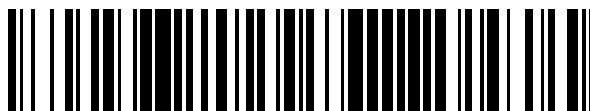


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 650 367**

51 Int. Cl.:

B01L 3/00 (2006.01)

B01L 7/00 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.07.2013 PCT/EP2013/063777**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.01.2014 WO14005969**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.07.2013 E 13734714 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.08.2017 EP 2870260**

54 Título: **Procedimiento y dispositivo para la detección rápida de secuencias nucleotídicas amplificadas**

30 Prioridad:

04.07.2012 BE 201200458

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.01.2018

73 Titular/es:

**CORIS BIOCONCEPT SPRL (100.0%)
Science Park Crealys, Rue Jean Sonet 4A
5032 Gembloux, BE**

72 Inventor/es:

**LECLIPTEUX, THIERRY;
MERTENS, PASCAL;
AVRAIN, LAETITIA;
OTE, ISABELLE y
SMEKENS, VALÉRIE**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 650 367 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

Procedimiento y dispositivo para la detección rápida de secuencias nucleotídicas amplificadas

5 Objeto de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento y a un dispositivo para la detección rápida de secuencias genéticas (amplicones) que provienen de la amplificación (genética) (enzimática) de una secuencia genética original y específica presente en una muestra biológica.

10 El procedimiento está diseñado preferentemente para aplicaciones de diagnóstico sobre unas muestras que comprenden múltiples secuencias genéticas (oligonucleotídicas) diana diferentes, (i) para una detección rápida y eficaz de secuencias nucleicas específicas en una muestra, y una correlación de esta detección para diferentes patologías y enfermedades de un individuo del cual procede la muestra ensayada, en particular de las enfermedades infecciosas, tales como de las bacteriemias, las enfermedades infecciosas respiratorias o entéricas, incluyendo las formas resistentes a unos agentes terapéuticos tales como los antibióticos, (ii) para identificar unas contaminaciones de productos alimenticios, o (iii) para unos ensayos pronósticos, en particular de la presencia eventual de marcadores cancerosos en unas muestras.

20 Estado de la técnica

Entre los procedimientos de amplificación (genética), la PCR (Reacción en Cadena de Polimerasa) es la técnica más utilizada en biología molecular para obtener la amplificación específica de una sola o de varias copias de una secuencia nucleotídica original y específica eventualmente presente en una muestra biológica. Esta técnica, por 25 ciclos sucesivos de amplificación (genética), permite generar millones, incluso millardos de copias de la secuencia original y específica. El método de amplificación por PCR comprende unos ciclos térmicos repetidos de calentamiento y de enfriamiento a varias (dos o tres) temperaturas específicas para la desnaturalización de las secuencias nucleotídicas, la hibridación de los cebadores y la elongación enzimática de las secuencias nucleotídicas a partir de los cebadores hibridados.

30 Este método se realiza gracias a un instrumento programable que calienta y enfría una cámara de reacción estacionaria que contiene las secuencias genéticas diana de la muestra a amplificar por unos ciclos térmicos sucesivos, en particular unos ciclos repetidos y sucesivos de subidas y bajadas de temperatura.

35 La velocidad de la amplificación está limitada por la velocidad de calentamiento y de enfriamiento de los bloques que calientan el instrumento.

A fin de disminuir el tiempo total de las amplificaciones (múltiples) de la PCR, se han propuesto diferentes enfoques. Uno de ellos consiste en realizar una amplificación PCR bajo flujo dinámico continuo.

40 Esta técnica permite un paso de la muestra bajo un flujo constante a través de un (mico) canal que pasa por dos o tres zonas espaciales diferentes, teniendo cada una una temperatura constante.

45 Tal dispositivo se describe en particular en el artículo de Kopp *et al.* (1998, Science 280, 1046-1048). Este dispositivo comprende un canal que pasa repetidamente a través de tres zonas de temperaturas diferentes para la desnaturalización, la hibridación y la elongación. La muestra se introduce en uno de los extremos del canal y se bombea en una dirección hacia el otro extremo del canal en el que la muestra amplificada se recupera para analizarse.

50 La amplificación (genética) en forma miniaturizada y en flujo dinámico continuo (constante) necesita también una detección de las secuencias nucleotídicas amplificadas.

En el artículo de Kopp *et al.*, las muestras amplificadas se analizan por electroforesis sobre gel coloreado con bromuro de etidio en el exterior del dispositivo de amplificación.

55 Al ser la PCR una técnica de amplificación extremadamente sensible, se pueden amplificar también cantidades muy bajas de secuencias nucleotídicas (en particular que provienen de amplificaciones anteriores) aptas para contaminar la muestra, generando unos resultados de falsos positivos. Para eliminar este inconveniente, el enfoque más eficaz consiste en integrar las etapas de amplificación (por PCR) y las etapas de la detección de los productos amplificados en un mismo dispositivo cerrado y desechable (de único uso).

60 Tales dispositivos integrados existen para una detección, por ejemplo por electroforesis capilar o por hibridación sobre micro-tablero. Sin embargo, tales procedimientos y dispositivos de medición y de análisis son generalmente complejos y costosos. Además, la detección sobre estos dispositivos puede perturbarse por la emisión de microburbujas generadas durante la etapa de amplificación (genética) previa.

65

En consecuencia, existe una necesidad de simplificación de estos procedimientos y de dispositivos a fin de simplificar el uso y la eficacia, reducir el coste y aumentar la rapidez de utilización.

Objetivos de la invención

5 La presente invención tiene como objetivo proporcionar un procedimiento y un dispositivo de amplificación (genética), preferentemente por PCR en flujo dinámico continuo, combinados con un procedimiento y un dispositivo de detección que sean simples y poco costosos y que no presenten los inconvenientes del estado de la técnica.

10 Un objetivo particular de la presente invención es proporcionar tal procedimiento y dispositivo que permiten una detección rápida, pero también eficaz, a fin de obtener un resultado de análisis de la presencia de secuencias nucleicas específicas en una muestra, preferentemente un diagnóstico rápido y no alterado de la muestra, y eventualmente una correlación de esta detección con diferentes patologías y enfermedades del individuo del cual procede la muestra, en particular, unas enfermedades infecciosas, tales como las bacteriemias, las enfermedades
15 infecciosas respiratorias o entéricas, incluyendo las formas resistentes a agentes terapéuticos, en particular a los antibióticos.

Resumen de la invención

20 Un primer aspecto de la presente invención se refiere a un método de amplificación, preferentemente por PCR y de detección de al menos una, y/o hasta varias decenas (detección multiplex), secuencias nucleotídicas diana eventualmente presentes en una muestra biológica, preferentemente (i) una muestra extraída de un animal o de un individuo tal como un mamífero, más particularmente de un humano, o (ii) una contaminación de una composición alimenticia, comprendiendo dicho método las etapas consecutivas siguientes:

25 a) proporcionar un dispositivo que comprende:

- un canal que tiene una sección comprendida entre alrededor de 0,01 mm y alrededor de 10 mm,

30 - una tira reactiva en comunicación fluidica con dicho canal, comprendiendo dicha tira reactiva:

- o bien unas primeras (una o varias) sondas complementarias y específicas de al menos una primera parte de secuencia de dicha o de dichas secuencias nucleotídicas dianas amplificadas, o

35 - o bien un reactivo de captura constituido de una primera molécula de un par de moléculas diferentes y complementarias, y apto para fijar específicamente una segunda molécula (diferente) de dicho par (de moléculas diferentes y complementarias), siendo esta segunda molécula fijada (directamente por medio de un cebador que se incorpora en el amplicón durante la amplificación, preferentemente la PCR, o indirectamente por medio de una sonda complementaria) a dicha primera parte de secuencia de dicha o dichas secuencias nucleotídicas diana
40 amplificadas, y preferentemente

- medios para generar al menos cuatro (tres) zonas de temperaturas, preferentemente diferentes y constantes, estando tres (al menos dos) de dichas zonas situadas en sitios diferentes del canal y siendo la cuarta (tercera) zona situada a nivel de la tira reactiva.

