

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 712 666**

51 Int. Cl.:

B01L 3/00 (2006.01)

C12Q 1/68 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.11.2010 PCT/GB2010/051832**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **05.05.2011 WO11051735**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.11.2010 E 10778710 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.01.2019 EP 2496351**

54 Título: **Dispositivo**

30 Prioridad:

02.11.2009 GB 0919159

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

14.05.2019

73 Titular/es:

**THE SECRETARY OF STATE FOR
ENVIRONMENT, FOOD AND RURAL AFFAIRS
(100.0%)
Acting through Animal and Plant Health Agency,
Woodham Lane
Addlestone, Surrey KT15 3NB, GB**

72 Inventor/es:

**WAKELEY, PHILIP y
GUTSELL, GRAHAM**

74 Agente/Representante:

GARCÍA GONZÁLEZ, Sergio

ES 2 712 666 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

5 La presente invención se refiere a dispositivos para su uso en la detección de ácidos nucleicos en muestras tales como muestras biológicas.

10 La detección de ácidos nucleicos en muestras, en particular muestras biológicas, es bien conocida en los campos de investigación y diagnóstico, en particular de enfermedades y afecciones genéticas, análisis forense y detección de microorganismos, por ejemplo, para higiene, vigilancia ambiental o fines militares, en los que se requiere que los microorganismos potencialmente dañinos, como las bacterias, se detecten rápidamente.

15 Los dispositivos de flujo lateral (DFL) han sido utilizados durante mucho tiempo en el campo del diagnóstico para detectar analitos diana, tales como proteínas, como hormonas, antígenos, anticuerpos, etc. En estos dispositivos, una muestra líquida que contiene o se sospecha que contiene el analito fluye a lo largo de una membrana, en la que encuentra marcadores, parejas de unión marcadas y/o parejas de unión inmovilizadas, en una secuencia mediante la cual se desarrolla una señal visible detectable sobre la membrana en función de la presencia o ausencia del analito en la muestra.

20 El volumen de líquido requerido para provocar que una muestra fluya efectivamente a lo largo de un DFL es generalmente bastante significativo. La membrana utilizada como sustrato para el DFL es porosa y generalmente absorberá cantidades significativas de líquido. Además, el flujo de líquido debe ser suficiente para garantizar que los restos marcados se transporten a la zona de detección en el dispositivo.

25 Estos también pueden usarse para detectar analitos que comprenden ácidos nucleicos tales como ARN o ADN. En este caso, las parejas de unión para los analitos incluirán oligonucleótidos que se hibridan con la secuencia diana específica o, como alternativa, parejas de unión para agentes de unión que se han incorporado al ARN o al ADN, por ejemplo, durante una reacción de amplificación preliminar. Por ejemplo, las reacciones de amplificación de ácidos nucleicos también se pueden usar para incorporar un agente de unión, como la biotina, en la diana para facilitar la captura en la zona de detección. Cuando la biotina se ha incorporado a un ácido nucleico diana, la presencia de estreptavidina o anticuerpos anti-biotina en la zona de detección en el DFL dará lugar a la captura de ácidos nucleicos diana marcados con biotina en la zona de captura.

35 El marcado puede efectuarse utilizando sondas marcadas que también se hibridan, por ejemplo, con la secuencia diana para producir una señal visible cuando la diana se inmoviliza en la zona de detección, o incorporando un marcador en la secuencia diana, por ejemplo, durante una reacción de amplificación en la que los cebadores marcados se utilizan para generar un producto intrínsecamente marcado. Los marcadores adecuados son bien conocidos en la técnica, marcadores químicos o bioquímicos tales como marcadores fluorescentes que incluyen, por ejemplo, fluoresceína o derivados de fluoresceína, o tintes de cianina, o marcadores que pueden detectarse enzimáticamente, como la digoxigenina. En otra realización, los marcadores pueden comprender marcadores en partículas tales como perlas o partículas de oro, plata y látex, que producen una señal directamente visible. Estos pueden estar dispuestos para interactuar con el ácido nucleico diana en la zona de detección. Para lograr esto, las propias partículas se marcarán, por ejemplo, se conjugarán con restos que interactúan con el ácido nucleico diana (por ejemplo, otros ácidos nucleicos que se hibridan con el ácido nucleico diana), o se pueden conjugar con un agente de unión como la estreptavidina, que interactúa con una pareja de unión como la biotina, que se ha incorporado en la secuencia de ácido nucleico diana.

