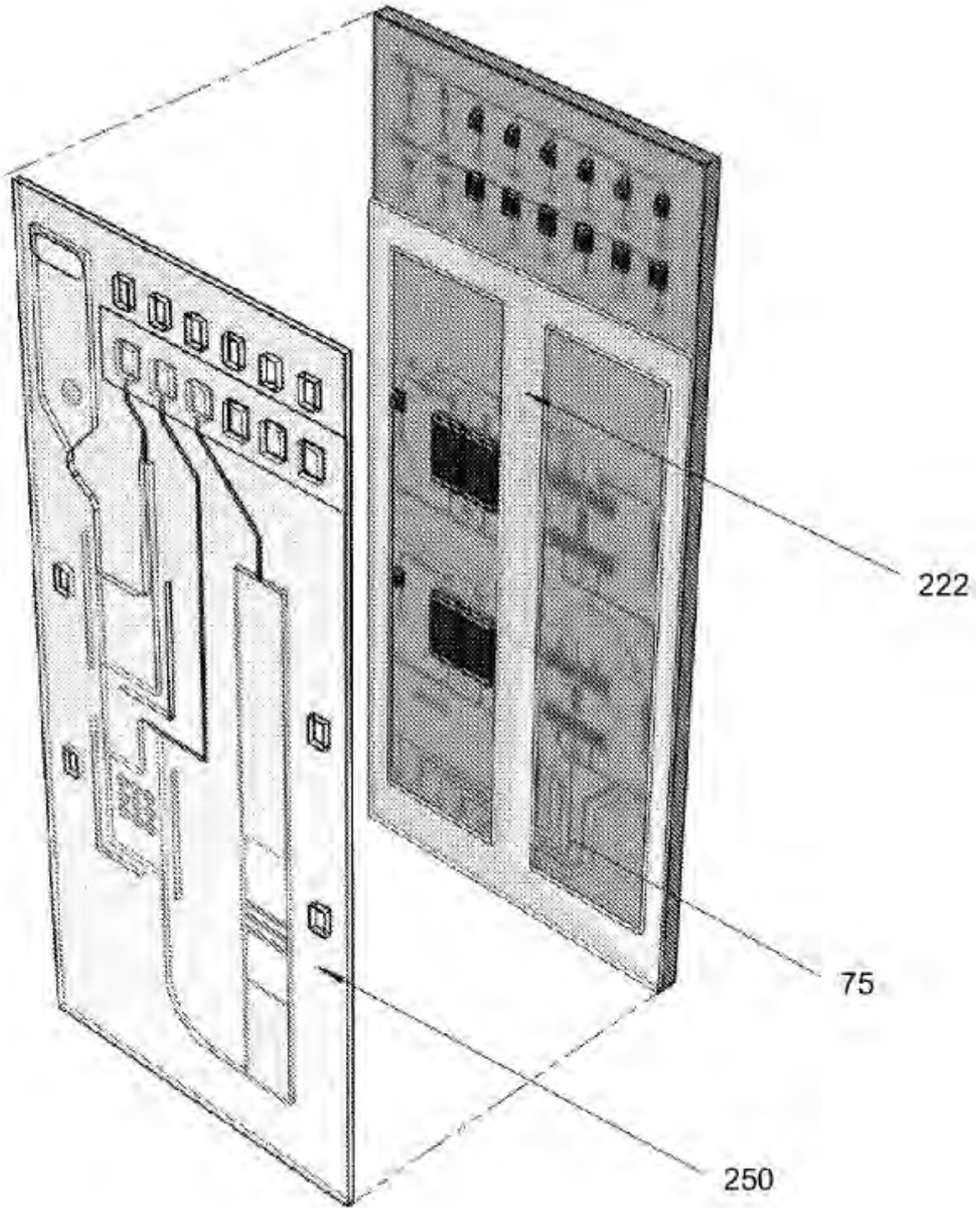


FIG. 9

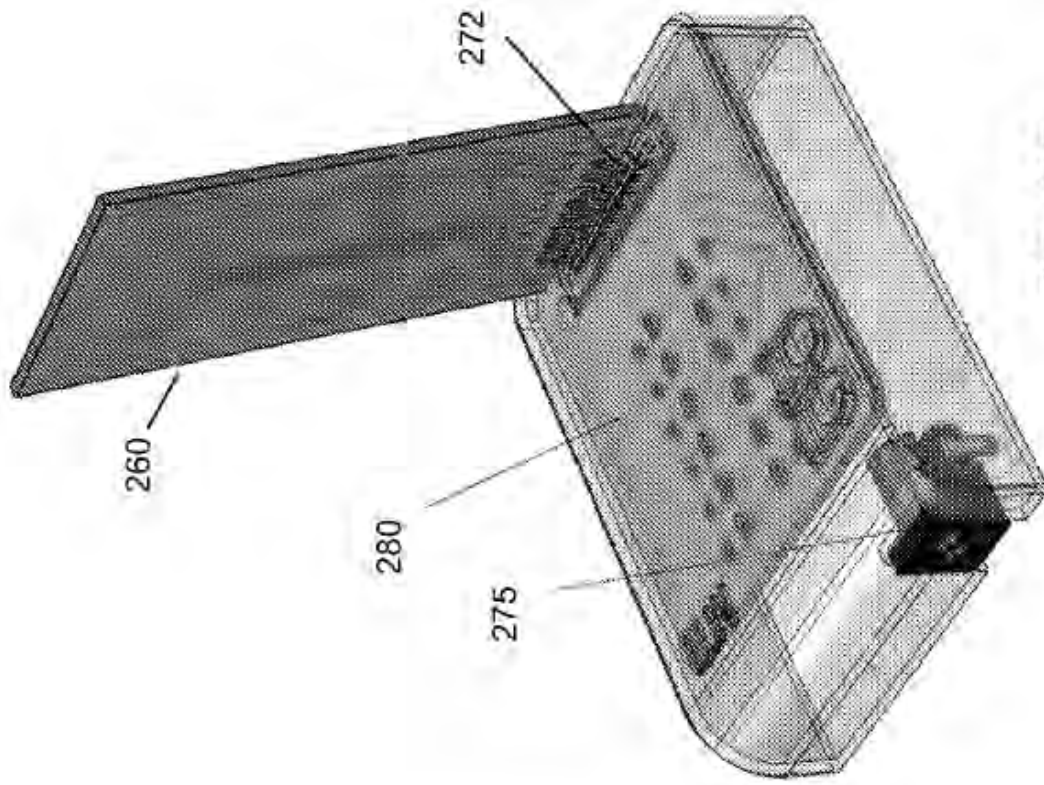


FIG. 10B