45 Estos medios para generar las tres (al menos dos) zonas de temperaturas, preferentemente diferentes y constantes, están situados en sitios diferentes del canal apto para generar unas etapas de amplificación (genética), mientras que la cuarta (tercera) zona situada a nivel de la tira reactiva se mantiene constante a un valor inferior a las tres (al menos dos) otras zonas, para un tratamiento eficaz de la hibridación sobre la membrana (tira reactiva) en flujo capilar (cromatografía capilar).
50

En el procedimiento de la invención antes descrito, se introduce después (según una etapa b)) en el canal del dispositivo, en particular del dispositivo de la invención, una solución que comprende la muestra, así como unos reactivos (compuestos y eventualmente aditivos) para la amplificación (genética), y preferentemente por PCR, y
55 eventualmente una RT-PCR o una MLPA (amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples), de la secuencia nucleotídica diana. Se genera así (según la etapa c)) unas secuencias amplificadas, y eventualmente marcadas, de la o de las secuencias nucleotídicas diana haciendo circular la solución según un flujo (en un fluido) dinámico, preferentemente constante (o continuo) en dicho canal antes de poner en contacto (según la etapa d)) dichas secuencias amplificadas con la tira reactiva, y así generar (según la etapa e)), por hibridación entre las
60 primeras sondas y dichas secuencias amplificadas (y eventualmente unas segundas sondas marcadas, o unos marcadores que intercalan ADN), un complejo que forma una señal de detección medible.

En el método de la invención, las etapas b) a e) se generan en el dispositivo de la etapa a) diseñado de manera cerrada y por lo tanto ventajosamente no (o poco) contaminable por otras secuencias genéticas.

65 Según el método de la invención, las secuencias amplificadas se generan en el canal que comprende múltiples

bucles que pasan sobre las dos (o tres) zonas de temperaturas diferentes, constantes y configuradas para los ciclos múltiples de amplificación (genética), preferentemente por PCR.

5 En consecuencia, en el canal, los múltiples bucles pasan sobre al menos dos (preferentemente dos o tres) zonas de temperaturas diferentes, constantes y configuradas para los ciclos múltiples de amplificación (genética), preferentemente por PCR.

10 Preferentemente, en el método de la invención, la solución se introduce (y empuja) en el canal por una bombajeringa que permite un desplazamiento de la muestra en el canal según un flujo dinámico constante. La solución se puede introducir también y desplazar en flujo dinámico constante en dicho canal por un dispositivo de aspiración. También se puede aplicar un flujo dinámico constante en circuito cerrado con la ayuda de una bomba, tal como una bomba peristáltica (o bomba de rodillos).

15 En el método de la invención, para facilitar la detección, los reactivos para la amplificación (genética), preferentemente por PCR, son en particular unos pares de cebadores de amplificación (genética) que pueden marcarse eventualmente. Según una alternativa a este método, se puede también obtener un marcado de la secuencia amplificada (amplicón) por un intercalante del ADN marcado (fluorescente, por ejemplo).

20 Preferentemente, al menos uno de los cebadores de cada par está marcado.

Preferentemente, el marcador del cebador o de la secuencia amplificada (amplicón) se selecciona entre el grupo constituido por las partículas metálicas, en particular las partículas de oro, las partículas coloidales, las partículas de poliestireno, las partículas coloreadas, las partículas (para)-magnéticas o los elementos fluorescentes.

25 Según una forma de ejecución preferida del método de la invención, el marcador es un marcador fluorescente, tal como la cianina (Cy5) o un marcador que tiene unas propiedades fluorescentes similares.

30 De manera ventajosa, en el método de la invención, la señal de detección está constituida de una o varias líneas formadas por el marcador, o uno o varios puntos formados por el marcador, preferentemente la señal está constituida (de una red) de 4, 6, 8, 9, 10, 12, 14 o 16 puntos, incluso de 32 puntos o más, formados por el marcador y por lo tanto presentes sobre la superficie de la tira reactiva. La elección del número de puntos formados por el marcador sobre la superficie de la tira reactiva se selecciona en función de la resolución de detección y de la facilidad para obtener una fotografía (imagen) del conjunto de los puntos y una discriminación entre los diferentes puntos.

35 El método de la invención puede también poner en contacto una parte de la secuencia de las secuencias nucleotídicas amplificadas, no hibridada con las primeras sondas, con una o varias segundas sondas marcadas a fin de favorecer una detección de tipo sándwich.

40 El método de la invención permite una amplificación y una detección de cualquier tipo de secuencia nucleotídica diana, ya sea monocatenaria, bicatenaria, o parcialmente bicatenaria, o una secuencia de ADNc retro-transcrita a partir de una secuencia de ARN.

45 Según una forma de ejecución preferida de la invención, el método comprende una etapa de MLPA (amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples) o una etapa de RT-PCR.

50 En el método de la invención, la lectura de la señal se correlaciona también preferentemente con la identificación de una o varias infecciones, o contaminación de una composición alimenticia por uno o varios agentes eventualmente patógenos, tal como unas plantas genéticamente modificadas, unas bacterias o unos virus, y/o con la identificación de la resistencia de uno o varios agentes eventualmente patógenos a uno o varios tratamientos terapéuticos, en particular una resistencia a la acción de uno o varios antibióticos cuando el agente eventualmente patógeno es una bacteria.

55 La ventaja del método de la invención es su rapidez, ya que se puede ejecutar rápidamente, en menos de 90 minutos, preferentemente en menos de 60 minutos, incluso en condiciones preferidas en menos de 30 minutos.

60 El método de la invención permite también una amplificación y una detección de secuencias nucleotídicas diana que pueden ser múltiples y diferentes, y presentes simultáneamente en la misma muestra (condiciones multiplex). El número de estas secuencias nucleotídicas puede ser de 5, 10, 15, 20, 25, 50, 100, 200, 400, 600, 800, 1000 o más (de secuencias nucleotídicas diana diferentes).

65 La presente invención se refiere también a un dispositivo de amplificación y de detección (rápida) de al menos una secuencia nucleotídica diana, que comprende los medios para la realización del método de la invención, y que comprende al menos un canal que tiene una sección comprendida entre alrededor de 0,01 mm y 10 mm, una tira reactiva en comunicación fluidica con dicho canal, comprendiendo dicha tira reactiva o bien unas primeras sondas complementarias y específicas de una primera parte de secuencia de las secuencias nucleotídicas diana

amplificadas (a detectar), o bien un reactivo de captura constituido de al menos una primera molécula de un par de moléculas diferentes y complementarias (tales como la estreptavidina/biotina, la avidina/biotina o la poliestreptavidina/biotina), y apta para fijar la segunda molécula de dicho par, fijándose dicha segunda molécula (directamente por medio de un cebador que se incorpora en el amplicón durante la amplificación, preferentemente PCR, o indirectamente por medio de una sonda complementaria) a la primera parte de secuencia de las secuencias nucleotídicas diana amplificadas, estando preferentemente dicho canal y dicha tira reactiva presentes en dos cámaras diferentes.

De manera ventajosa, el dispositivo puede comprender también unos medios para generar al menos cuatro (tres) zonas de temperaturas diferentes y constantes, estando tres (al menos dos) zonas situadas en sitios diferentes del canal y estando la cuarta (tercera) zona situada a nivel de la tira reactiva; pudiendo dicho canal comprender múltiples bucles que pasan sobre las tres (dos) zonas de temperaturas diferentes, constantes y configuradas para los ciclos múltiples de amplificación (genética), preferentemente por PCR. El dispositivo puede también comprender en el extremo del canal una bomba-jeringa que asegura la introducción y el flujo dinámico preferentemente constante (o continuo) de la muestra dentro del canal, o comprender otros medios para asegurar el flujo dinámico preferentemente constante (continuo) de la muestra dentro del canal por aspiración, o en particular una bomba peristáltica (bomba de rodillos), así como medios de tratamiento previo a la muestra por MLPA o RT-PCR u otros tratamientos previos de la muestra.