50 De hecho, en la mayoría de los casos, la concentración de ácido nucleico diana en una muestra biológica es baja, y ciertamente inferior a la que puede generarse una señal directamente visible en un DFL. Por lo tanto, como una etapa preliminar, generalmente se requiere la amplificación del ácido nucleico.

55 Las técnicas de amplificación de ácido nucleico son una herramienta poderosa en esta área. Existen muchas técnicas, algunas de las cuales se llevan a cabo de forma isotérmica, y otras que requieren ciclos térmicos, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés), que permiten que se amplifiquen cantidades muy pequeñas de ácido nucleico diana en una muestra hasta niveles detectables.

60 Sin embargo, la extrema sensibilidad de estas técnicas significa que son muy propensas a la contaminación o contaminación cruzada. Incluso una cantidad muy pequeña de ácido nucleico contaminante puede estar sujeta a amplificación en estos procedimientos, lo que conduce a falsos positivos.

65 Se han realizado muchos intentos para abordar este problema, los cuales se centran principalmente en garantizar que la muestra se trate en un entorno aislado del procedimiento de amplificación en la medida de lo posible. Por lo tanto, se han desarrollado procedimientos para llevar a cabo una reacción de amplificación y detectar el producto de amplificación en una reacción homogénea, en la que el recipiente de reacción no tiene que abrirse.

Sin embargo, con frecuencia es necesario someter una muestra biológica a algunas etapas de pretratamiento para liberar ácidos nucleicos, por ejemplo, de células eucarióticas y procarióticas o de virus, para permitir que se produzca la amplificación. Claramente, es deseable que tales procedimientos se lleven a cabo de una manera que minimice cualquier riesgo de contaminación.

Por ejemplo, la Patente de EE. UU. Nº 6,649,378, la Publicación de Solicitud de Patente de EE. UU. Nº 2004/0110167 y la Publicación de Solicitud de Patente de EE. UU. Nº 2006/0160078 describen una gama de dispositivos independientes que integran la extracción, amplificación y detección de ácido nucleico en un solo dispositivo.

En general, sin embargo, tales dispositivos requieren manipulaciones físicas para llevar a cabo el procedimiento. Por ejemplo, los dispositivos de la Patente de EE. UU. Nº 6,649,378 y de la Publicación de Solicitud de Patente de EE. UU. No. 2004/0110167 describen sistemas en los que la extracción de ADN se lleva a cabo en un primer dispositivo, los contenidos se transfieren a un tubo de amplificación, tal como un tubo PCR, y finalmente, un dispositivo de flujo lateral ("barra de resultado") se introduce en el tubo. Las manipulaciones de este tipo pueden resultar en la introducción de contaminantes.

El dispositivo de la Publicación de Solicitud de Patente de EE. UU. Nº 2006/0160078 describe un sistema en el que la extracción, amplificación y detección se lleva a cabo en varias zonas en una membrana de un DFL, en el que cada una de las zonas se separa inicialmente y luego se juntan secuencialmente, por ejemplo, mediante la eliminación de una lámina plástica intermedia o utilizando un émbolo para bajar una zona a la zona posterior. Sin embargo, en este caso, los volúmenes de líquido que están presentes en cada etapa son, en cierta medida, una función de los requisitos de la membrana del DFL y de cómo este absorbe o transmite el líquido. Sin embargo, las reacciones de amplificación optimizadas pueden llevarse a cabo preferentemente en solución en pequeños volúmenes de líquido "libre", lo que no podría ser posible en circunstancias como la divulgada en la Publicación de Solicitud de Patente de EE. UU. Nº 2006/0160078, en la que se requiere que los volúmenes fluyan a través de un DFL.