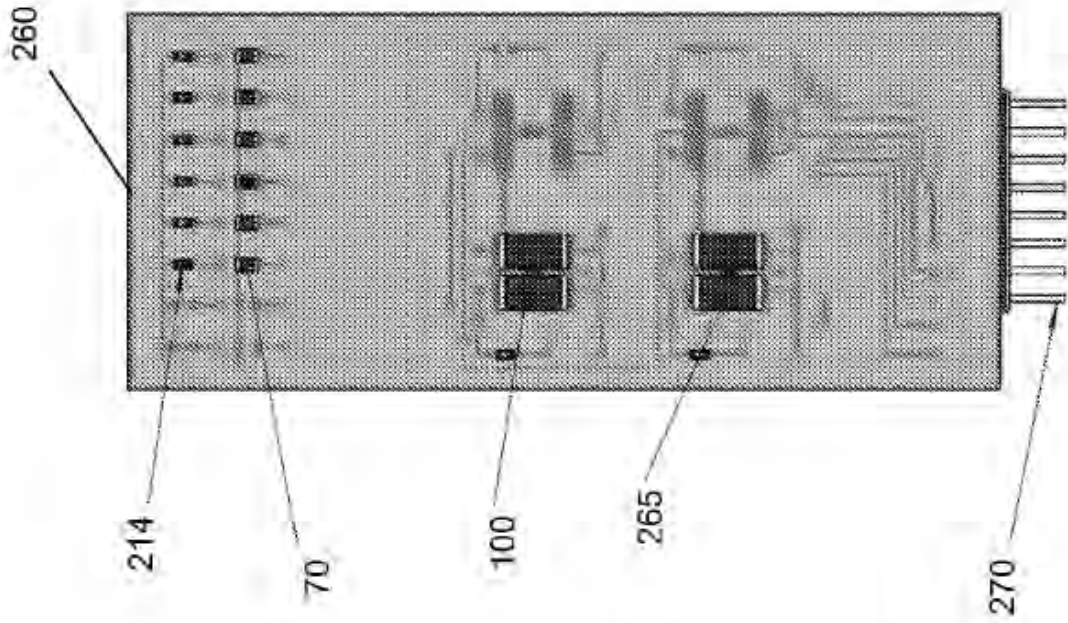
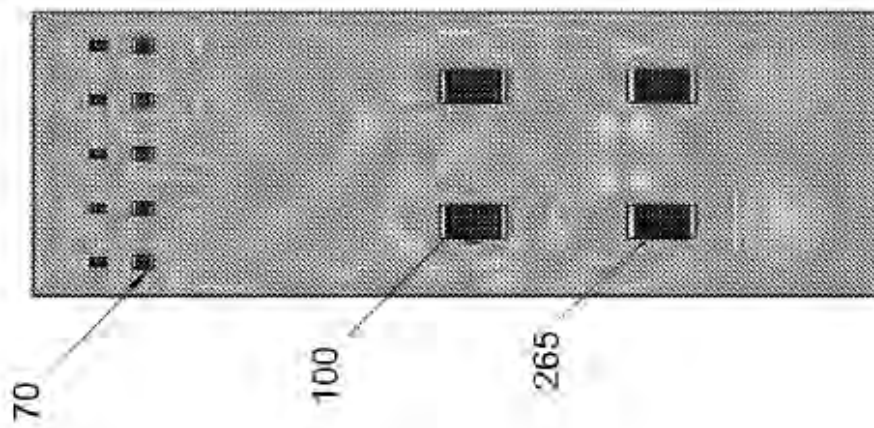
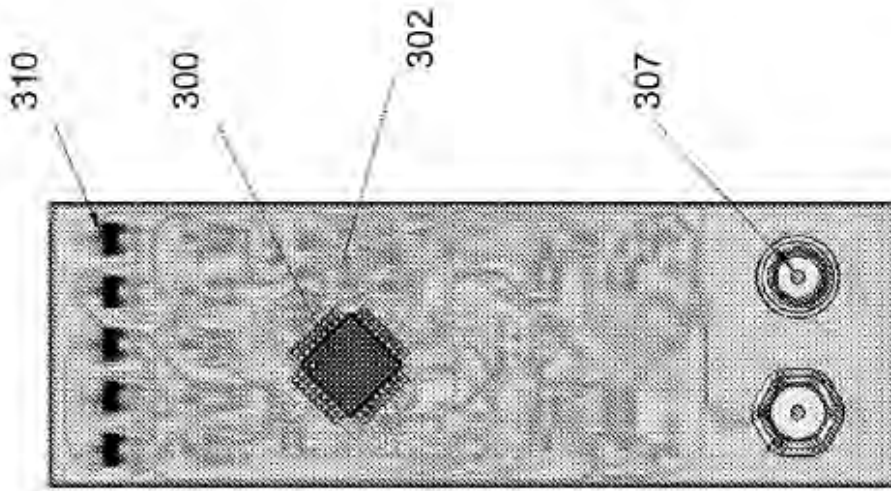