En el dispositivo de la invención, la tira reactiva comprende unas primeras sondas (y eventualmente unas segundas sondas (eventualmente marcadas)) aptas para generar una señal de detección en forma de líneas o de puntos sobre la superficie de la tira reactiva después de la hibridación de las secuencias nucleotídicas amplificadas. Esta señal de detección puede estar constituida (de una red) de 4, 6, 8, 9, 10, 12, 14 o 16 puntos, incluso de 32 puntos o más.

Otro aspecto de la invención se refiere a un kit de amplificación, preferentemente por PCR, y de detección, que comprende los medios del dispositivo de la invención antes descritos, así como los medios (reactivos) de una amplificación (genética), preferentemente por PCR, y de una detección cromatográfica en tira reactiva. Estos medios son preferentemente unas sondas, preferentemente marcadas, y/o eventualmente unos medios de dilución de muestras, en particular una solución tamponada, así como unos elementos habitualmente utilizados para una amplificación (genética), preferentemente por PCR, en particular unos pares de cebadores (únicos o universales), de la cual se marca eventualmente al menos un cebador de cada par, así como una o varias secuencias de control interno de la eficacia de amplificación (a fin de verificar si un resultado negativo es un verdadero negativo).

Preferentemente, seleccionándose el marcador entre el grupo constituido por las partículas metálicas, en particular las partículas de oro, las partículas coloidales, las partículas coloreadas, las partículas de poliestireno, las partículas para(magnéticas) o los elementos fluorescentes, preferentemente en el kit de la invención, el marcador es un elemento fluorescente, más particular la cianina (Cy5) o un marcador que tiene unas propiedades fluorescentes similares.

La presente invención se describirá más en detalle en la forma de ejecución preferida de la invención en referencia a las figuras anexas.

Breve descripción de las figuras

Las figuras 1 y 2 representan de manera esquemática las características del dispositivo de la invención según un primer modo de realización. El dispositivo comprende una primera parte que comprende unos medios destinados a una amplificación (genética) de secuencias de ácidos nucleicos en flujo dinámico constante, combinada con una segunda parte que comprende unos medios que permiten la detección de las secuencias amplificadas sobre membrana (tira reactiva) por una técnica de oligocromatografía. Las dos partes se unen mediante unos medios de transferencia de secuencias amplificadas, tal como un conducto (tubo) de comunicación fluidica.

La figura 3 representa, de manera esquemática, las características del dispositivo de la invención según un segundo modo de realización en el que las dos partes se unen por medio de un canal integrado en la estructura del dispositivo.

La figura 4 representa, de manera esquemática, las diferentes maneras de disponer los medios de detección sobre la tira reactiva a fin de generar por hibridación (según la etapa e)) un complejo que forma una señal de detección medible.

Descripción detallada de la invención

El dispositivo tal como se representa en la figura 1 comprende unos medios de tratamiento microfluídico de una muestra que permite una amplificación (genética) rápida y específica de secuencias (de ácidos nucleicos), en particular una amplificación de tipo PCR en flujo dinámico constante (o continuo), combinados con medios de detección de estas secuencias nucleotídicas amplificadas (amplicones).

Tal como se representa en la figura 1, el dispositivo de la invención comprende una primera zona o cámara 1 de amplificación (genética) por PCR que comprende los diferentes medios adecuados para efectuar tal amplificación (genética), y una segunda zona o cámara 2 de detección que comprende los diferentes medios adecuados para efectuar tal detección de las secuencias genéticas amplificadas que provienen de la cámara 1.

Ya se conoce por el estado de la técnica un dispositivo tal como se descrito en la cámara 1 y puede comprender diferentes medios para una amplificación (genética) preferentemente por PCR, en microfluídico y preferentemente en flujo dinámico constante.

Estos medios comprenden un canal 3 realizado de vidrio, de cuarzo o de plástico, en particular de policarbonato (Bayer Material Science) o de copolímeros de ciclo-olefinas, y fabricado por moldeo por inyección. Las características de microestructura de este canal se realizan preferentemente mediante un tratamiento clásico de fotolitografía.

La abertura del canal 3 está eventualmente adaptada en la primera parte del dispositivo para facilitar la introducción y el tratamiento previo de la muestra a ensayar y eventualmente se diluye. Tal muestra, preferentemente una solución que comprende la muestra, puede integrarse en el canal 3 mediante diferentes medios conocidos por el experto en la técnica, en particular unas micro-jeringas.

El canal 3 tiene preferentemente una configuración en serpentín cuyas dimensiones pueden variar, pero que comprende un cierto número de bucles aptos para realizar las diferentes etapas necesarias de amplificación (genética), y se pone en contacto con unos medios de calentamiento térmico preciso de zonas de estos bucles. Estos medios pueden consistir en unos dispositivos Peltier o unas resistencias calentadoras o unos bloques calentadores de aluminio y unos sensores adecuados.

El canal 3 tiene preferentemente una longitud comprendida entre aproximadamente 1500 mm y aproximadamente 2000 mm, incluso más, hasta 3000 mm o más, generalmente del orden de 1850 mm, una profundidad de aproximadamente 100 μm y un ancho (diámetro) de aproximadamente 200 μm . El motivo en serpentín con múltiples bucles está previsto con el fin de poder hacer un cierto número de ciclos de amplificación (genética), preferentemente más de 15, 20, 25 o 30, incluso 50 ciclos de amplificación (genética), preferentemente más de 35 ciclos de amplificación (genética), más particularmente más de 40 ciclos de amplificación (genética), preferentemente 41 ciclos de amplificación (genética) en el presente ejemplo.

Estos ciclos de amplificación (genética) pueden también estar precedidos de una etapa de pre-desnaturalización y seguidos por una etapa de elongación final (post-elongación), y el dispositivo de la invención puede también comprender uno o varios depósitos 11 y 12 que permiten contener la muestra a analizar y el o los tampones útiles para unas etapas del procedimiento de la invención, como el tampón de oligocromatografía o de lavado destinado a eliminar los enlaces (hibridaciones) no específicos de las secuencias amplificadas sobre el soporte de detección. Estos depósitos se llenan preferentemente por unas aperturas de tipo "luer", cerradas con tapones. Ventajosamente, el dispositivo comprende también un conducto 13, preferentemente flexible y que forma un bucle y apto para entrar en contacto con un cabezal de bomba, es decir con los elementos (rodillos) de una bomba peristáltica (bomba de rodillos). Este conducto 13 une, por medio de unos conectores de tipo "olive", el depósito 11 destinado a contener la muestra y el depósito 12 que contiene el tampón para asegurar un desplazamiento fluido (flujo dinámico constante) de la muestra y del tampón, mediante la aplicación de dicha bomba, a través del dispositivo de la invención. Otro medio de unión (conducto) 14 permite también unir los medios de detección presentes en la segunda zona o cámara 2 (tira reactiva 4) al depósito 12. Este sistema cerrado tal como se representa en la figura 3 es por lo tanto (poco o) no contaminable ni contaminante.

Preferentemente, el dispositivo microfluídico se realiza de una sola pieza y el canal 3 se pone en contacto (por medio de una comunicación fluidica 10, que permite la transferencia de las secuencias amplificadas hacia la segunda zona o cámara 2) con un medio de detección presente en la segunda zona o cámara 2 del dispositivo de la invención. Preferentemente, el extremo del canal 3 destinado a la amplificación (genética) se une (se pone en contacto con) una tira reactiva 4 que permite una detección de las secuencias genéticas amplificadas mediante un procedimiento denominado oligocromatografía.

Preferentemente, los medios (presentes en una tira reactiva) destinados a una detección por oligocromatografía están dispuestos en una segunda zona o cámara 2 separada de la cámara 1 que comprende el canal 3. Las dos cámaras están en comunicación fluidica de manera que el producto amplificado (la solución que contiene las secuencias amplificadas) puede transferirse directamente a la cámara 2 para su detección en un sistema cerrado y preferentemente no contaminable no contaminante. Esta segunda cámara 2 comprende una tira reactiva 4 que incorpora tres zonas o regiones. Estas tres zonas están constituidas de membranas porosas que permiten una migración por capilaridad de un fluido y de sus componentes (es decir la solución que comprende las secuencias amplificadas) de una parte proximal 5 hacia una parte distal 6. Estas tres zonas o regiones son una región de aplicación 7, una región de detección 8 y una región absorbente 9.