La Solicitud WO 2004/065010 divulga un sistema microfluídico para el aislamiento y la amplificación de ADN y la detección en un DFL. La Solicitud WO 2009/080817 divulga un sistema de prueba rápida para el análisis de ácidos nucleicos.

Existe la necesidad de un sistema integrado que permita que el análisis se lleve a cabo rápidamente sin la necesidad de operaciones manuales onerosas y con un riesgo mínimo de contaminación y con una eficiencia máxima.

Los solicitantes han desarrollado un aparato que permite que el análisis de ácido nucleico se lleve a cabo en una unidad aislada, que puede ser desechable, con un riesgo mínimo de contaminación.

En particular, los solicitantes han diseñado un dispositivo en el que se puede llevar a cabo una amplificación de ácido nucleico en la fase líquida en un pocillo de volumen conveniente, y el producto de tal reacción se transfiere a una membrana de un dispositivo de flujo lateral sin exponerse al medio ambiente.

Como resultado, la presente invención proporciona un dispositivo para llevar a cabo un ensayo para detectar un ácido nucleico diana en una muestra, comprendiendo dicho dispositivo

- (i) un primer pocillo en el que puede efectuarse una reacción de amplificación de ácido nucleico de dicho ácido nucleico diana;
- (ii) un primer canal que se extiende desde dicho primer pocillo;
- (iii) un dispositivo de ensayo de flujo lateral; y
- (iv) un diluyente que contiene un diluyente y que está conectado al primer pocillo, por medio de un segundo canal, comprendiendo el diluyente una bolsa flexible sellada que contiene diluyente, comprendiendo el diluyente medios de perforación dispuestos para abrir la bolsa flexible cuando se aplica presión a la bolsa flexible;

en el que

el primer pocillo tiene un menor volumen que el volumen del diluyente; el dispositivo de ensayo de flujo lateral está dispuesto para recibir una muestra de dicho primer canal en una membrana bibulosa del mismo, en el que dicha membrana contiene elementos que pueden detectar dicho ácido nucleico diana; y el segundo canal está dispuesto de tal manera que el diluyente, cuando está contenido en el pocillo de diluyente, se puede transferir al primer pocillo.

Dependiendo de los volúmenes usados, el líquido que pasa a lo largo del primer canal puede suministrarse directamente a una sección de recepción de muestras de un dispositivo de ensayo de flujo lateral. Esto puede

comprender una almohadilla de absorción. Sin embargo, en una realización particular, en la que se suministran volúmenes significativos a través del primer canal, puede ser conveniente proporcionar un segundo pocillo dispuesto para recibir líquido de dicho primer canal. En tales casos, el dispositivo de ensayo de flujo lateral está dispuesto para recibir la muestra de dicho segundo pocillo. Por ejemplo, una sección de recepción del dispositivo de ensayo de flujo lateral puede proyectarse en el segundo pocillo. Esto puede ser conveniente cuando los volúmenes que se suministran son mayores de lo que pueden ser absorbidos convenientemente directamente por una sección de recepción del dispositivo de flujo lateral.

De este modo, en una realización particular, la presente invención proporciona un dispositivo para llevar a cabo un ensayo para detectar un ácido nucleico diana en una muestra, comprendiendo dicho dispositivo:

- (i) un primer pocillo en el que se puede efectuar una reacción de amplificación de ácido nucleico de dicho ácido nucleico diana en la fase líquida;
- (ii) un segundo pocillo conectado a dicho primer pocillo por medio de un primer canal, en el que el primer canal está dispuesto de tal manera que los contenidos de dicho primer pocillo se pueden transferir al segundo pocillo;
- (iii) un dispositivo de ensayo de flujo lateral dispuesto para recibir una muestra de dicho segundo pocillo y detectar dicho ácido nucleico diana en su interior.