FIG. 10A



ANTERIOR

FIG. 11A



POSTERIOR

FIG. 11B

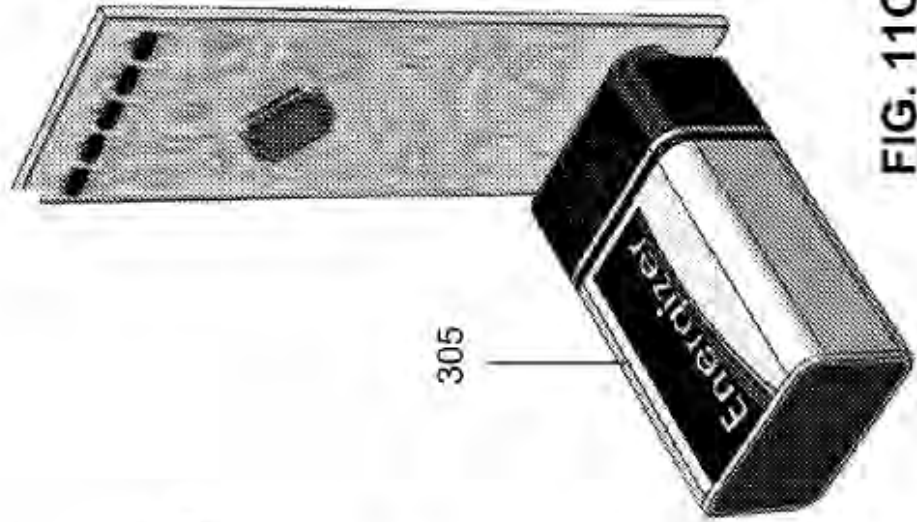