De manera preferida, la membrana de la zona de aplicación 7 está constituida de fibras de vidrio o de otro material

adecuado (poliéster), la membrana de la zona de detección 8 está constituida de nicrocelulosa, y la membrana de la región absorbente 9 está constituida preferentemente de celulosa. Se pueden considerar por el experto en la técnica otros tipos de estructura y de materiales para mejorar las características de migración por capilaridad dentro de la tira reactiva 4 o para mejorar la integración de los elementos destinados a la detección sobre su soporte. El experto en la materia puede, por ejemplo, prever unas estructuras de tiras reactivas 4 en las que la zona de aplicación 7 está presente en la misma membrana que la zona de detección 8 o sin zona o región absorbente 9. Se puede también considerar que la tira reactiva 4 esté totalmente recubierta de nitrocelulosa y eventualmente desprovista de zona absorbente.

Diferentes zonas o regiones pueden comprender diferentes reactivos aptos para facilitar la detección de las diferentes secuencias genéticas amplificadas puestas en contacto con la tira reactiva 4.

Preferentemente, los medios para poner en contacto el canal 3 de amplificación (genética) se realizan sobre la zona de aplicación 7 que comprende los medios de hibridación específica de las secuencias genéticas amplificadas (figura 4). De manera ventajosa e inesperada, esta aplicación (por medio de la comunicación fluidica 10) y el desplazamiento por capilaridad sobre la tira reactiva 4 pueden llevarse a cabo directamente por el flujo de la solución que comprende las secuencias amplificadas, sin la necesidad de adición de un disolvente cualquiera suplementario o de sales específicas de hibridación. Preferentemente, los volúmenes de solución llevados por el canal y depositados sobre la tira reactiva están comprendidos entre aproximadamente 10 μ l y aproximadamente 50 μ l, preferentemente entre aproximadamente 30 μ l y aproximadamente 10 μ l, preferentemente del orden de 20 μ l.

La representación de la detección puede ser una o varias líneas de detección, o uno o varios puntos de detección (o cualquier otra figura, letra, línea, punto o cifra) presentes en la membrana de la zona de detección 8, siendo una línea o un punto de detección específico de una detección de una o varias secuencias nucleotídicas amplificadas que provienen de la amplificación realizada en el canal 3 de amplificación (genética).

De manera ventajosa, los reactivos de detección se colocan sobre el soporte de la tira reactiva según una red a fin de generar las figuras adecuadas fácilmente legibles por un detector, preferentemente una red de 4, 6, 8, 9, 10, 12, 14 o 16 puntos, incluso 32 puntos o más, aptos para comprender al menos uno o dos puntos de control de la detección (al menos un punto de control de amplificación (hibridación específica de la secuencia específica utilizada como control interno) y un control de migración (detección del excedente de las secuencias cebadores (eventualmente marcadas) no utilizadas durante la etapa de amplificación), así como unos puntos de posicionamiento de la tira reactiva).

Los medios de detección presentes en la membrana, en particular en la zona de detección 8, están constituidos de una primera sonda de captura que se hibrida (captura) en unas condiciones específicas, a una parte de secuencia específica de una o varias secuencias nucleotídicas amplificadas (figura 4).

Preferentemente, esta primera sonda de captura está constituida de una secuencia nucleotídica constituida de ácidos nucleicos o de moléculas similares (ADN, ARN, ANP, ANL, ANA, ANH, etc.). Un reactivo puede estar enlazado a la primera sonda de captura a través de un elemento aglutinante, tal como un hapteno, un péptido o cualquier otra molécula susceptible de fijar específicamente dicho reactivo portador.

Preferentemente, la primera sonda de captura se acopla a una primera molécula (primer elemento) de un par (pareja) de moléculas diferentes y complementarias, tal como biotina, a su vez unida sobre nitrocelulosa por medio del elemento complementario del par de moléculas, tal como avidina, estreptavidina, poliestreptavidina o cualquier otra proteína que liga la biotina, utilizado como reactivo de captura.

A nivel de la detección, ésta se genera preferentemente por la excitación (emisión) de un marcador fluorescente que podrá provocar (la emisión de) una o varias señales fluorescentes detectables en forma de líneas o de puntos, o en cualquier otra forma geométrica (cifra, dibujo) sobre la superficie de la tira reactiva 4. Estos se podrán visualizar por medio de la utilización de un detector de fluorescencia. Se seleccionarán otros medios en función del tipo de marcador utilizado (por ejemplo medios de medición del reflectante de sondas marcados con oro).

En una primera forma de ejecución, la detección se hará en dos etapas: una secuencia nucleotídica (específica) diana amplificada se hibridará con una sonda específica complementaria y marcada, presente en la zona de aplicación 7 de la tira reactiva 4, para formar un complejo entre la secuencia diana y su sonda específica marcada, complejo que migrará sobre la membrana hacia la zona de detección 8 en la que reaccionará con la primera sonda de captura fijada en la zona de detección, formando así un complejo de tipo sándwich. En este complejo, una primera parte de la secuencia nucleotídica diana amplificada se hibrida a una primera sonda de captura que permite la inmovilización de la secuencia diana en un sitio preciso de la tira reactiva 4 y una segunda parte de la secuencia nucleotídica diana amplificada se hibrida a una segunda sonda marcada que permite la detección del complejo formado e inmovilizado sobre la tira reactiva 4 (figura 4A). En este momento, el complejo se hará visible y detectable por la acumulación del marcador.

En una segunda forma de ejecución, la detección se hará en una etapa: una secuencia nucleotídica diana

amplificada y marcada (por ejemplo mediante un cebador marcado que se incorpora en el amplicón durante la amplificación, preferentemente la PCR) migrará sobre la membrana de la tira reactiva 4 hacia la zona de detección 8, en la que la secuencia diana marcada reaccionará con la primera sonda de captura fijada en la zona de detección, formando así un complejo. En este complejo, una primera parte de la secuencia nucleotídica diana amplificada se hibrida a una primera sonda de captura permitiendo la inmovilización de la secuencia nucleotídica diana amplificada en un sitio preciso de la tira reactiva 4 (figura 4B). La presencia de un marcador sobre la secuencia diana amplificada permite la detección del complejo formado e inmovilizado sobre la tira reactiva 4.

Después de haber hecho migrar la secuencia nucleotídica diana amplificada y marcada hacia la zona de detección 8, se puede eventualmente hacer migrar una solución tamponada que tiene como objetivo eliminar los cebadores marcados en exceso (que no se han incorporado en las secuencias amplificadas) y que podrían eventualmente interferir con la medición de la señal de detección. La solución tamponada se puede introducir eventualmente (desde un depósito unido a dicho canal 3) en dicho canal 3 algunos segundos después de haber introducido la muestra en este mismo canal y seguir el flujo del líquido que soporta las etapas de amplificación y de detección del procedimiento.

De manera ventajosa, los medios de detección del dispositivo de la invención no se ven perturbados de ninguna manera por la introducción o la formación de burbujas en el flujo dinámico continuo del canal, tras las variaciones térmicas, como podría ser el caso en detección por electroforesis capilar o sobre micro-tableros.

Según una forma de ejecución preferida de la invención, la primera sonda de captura se inmoviliza sobre la tira reactiva 4 en sitios precisos previamente a la ejecución del ensayo de detección de las secuencias nucleotídicas diana (figura 4). Por ejemplo, un reactivo de captura (primera molécula de un par de moléculas diferentes y complementarias) tal como la avidina, estreptavidina o poliestreptavidina, se puede fijar sobre la membrana en cualquier zona de detección 8, y la primera sonda de captura, que comprende la segunda molécula del par de moléculas diferentes y complementarias, tal como biotina, se deposita después sobre la membrana en localizaciones precisas.