El dispositivo de la invención puede ser un dispositivo unitario que contiene todos los elementos (i), (ii) y (iii), así como (ii) cuando sea apropiado, en una unidad o entidad integral. Por ejemplo, todos los elementos del dispositivo pueden estar contenidos dentro de una sola carcasa.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "dispositivo de ensayo de flujo lateral" se refiere a cualquier dispositivo de ensayo que funcione mediante el flujo de líquido a lo largo de una membrana bibulosa. Por lo tanto, esto incluye "tiras reactivas" convencionales que se pueden usar verticalmente, así como dispositivos en los que las membranas se fijan en una posición horizontal, de tal modo que el flujo a lo largo de la membrana se produce horizontal o lateralmente.

El término "canal" se refiere a una trayectoria definida en un cuerpo sólido a través del cual el líquido puede fluir libremente, por ejemplo, bajo la influencia de la presión diferencial y/o la gravedad, y en particular no se basa necesariamente en la acción capilar.

Mediante la combinación de secciones en las que el líquido se transfiere por flujo bibuloso con secciones en las que se permite el flujo normal de líquido dentro del mismo dispositivo, el dispositivo de la invención permite que cada etapa del ensayo (amplificación y detección) se lleve a cabo bajo las condiciones preferentes. Por lo tanto, el volumen de cualquier mezcla de reacción de amplificación en el primer pocillo se puede seleccionar para proporcionar condiciones de amplificación óptimas. Sin embargo, ese volumen puede aumentarse mediante la adición de diluyente, en la transferencia al segundo pocillo, y posteriormente al dispositivo de flujo lateral para proporcionar los volúmenes preferentes para su uso en el dispositivo de ensayo de flujo lateral. La transferencia de líquido entre las secciones de flujo de líquido bibuloso y normal se facilita por el hecho de que las secciones están contenidas dentro del mismo dispositivo. Además, el dispositivo es susceptible de operación automática o semiautomática del ensayo.

En una realización particular, el segundo pocillo está cerrado. El primer canal que conecta el primer pocillo con el segundo pocillo está encerrado adecuadamente dentro del dispositivo, por ejemplo, dentro de una carcasa que contiene al menos el primer y el segundo pocillos.

En otra realización, el primer pocillo se puede cerrar.

Como se usa en la presente memoria, el término "cerrado" significa que los pocillos están aislados de la atmósfera, aunque pueden estar en comunicación entre sí. De manera similar, el término "que se puede cerrar" se refiere a un pocillo que puede estar aislado de la atmósfera, por ejemplo, mediante una cubierta, tapa, tapón o sello.

Cuando el segundo pocillo está cerrado y el primer canal también está cerrado, se pueden llevar a cabo reacciones de amplificación y el producto de amplificación resultante se transfiere a un dispositivo de flujo lateral para su detección sin exposición a la atmósfera, minimizando así el riesgo de contaminación.

El dispositivo proporciona que la reacción de amplificación se pueda llevar a cabo en un pequeño volumen de líquido, que es preferible o incluso óptimo para la reacción de amplificación, y el producto de amplificación se puede diluir lo suficiente antes de que ingrese en el segundo pocillo para permitirle que fluya libremente a lo largo del dispositivo de flujo lateral, mediante la adición del diluyente. El diluyente contiene diluyentes precargados. El diluyente se suministra dentro de un recipiente sellado, que se puede abrir dentro del tercer pocillo solo cuando se requieren diluyentes para su uso. Esto evita que el diluyente líquido entre en contacto prematuramente con la

membrana del dispositivo de flujo lateral antes de su uso, lo que puede causar que el dispositivo se deteriore.

El primer pocillo está adaptado para permitir específicamente que se lleve a cabo una reacción de amplificación de ácido nucleico en el mismo. Dichas reacciones generalmente se llevan a cabo en volúmenes relativamente pequeños y, por lo tanto, el volumen del primer pocillo será relativamente pequeño, tal como será explicado más adelante.