FIG. 11C

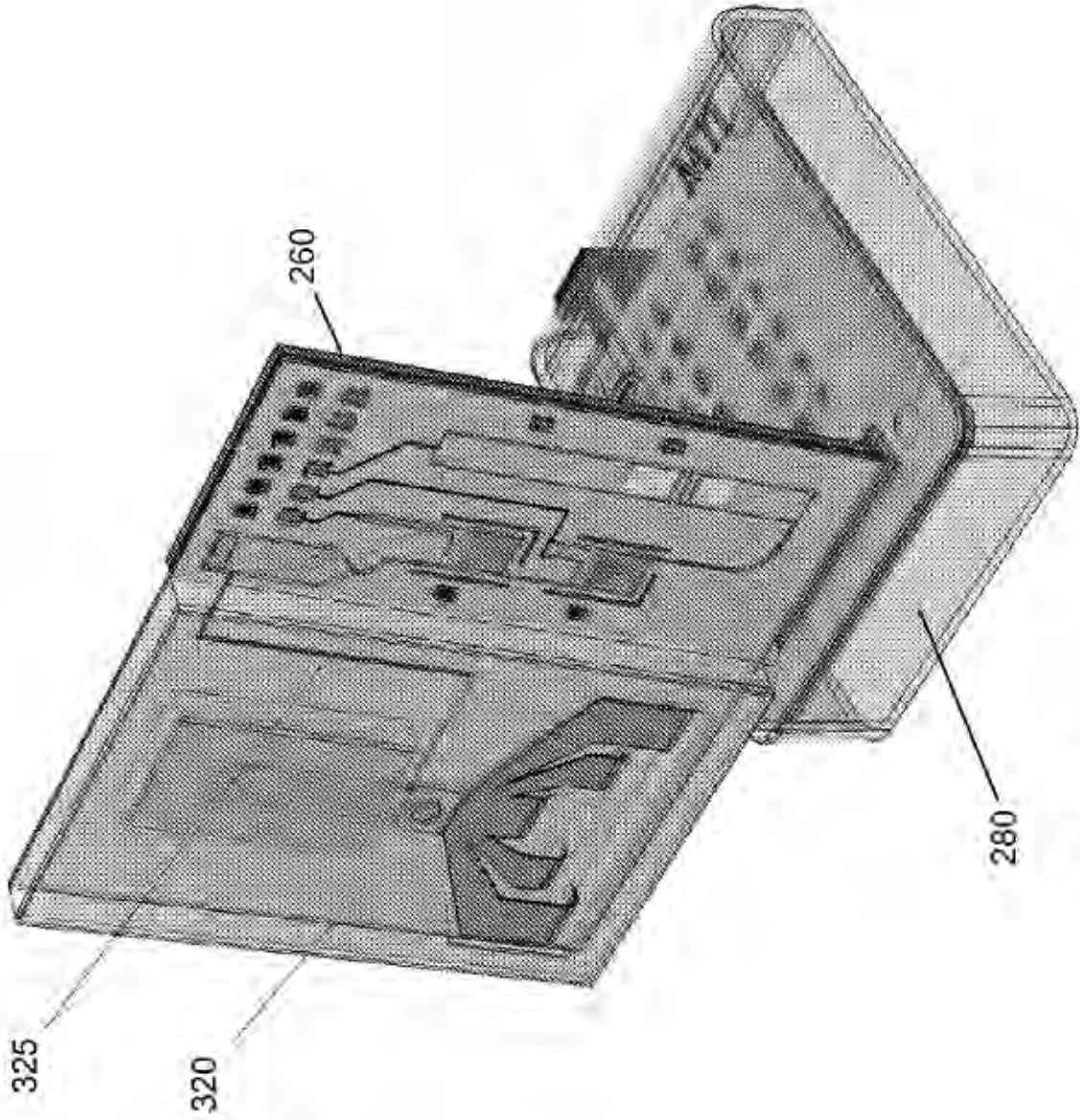


FIG. 12