La fijación se realiza preferentemente por dilución del reactivo de captura y de la primera sonda de captura en un tampón adecuado, y por depósito de líneas o de puntos sobre la membrana, preferentemente la membrana de nitrocelulosa. Alternativamente, la sonda está o bien fijada previamente sobre una molécula portadora (tal como un par de moléculas (de elementos) complementarias del tipo biotina-avidina, biotina-estreptavidina, anticuerpo anti-biotina, y biotina, etc.) o sobre un soporte no biológico tal como una microesfera blanca (no visible por el sistema de detección) antes del depósito, o bien fijada (químicamente) directamente sobre la membrana de nitrocelulosa.

En el caso de depósito de líneas, la velocidad de distribución del reactivo de captura puede variar entre aproximadamente 50 mm y aproximadamente 10 mm por segundo, pero se fija preferentemente a un valor de aproximadamente 30 mm por segundo.

El volumen de material distribuido puede variar entre aproximadamente 0,5 $\mu\text{l}/\text{cm}$ y aproximadamente 3 $\mu\text{l}/\text{cm}$, pero preferentemente es del orden de aproximadamente 1 $\mu\text{l}/\text{cm}$.

En el caso de depósito de puntos, el volumen de material distribuido puede variar entre 100 nl y 1 nl, pero está fijado preferentemente a un valor de aproximadamente 10 nl.

La concentración de los reactivos de captura puede variar entre aproximadamente 0,01 mg/ml (o una concentración más baja) o aproximadamente 0,1 mg/ml y aproximadamente 5 mg/ml, preferentemente del orden de 1,5 mg/ml.

La concentración de las primeras sondas de captura puede variar entre aproximadamente 50 μM y aproximadamente 1 μM o aproximadamente 1 nM o una concentración más reducida, preferentemente entre aproximadamente 30 μM y aproximadamente 5 μM , más particularmente es del orden de 10 μM .

Según una forma de ejecución preferida de la invención, el tampón utilizado para la fijación consiste en una solución salina (NaCl) tamponada con un fosfato a un pH de aproximadamente 7,2.

Cuando el soporte está constituido de una membrana de nitrocelulosa, la tira reactiva 4 se seca después durante algunos segundos o minutos (dos minutos o más) hasta aproximadamente 72 horas a una temperatura de aproximadamente 50°C, o una temperatura de aproximadamente 60°C o más.

Según una forma de ejecución preferida de la invención, la tira reactiva 4 de oligocromatografía utilizada en el dispositivo de la invención tiene un tamaño de aproximadamente 5 mm y de ancho para una longitud de aproximadamente 57 mm, pero se pueden utilizar otras formas y formatos de tiras reactivas.

En el dispositivo y procedimiento de la invención, las secuencias amplificadas susceptibles de detectarse pueden ser unas secuencias de ADN, en particular unas secuencias de ADN monocatenario o bicatenario o parcialmente

bicatenario, así como unas secuencias de ADNc obtenidas por transcripción inversa de secuencias de ARN.

La etapa de transcripción inversa puede integrarse eventualmente en el procedimiento de la invención dentro de una unidad separada del dispositivo de la invención, por ejemplo en una cámara o un (micro)canal conectado (eventualmente por unas válvulas o unas bombas) al canal 3 en el que tiene lugar la amplificación (genética), preferentemente por PCR.

El procedimiento y el dispositivo de la invención están perfectamente adaptados para la amplificación y la detección de múltiples y diferentes secuencias nucleotídicas presentes en la misma muestra (condiciones múltiplex).

El número de secuencias nucleotídicas diferentes que pueden detectarse en el dispositivo de la invención se puede adaptar según las necesidades que de la aplicación. El procedimiento y el dispositivo de la invención son modulables y permiten adaptar el número de sondas presentes sobre la tira reactiva según el número de secuencias nucleotídicas dianas a detectar.

El número de pares de cebadores (específicos y/o universales) deberá adaptarse al número de secuencias nucleotídicas diana a amplificar.

En un modo de realización preferido, entre aproximadamente 2 secuencias y aproximadamente 50 secuencias nucleotídicas diana, preferentemente entre aproximadamente 5 secuencias y aproximadamente 20 secuencias nucleotídicas diana se amplifican y se detectan en la misma muestra.

Más allá de un cierto número de pares de cebadores específicos presentes en la misma solución de amplificación, la eficacia de la amplificación (PCR) disminuye.

A fin de aumentar el número de secuencias nucleotídicas dianas que se pueden detectar en una misma muestra, es posible utilizar la técnica de MLPA (amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples). La MLPA es una variante de la PCR múltiplex y permite amplificar múltiples secuencias nucleotídicas diana con un par de cebadores universales. La amplificación, preferentemente por PCR, está precedida de una etapa de ligación. Cada secuencia nucleotídica a amplificar se hibrida a un par de oligonucleótidos que reconocen dos sitios (partes o porciones) adyacentes de la secuencia nucleotídica diana. Cada oligonucleótido del par comprende además una secuencia universal que es complementaria de uno de los cebadores. Así, una vez que los pares de oligonucleótidos se hibridan a su secuencia nucleotídica diana, éstas pueden ser ligadas entre sí mediante una ligasa. Los oligonucleótidos ligados son después amplificados por un par de cebadores universales.

La etapa de ligación puede integrarse eventualmente en el procedimiento de la invención y efectuada dentro de una unidad separada del dispositivo de la invención, por ejemplo en una cámara o un (micro)canal conectado al canal 3 en el que tiene lugar la amplificación (genética), preferentemente por PCR, con un par de cebadores universales.

En un modo de realización que utiliza la MLPA, entre 20 secuencias y 1000 secuencias nucleotídicas diana se amplifican y se detectan en la misma muestra.

La muestra es preferentemente una solución acuosa que contiene el ADN purificado así como otros componentes susceptibles de ser utilizados en el dispositivo de amplificación bajo flujo dinámico constante.

Estos diferentes compuestos se introducen preferentemente en el canal 3 al mismo tiempo que la o las muestras o eventualmente por otros (micro)canales o depósito puestas en contacto con el canal 3.

Estos otros componentes son unos reactivos aptos para realizar esta amplificación (genética), preferentemente una amplificación (genética) por PCR, en particular una ADN polimerasa, apta para obtener una polimerización del ADN en un tampón adecuado, eventualmente suplementada por la adición de otros compuestos (reactivos) tales como cloruro de magnesio, cebadores, en particular unos pares de cebadores adecuados (específicos o universales) para la amplificación (genética), de DNTPs seleccionados en función del tipo de amplificación (genética), preferentemente por PCR, requerida y del tipo de secuencia(s) genética(s) a detectar.

También se pueden añadir a la solución de reacción otros componentes tales como unos agentes de bloqueo (saturación) de superficie, preferentemente albúmina sérica (albúmina de suero bovino, BSA) y polietilenglicol (PEG) como agentes bloqueantes, o unos estabilizantes, así como unos aceleradores de reacción (reaction enhancers).

La elección de las secuencias nucleotídicas utilizadas como cebadores (específicos o universales) para la amplificación (genética), preferentemente por PCR, se realiza en función del tipo de secuencia(s) nucleotídica(s) a amplificar y a detectar. La selección de estos cebadores está al alcance del experto en la técnica, así como su marcado eventual por unos elementos como unas partículas metálicas, preferentemente unas partículas de oro, unos coloides o unos elementos fluorescentes.

Preferentemente, el marcador es un marcador fluorescente, preferentemente constituido de cianina (Cy5) o de un

marcador que tiene unas propiedades fluorescentes similares.

El marcado puede también ser indirecto, poniendo en contacto las secuencias amplificadas no marcadas con unas segundas sondas marcadas y complementarias en una parte (o porción) de la secuencia amplificada no hibridada a las primeras sondas de captura (detección sándwich).

Se pueden utilizar también los marcadores que presentan diferentes tipos de coloración para el marcado de diferentes secuencias de cebadores a fin de obtener una amplificación de las secuencias de ADN en forma multiplex y a fin de facilitar su detección simultánea o consecutiva sobre las tiras reactivas 4.