En particular, sin embargo, el primer pocillo se adapta adecuadamente para que esté disponible para calentarse a las temperaturas deseadas generalmente implicadas en una amplificación de ácido nucleico. Por lo tanto, el pocillo está construido adecuadamente de un material que es resistente a tales temperaturas y/o fluctuaciones y cambios de temperaturas que están involucrados en una reacción típica de amplificación de ácido nucleico.

En realizaciones particulares, el primer pocillo está dispuesto en un saliente o extremidad del dispositivo de tal modo que esté fácilmente disponible para calentamiento y/o refrigeración para efectuar una amplificación de ácido nucleico, por ejemplo, utilizando dispositivos de calentamiento externos o, cuando sea apropiado, termocicladores.

En una realización particular, el primer pocillo tiene un menor volumen que el segundo pocillo, en el que están presentes terceros pocillos. Por ejemplo, el primer pocillo puede tener una capacidad de 10-250 µl, como por ejemplo de 15-50 µl, por ejemplo, aproximadamente 25 µl, mientras que el segundo pocillo y los pocillos diluyentes tienen capacidades adecuadas en el intervalo de 40-4000 µl, por ejemplo de 40 2500µl. En una realización particular, el segundo pocillo y el pocillo de diluyente pueden tener capacidades de aproximadamente 2500 µl. En otras realizaciones, las capacidades de los pocillos pueden ser de 40-1000 µl, tales como de 50-250 µl, por ejemplo, aproximadamente 100 µl. Por ejemplo, el diámetro del primer pocillo puede estar en el intervalo de 2-3 mm con una profundidad de aproximadamente 4-10 mm, por ejemplo, aproximadamente 5 mm, mientras que el diámetro del segundo pocillo y los pocillos diluyentes pueden estar en el intervalo de 7-20 mm, por ejemplo, de unos 10 mm con una profundidad similar.

Esta disposición significa que el dispositivo es adecuado para llevar a cabo un intervalo de reacciones químicas o bioquímicas en las que la propia reacción se efectúa de manera óptima en un volumen relativamente pequeño de líquido, y ese volumen es generalmente más pequeño que el requerido para proporcionar una señal de manera efectiva en un dispositivo de flujo lateral convencional.

Adecuadamente, el dispositivo de ensayo de flujo lateral está completamente encerrado dentro del dispositivo, por ejemplo, está encerrado dentro de una carcasa del dispositivo, también para minimizar el riesgo de contaminación. En este caso, se proporciona adecuadamente una ventana de visualización en el dispositivo o carcasa para permitir la lectura de los resultados del ensayo, o cualquier carcasa en sí misma está hecha de un material transparente.

El dispositivo de ensayo de flujo lateral puede disponerse de tal modo que la membrana se proyecte en el segundo pocillo y, por lo tanto, absorba la muestra directamente del segundo pocillo. Sin embargo, en una realización particular, un elemento de flujo de líquido, en particular un elemento de absorción está dispuesto para recibir la muestra del segundo pocillo y transferirla a una sección de recepción de muestras de la membrana del dispositivo de flujo lateral. Los elementos de absorción adecuados incluyen una almohadilla de fibra de absorción, por ejemplo, construida a partir de un material fibroso denso e hidrófilo tal como celulosa o similares. El elemento de absorción al menos se proyecta en el segundo pocillo en un extremo, y entra en contacto con una región final de la membrana del dispositivo de ensayo de flujo lateral en el otro extremo, con el fin de garantizar que el líquido se transfiera desde el segundo pocillo a la membrana con un flujo aceptable y controlado. En una realización particular, el elemento de absorción alinea la base del segundo pocillo de modo que el líquido suministrado en el pocillo se aplica directamente al elemento de absorción.

El elemento de absorción puede actuar por sí mismo como un depósito para los reactivos utilizados en el dispositivo de ensayo de flujo lateral para desarrollar una señal. Por ejemplo, las parejas de unión para el ácido nucleico diana amplificado, que están adecuadamente marcadas como se describe anteriormente, pueden almacenarse dentro del elemento de absorción. Posteriormente, se transfieren con la muestra a lo largo de la membrana del dispositivo de ensayo de flujo lateral a la zona de detección apropiada sobre la membrana.