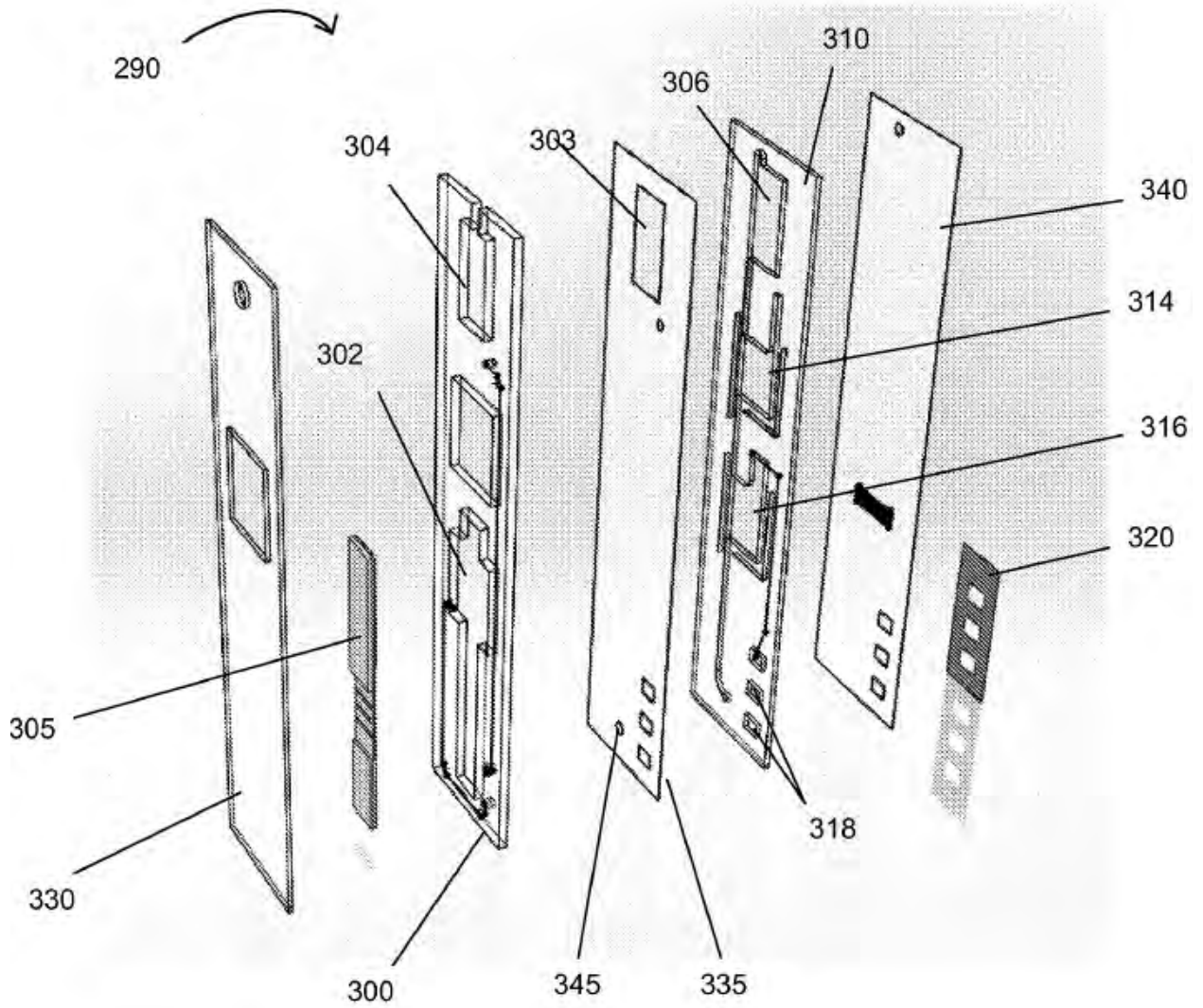


FIG. 13

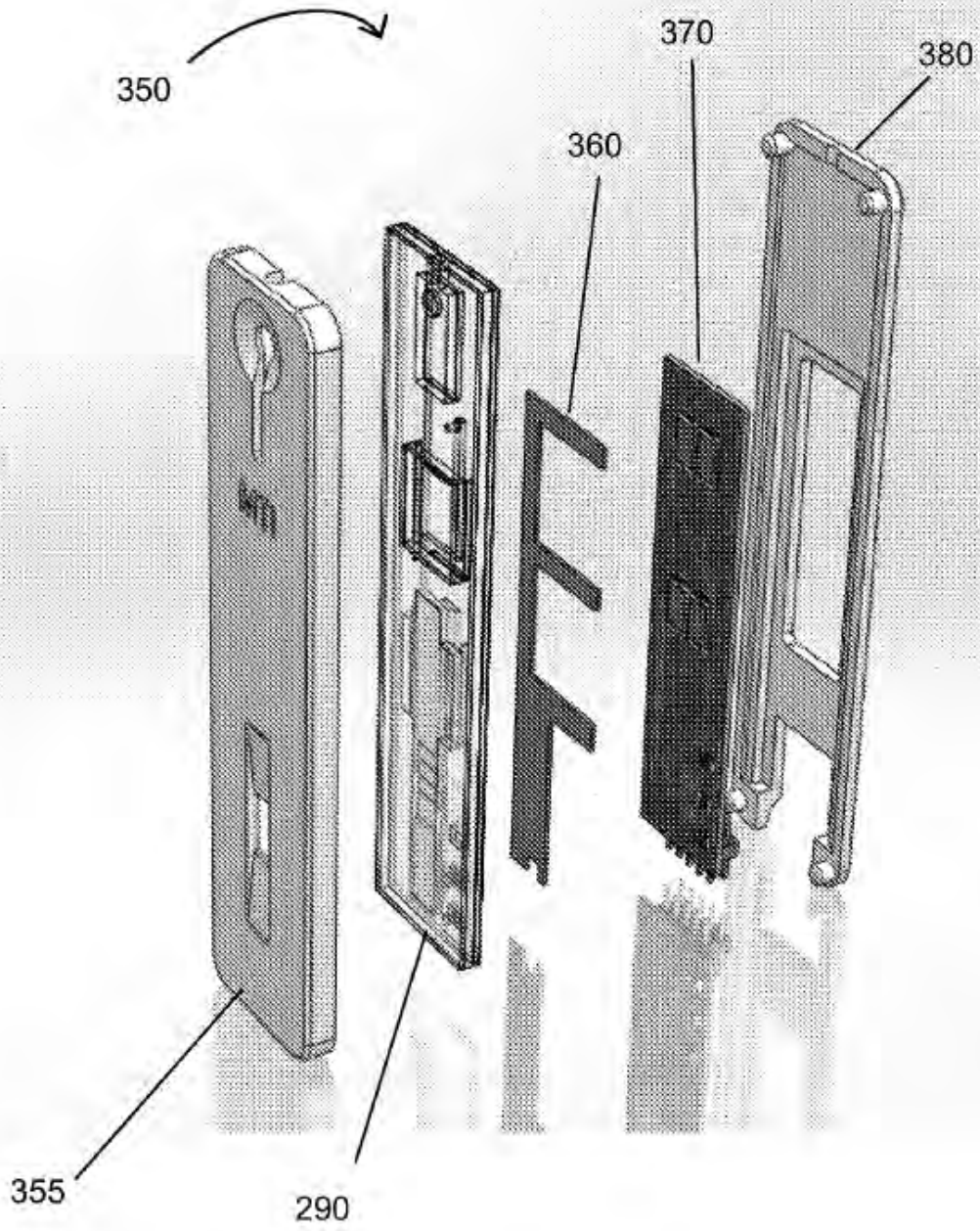