Cada color es específico de una secuencia o de un grupo de secuencias genéticas amplificadas y presentes inicialmente en la muestra ensayada, y su detección colorimétrica se puede obtener mediante medios conocidos por el experto en la técnica.

El dispositivo de la invención comprende también los elementos aptos para medir la señal, en particular una señal fluorescente constituida de uno o varios puntos o líneas formados por el marcador (fluorescente) sobre la tira reactiva 4, en particular un detector de señal, en particular un detector de señal fluorescente.

Preferentemente, una fuente de luz genera un haz de luz para excitar la fluorescencia del marcador. La detección debe ajustarse con el fin de obtener la misma eficacia de detección sobre la superficie de la tira reactiva 4 que comprende el conjunto de los puntos o de las líneas a analizar. Un detector utilizado en este contexto es una cámara CCD capaz de tomar una foto del conjunto de los puntos o de las líneas (o cualquier otra figura, dibujo, letra o cifra).

Además de la unidad de detección, el dispositivo de la invención comprende otros elementos aptos para facilitar esta amplificación (genética), preferentemente por PCR, y esta detección, en particular una unidad de calentamiento (por ejemplo una resistencia calentadora o unos bloques de aluminio) de la superficie del dispositivo microfluídico. Este dispositivo de calentamiento está diseñado con el fin de obtener una reacción de amplificación (genética), preferentemente por PCR, y una detección por tratamiento térmico de las partes adecuadas del dispositivo microfluídico.

Por ejemplo, las cámaras 1 y 2 del dispositivo de la invención reposan en cuatro (al menos tres) bloques calentadores cuya temperatura está controlada, independientemente el uno del otro. Tres (al menos dos) bloques sirven para regular la temperatura de la amplificación (genética), preferentemente por PCR, y están situados por debajo de la cámara 1 en diferentes zonas del canal 3, y el cuarto (tercero) bloque está situado por debajo de la cámara 2 a nivel de la tira reactiva 4.

Para que la amplificación (genética), preferentemente por PCR, se efectúe con un alto rendimiento, es importante que la transición de una zona de temperatura a otra esté bien definida. Para ello, los bloques calentadores están separados el uno del otro por un espacio de aproximadamente 1 mm a aproximadamente 2 mm.

La unidad de calentamiento puede también comprender una tapa o cualquier otro dispositivo a fin de limitar las pérdidas de calor.

El canal 3 comprende diferentes porciones llevadas (tratadas) a diferentes temperaturas a fin de facilitar la amplificación (genética), preferentemente por PCR, mientras que la cámara de detección 2 se mantiene a una temperatura adecuada única.

De manera preferida, las temperaturas pueden variar entre aproximadamente 100°C y aproximadamente 90°C (preferentemente aproximadamente 98°C), y aproximadamente 50°C y aproximadamente 80°C (preferentemente aproximadamente 57°C) en la zona o cámara de amplificación 1, mientras que la zona o cámara de detección 2 se mantiene a una temperatura comprendida entre aproximadamente 40°C y aproximadamente 60°C (preferentemente aproximadamente 41°C).

La unidad de detección y la unidad de calentamiento se pueden integrar en un mismo dispositivo, o estar por el contrario separadas según las necesidades del usuario. Dado que la amplificación (genética), preferentemente por PCR, necesita un tiempo más largo que la medición de la señal, puede ser ventajoso separar las dos unidades.

Las diferentes cámaras o zonas 1 y 2 se unen mediante elementos adecuados, en particular unos sistemas de conductos (tubos) estándar, preferentemente de polietileno o de silicona, o por medio de un sistema de bombeo que comprende preferentemente unos medios tales como unas bombas, unas jeringas, unas válvulas, etc. Una bomba-jeringa se puede utilizar, por ejemplo, para asegurar un bombeo de la muestra (a temperatura constante y controlada) a fin de permitir también un flujo constante a través del canal 3.

Este sistema de bomba-jeringa comprenderá preferentemente un diámetro interno comprendido entre aproximadamente 6 mm y aproximadamente 30 mm, una velocidad de bombeo comprendida entre aproximadamente 0,012 mm y aproximadamente 6 mm por segundo, para un volumen de bombeo mínimo del orden

de 0,3 μ l por minuto.

Un flujo constante en el interior del dispositivo puede asegurarse también por una bomba peristáltica (bomba de rodillos) en circuito cerrado, pero cuya velocidad puede ser variable.

5 El procedimiento de la invención se realiza de una manera muy rápida en menos de 90 minutos, preferentemente en menos de 60 minutos e incluso en menos de 30 minutos. La amplificación (genética), preferentemente por PCR, se efectúa en menos de 60 minutos y preferentemente en menos de 30 minutos, y la detección sobre la tira reactiva en
10 menos de 15 minutos, preferentemente en menos de 5 minutos (detección y revelación incluidas).

REIVINDICACIONES

1. Un método de amplificación por PCR y de detección de al menos una secuencia nucleotídica diana eventualmente presente en una muestra biológica, preferentemente una muestra extraída de un individuo, comprendiendo dicho método las etapas consecutivas siguientes:
 - a) proporcionar un dispositivo que comprende:
 - un canal (3) que tiene una sección comprendida entre alrededor de 0,01 mm y alrededor de 10 mm,
 - una tira reactiva (4) en comunicación fluidica con dicho canal (3), comprendiendo dicha tira reactiva (4) o bien unas primeras sondas complementarias y específicas de al menos una primera parte de secuencia de dicha o de dichas secuencias nucleotídicas diana amplificadas, o bien al menos una primera molécula de un par de moléculas diferentes y complementarias, apta para fijar una segunda molécula diferente de dicho par, estando dicha segunda molécula fijada a la primera parte de secuencia de la o las secuencias nucleotídicas diana amplificadas;
 - medios para generar al menos tres zonas de temperaturas diferentes y constantes, estando dos (al menos tres) zonas situadas en sitios diferentes del canal (3) y estando la tercera (o cuarta) zona situada a nivel de la tira reactiva (4),
 - b) introducir en el canal (3) una solución que comprende la muestra, así como los reactivos de amplificación de la o de las secuencias nucleotídicas diana,
 - c) generar unas secuencias amplificadas y eventualmente marcadas de la o de las secuencias nucleotídicas diana haciendo circular la solución según un flujo dinámico constante en el canal (3),
 - d) poner en contacto dichas secuencias amplificadas con la tira reactiva (4), y
 - e) generar, por hibridación entre las primeras sondas y dichas secuencias amplificadas, un complejo que forma una señal de detección medible.
2. El método según la reivindicación 1, en el que las etapas b) y e) se generan en el dispositivo de la etapa a) diseñado de manera cerrada.
3. El método según la reivindicación 1 o 2, caracterizado por que las secuencias amplificadas se generan en el canal (3) que comprende múltiples bucles que pasan sobre dos o tres zonas de temperaturas diferentes, constantes y configuradas para los ciclos múltiples de amplificación.
4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 4, en el que la solución se introduce en el canal (3) mediante una bomba-jeringa que permite un desplazamiento de la muestra en el canal (3) según un flujo dinámico constante, en la que la solución se introduce y se desplaza en flujo dinámico constante en el canal (3) por un dispositivo de aspiración o en la que la solución se desplaza en flujo dinámico constante por una bomba peristáltica (bomba de rodillos).
5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que los reactivos de amplificación comprenden uno o varios pares de cebadores y por que al menos uno de los cebadores de cada par está marcado, seleccionándose dicho marcador del cebador preferentemente entre el grupo constituido por las partículas metálicas, en particular las partículas de oro, las partículas coloidales, las partículas coloreadas o (para)magnéticas, las partículas de poliestireno o los elementos fluorescentes, preferentemente el marcador fluorescente es la cianina (Cy5) o un marcador que tiene unas propiedades fluorescentes similares, y por que la señal de detección está preferentemente constituida de una o varias líneas o puntos formados por el marcador o por que la señal de detección está constituida de 4, 6, 8, 9, 10, 12, 14, 16 o 32 puntos formados por el marcador.
6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que se pone en contacto una parte de la secuencia de las secuencias nucleotídicas amplificadas, no hibridada con las primeras sondas, con una o varias segundas sondas marcadas, y por que la secuencia nucleotídica diana es monocatenaria, bicatenaria, parcialmente bicatenaria, o una secuencia de ADNc retrotranscrita a partir de una secuencia de ARN.
7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que comprende previamente a, e incluso en la etapa b), una reacción de MLPA (amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples).
8. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la lectura de la señal se correlaciona con la identificación de una o varias infecciones por uno o varios agentes patógenos, y/o a la identificación de la resistencia de uno o varios agentes patógenos a uno o varios tratamientos terapéuticos y el agente patógeno es preferentemente una bacteria, y la resistencia es preferentemente una resistencia a uno o varios antibióticos, o en la que la lectura de la señal se correlaciona con la identificación de una contaminación de un producto alimenticio.

9. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para la amplificación y la detección de múltiples y diferentes secuencias nucleotídicas presentes en la misma muestra (condiciones multiplex).
- 5 10. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el par de moléculas diferentes y complementarios se selecciona entre el grupo constituido por estreptavidina/biotina, avidina/biotina, poliestreptavidina/biotina o un anticuerpo anti-biotina/biotina.
- 10 11. Un dispositivo de amplificación y de detección rápida de al menos una secuencia nucleotídica diana que comprende los medios para la realización del método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores y que comprende:
- un canal (3) que tiene una sección comprendida entre 0,01 mm y 10 mm,
- 15 - una tira reactiva (4) en comunicación fluidica con el canal (3), comprendiendo dicha tira reactiva (4) o bien unas primeras sondas complementarias y específicas de una primera parte de secuencia de las secuencias nucleotídicas diana amplificadas, o bien al menos una primera molécula de un par de moléculas diferentes y complementarias, y apta para fijar una segunda molécula diferente de dicho par, estando dicha segunda molécula fijada a la primera parte de secuencia de las secuencias nucleotídicas diana amplificadas,
- 20 y en el que el canal (3) comprende múltiples bucles que pasan sobre al menos dichas dos o tres zonas de temperaturas diferentes, constantes y configuradas para los ciclos múltiples de amplificación (genética) por PCR.
- 25 12. El dispositivo según la reivindicación 11 que comprende unos medios para generar al menos cuatro zonas de temperaturas diferentes y constantes, estando tres zonas situadas en sitios diferentes del canal (3) y estando la cuarta situada a nivel de la tira reactiva (4).
- 30 13. El dispositivo según la reivindicación 11 o 12, que comprende sobre el extremo del canal (3) una bomba-jeringa que asegura la introducción y el flujo dinámico constante de la muestra dentro del canal (3).
- 35 14. El dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, caracterizado por que la tira reactiva (4) comprende unas primeras sondas y eventualmente unas segundas sondas aptas para generar una señal de detección en forma de línea(s) o de punto(s) sobre la superficie de la tira reactiva (4) después de la hibridación de las secuencias nucleotídicas amplificadas.
- 40 15. Un kit de amplificación por PCR y de detección de al menos una secuencia nucleotídica diana, que comprende el dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores 11 a 14, y los medios y reactivos de una amplificación genética por PCR y de una detección oligocromatográfica sobre tira reactiva (4), preferentemente unos cebadores eventualmente marcados, eventualmente unas sondas marcadas y/o eventualmente unos medios de dilución de la muestra, en particular una solución tamponada, y por que el marcador se selecciona entre el grupo constituido por las partículas metálicas, las partículas de poliestireno, las partículas coloreadas o (para)magnéticas, las partículas coloidales o los elementos fluorescentes, preferentemente la cianina (Cy5) o un marcador que tiene unas propiedades fluorescentes similares, y en la que el par de moléculas diferentes y complementarias se selecciona del grupo constituido por la estreptavidina/biotina, la avidina/biotina, la poliestreptavidina/biotina o un anticuerpo anti-biotina/biotina.
- 45