FIG. 14

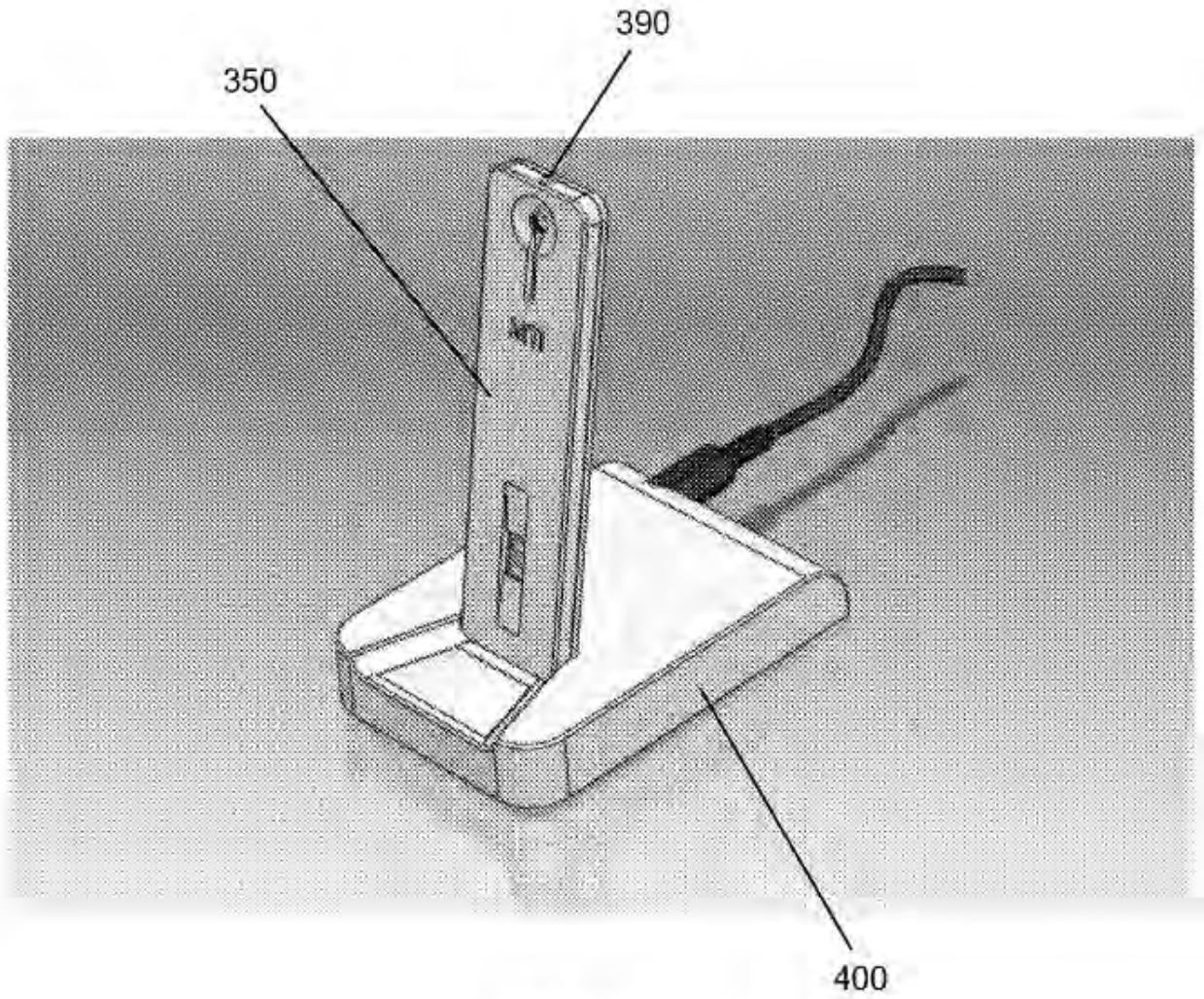


FIG. 15

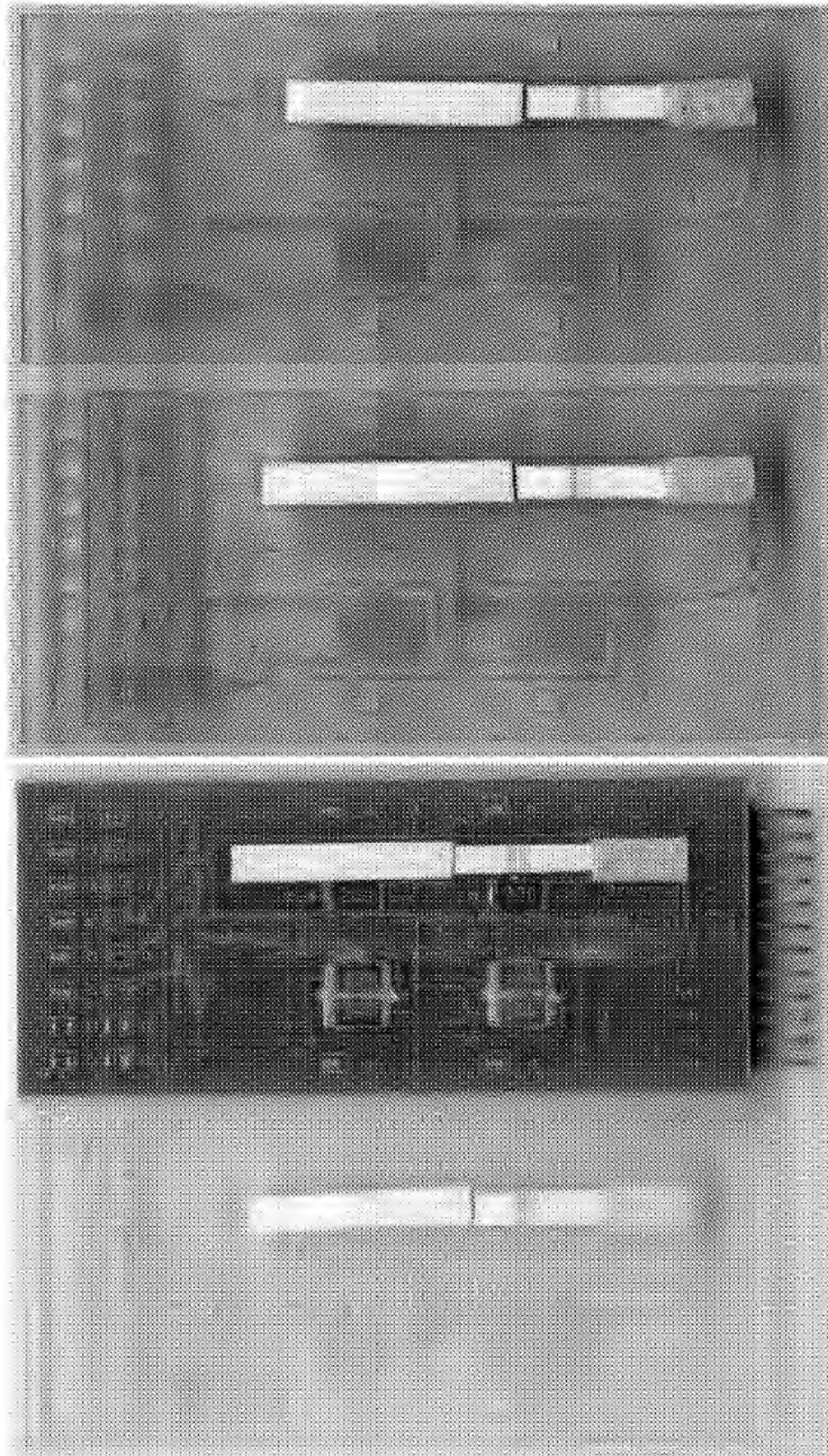


FIG. 16B

FIG. 16A

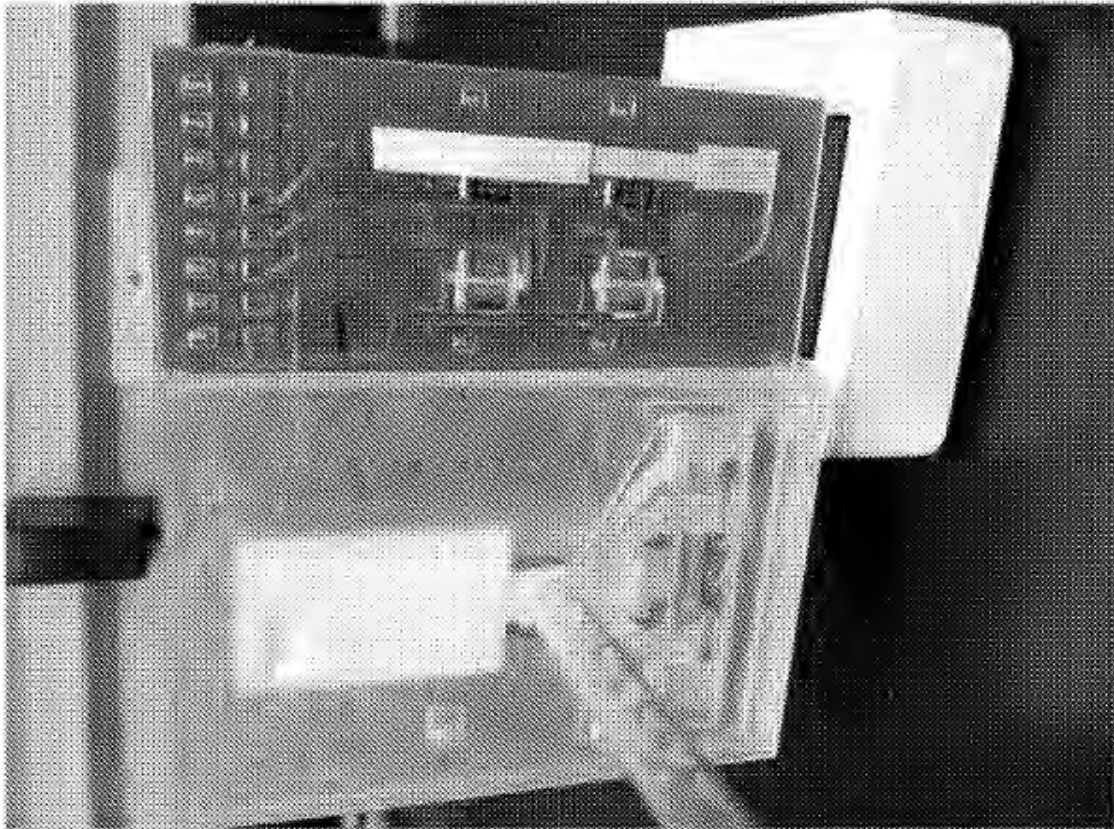