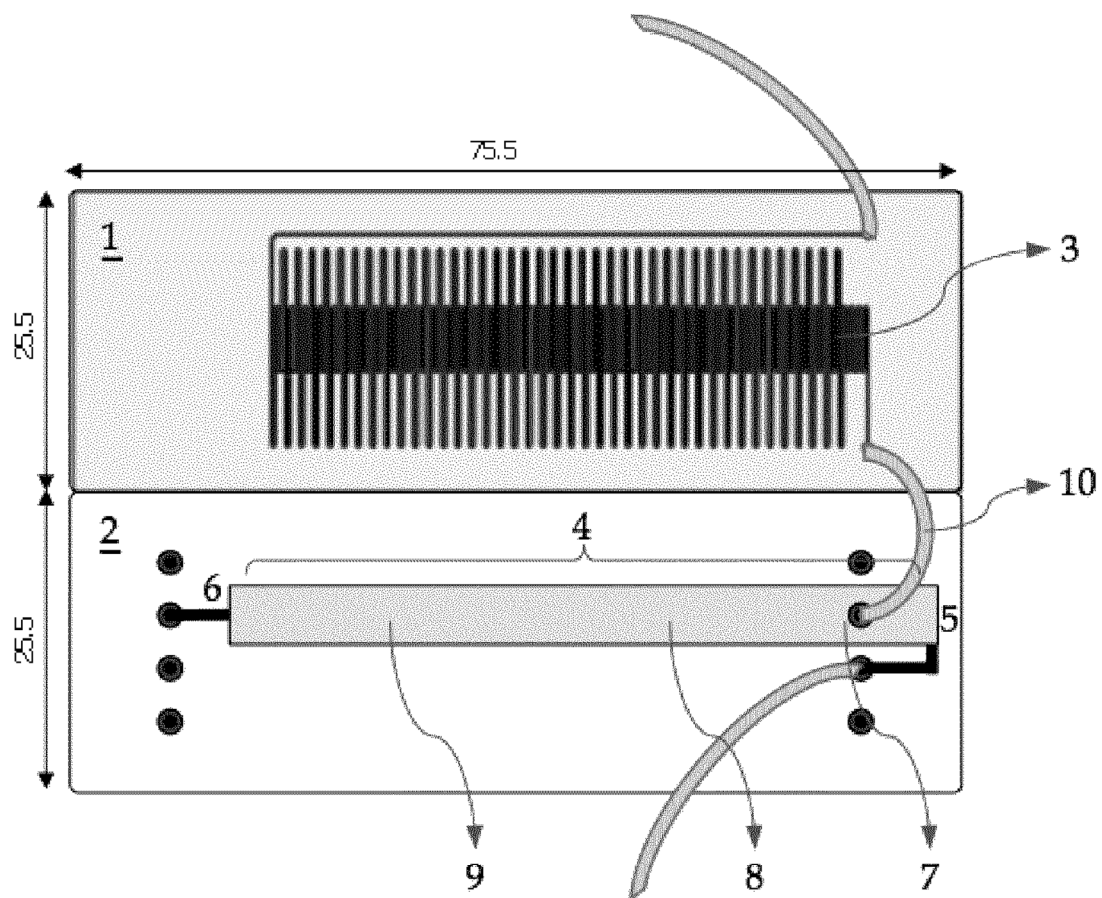


Fig. 1

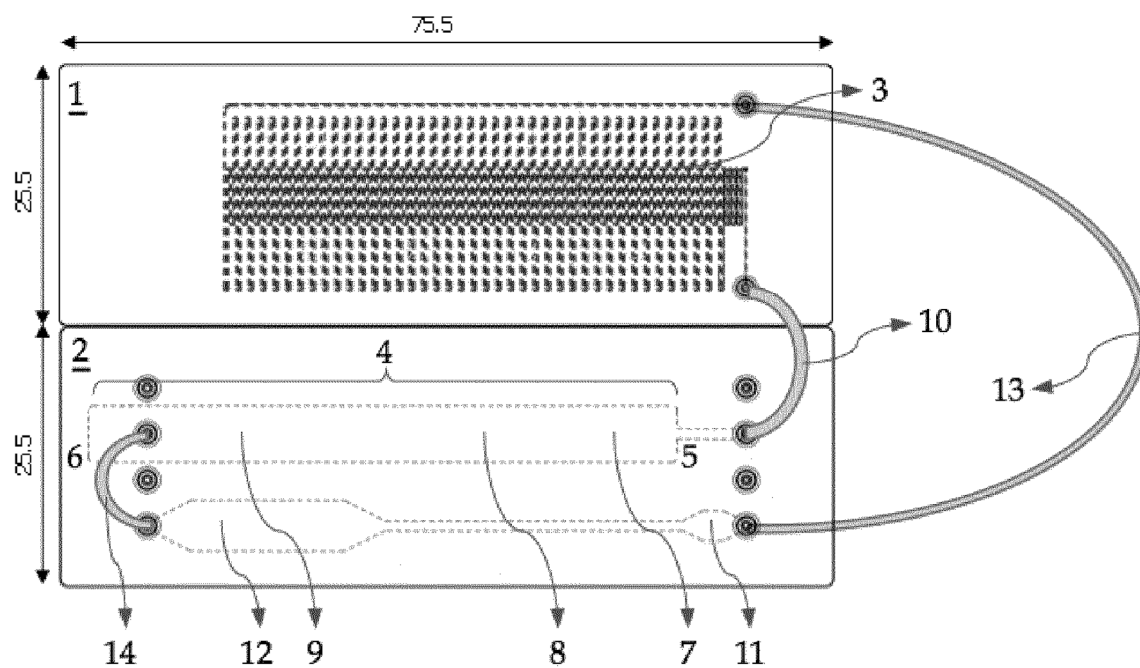


Fig. 2

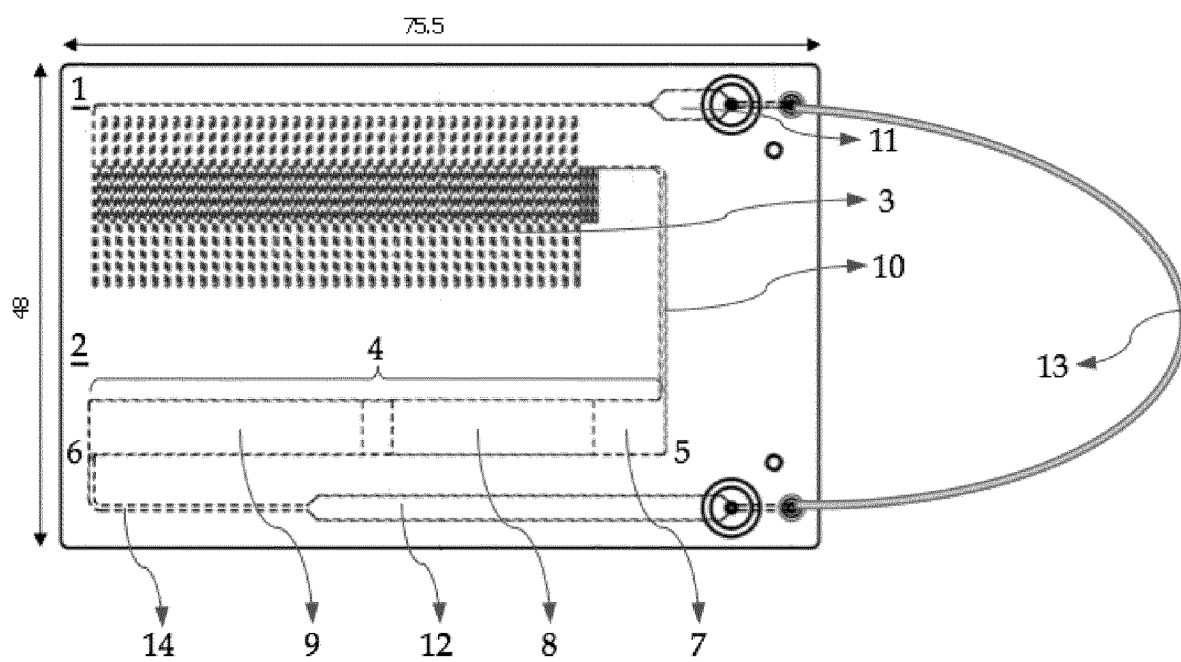


Fig. 3

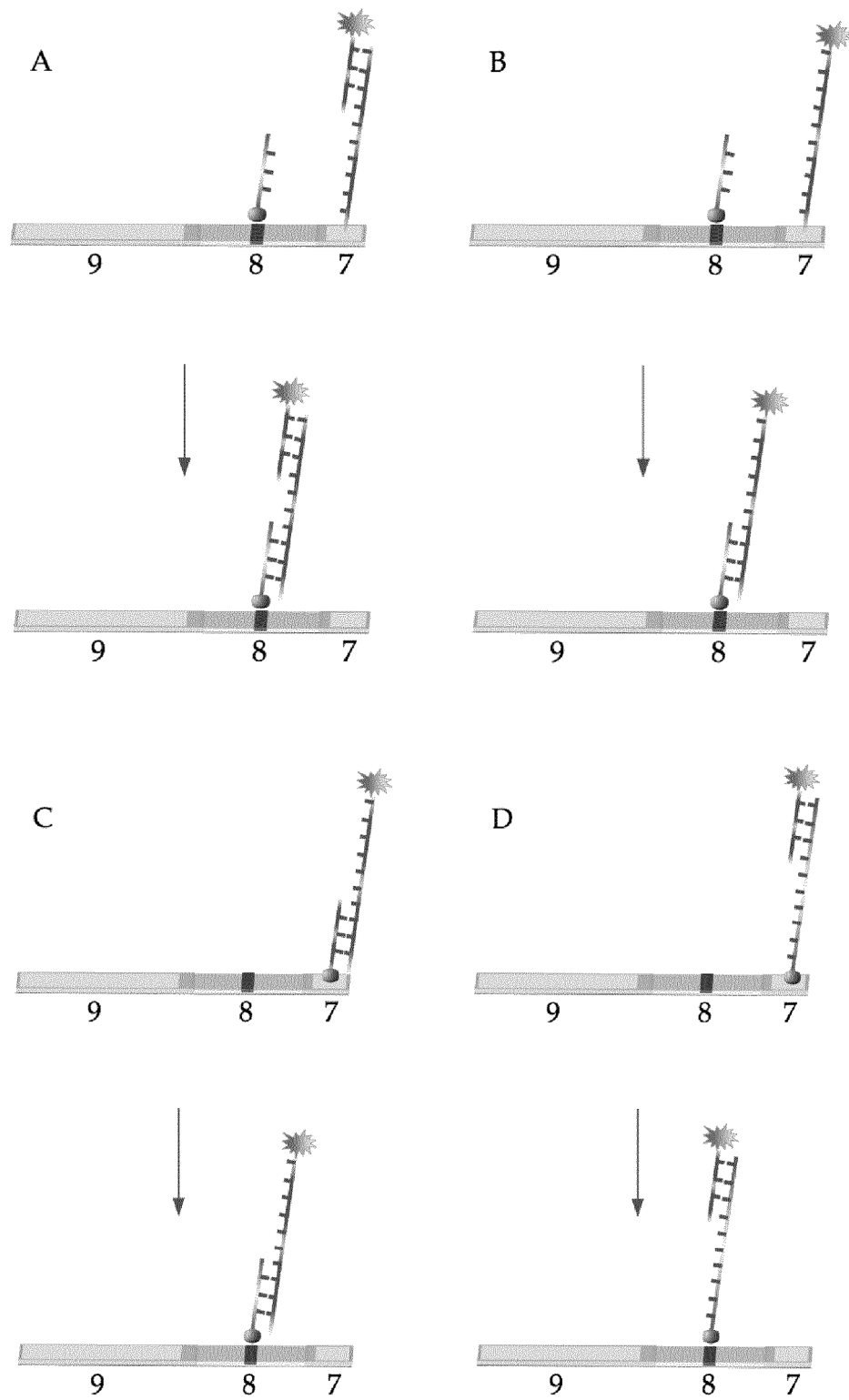


Fig. 4