FIG. 17B

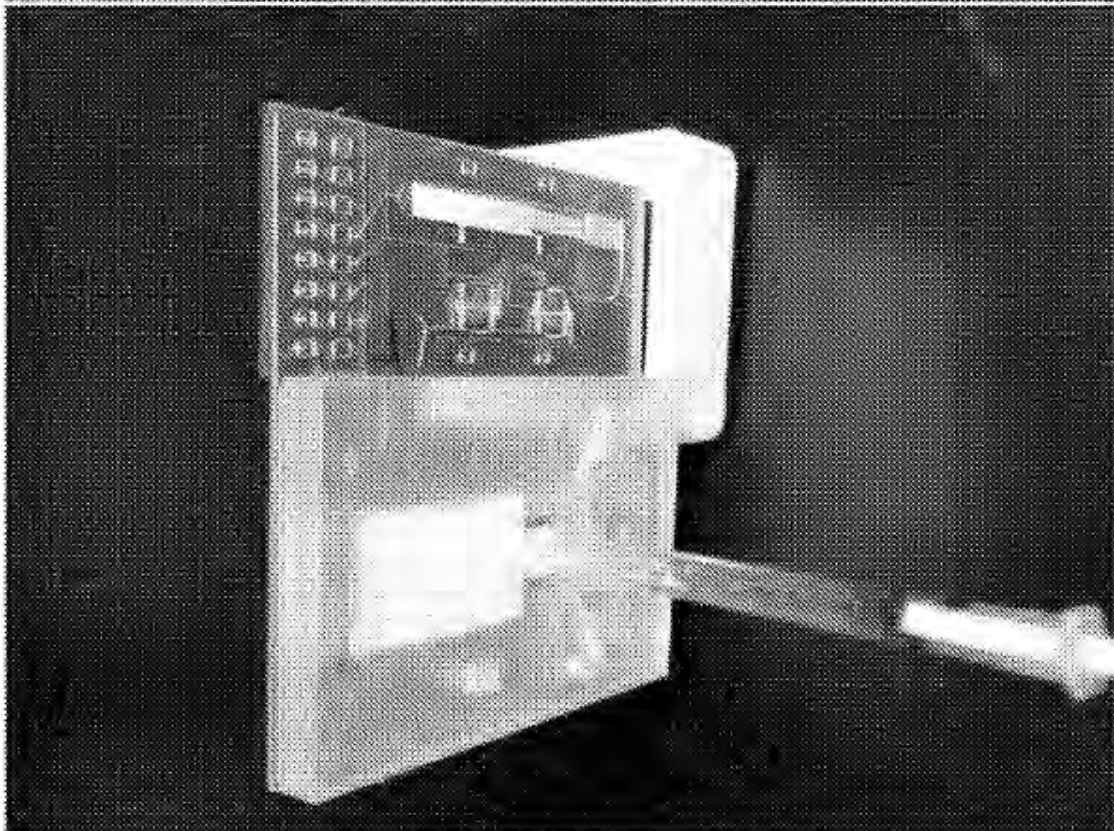


FIG. 17A