El dispositivo es adecuadamente una unidad desechable destinada para un solo uso. Al menos una parte del dispositivo y preferentemente todo el dispositivo está adecuadamente contenido dentro de una carcasa que está hecha adecuadamente de un material plástico rígido.

El primer pocillo puede calentarse o enfriarse de manera controlable. Aunque los elementos de calentamiento, tales como los elementos de calentamiento resistivos, elementos de refrigeración o elementos de termostato, así como elementos de control de temperatura o de medición de temperatura, como termistores o termopares, se pueden incluir dentro del propio dispositivo, en una realización particular, el primer pocillo está dispuesto para ser

adyacente para, en contacto con o de otro modo abarcado por tales elementos dentro de un aparato, adaptarse para acomodar el dispositivo para los fines del ensayo. El dispositivo está adecuadamente adaptado para acoplarse en el aparato de tal modo que el primer pocillo pueda someterse a un calentamiento que sea un calentamiento adecuadamente controlado.

5

De este modo, por ejemplo, el primer pocillo puede extenderse hacia afuera de la carcasa, por ejemplo, en un saliente como se describió anteriormente, de tal modo que puede acomodarse dentro de un pocillo correspondiente dentro de un elemento de calentamiento o termociclado tal como un calentador de bloque que opcionalmente forma parte del aparato. Alternativamente, el pocillo saliente puede estar dispuesto para acoplarse dentro de una cámara de refrigeración o calentamiento por aire de, por ejemplo, un calentador de aire forzado, un termociclador o un termostato.

10

Alternativamente, el dispositivo puede incluir ranuras, canales u otro tipo de acanaladuras, dispuestos de modo que los elementos de calentamiento o termostato dentro del aparato se proyecten dentro del dispositivo alrededor o cerca del primer pocillo cuando el dispositivo se coloca dentro del aparato, con el fin de permitir el calentamiento controlado de los contenidos del primer pocillo.

15

Si se desea, se puede lograr una mezcla más eficiente de los contenidos del primer pocillo con el diluyente proporcionando uno o más diluyentes adicionales que contengan pocillos dentro del dispositivo. Estos se disponen de manera adecuada para que las corrientes separadas de diluyente se introduzcan en el segundo pocillo junto con el contenido del primer pocillo. Adecuadamente, las corrientes convergerán antes de entrar en el segundo pocillo para inducir un flujo turbulento que proporcione una mejor mezcla de los contenidos del primer pocillo con el diluyente, antes de que se aplique al dispositivo de flujo lateral.

20

25

El flujo de los múltiples pocillos de diluyente se coordina y controla adecuadamente para asegurar una mezcla beneficiosa.

Los propios canales tendrán una disposición tal que puedan facilitar la transferencia necesaria. De este modo, por ejemplo, el primer canal puede conectarse a la base del primer pocillo para que todo el material pueda ser eliminado del mismo. El primer canal puede entrar en el segundo pocillo en una región superior del mismo. De manera similar, el segundo canal puede enlazarse a la base del tercer pocillo y conectarse a una región superior del primer pocillo.

30

El segundo pocillo tiene una mayor capacidad que el primer pocillo, por lo que el diluyente administrado en el primer pocillo desbordará efectivamente el primer pocillo, en el segundo pocillo. Por lo tanto, el producto de cualquier amplificación en el primer pocillo se puede suministrar en forma diluida al segundo pocillo.

35

En general, una región de extremo que comprende la zona de recepción de muestras de la membrana del DFL se ubicará dentro del segundo pocillo, de tal modo que el líquido que contiene cualquier ácido nucleico amplificado se absorba en la membrana y se extienda a lo largo de su longitud. Una o más zonas de detección o control, en las que están inmovilizadas las parejas de unión adecuadas para los restos diana, se proporcionan en la membrana aguas abajo de dicho extremo de la manera convencional, de tal modo que los ácidos nucleicos diana se capturan (o de lo contrario, en el caso de un formato de ensayo competitivo) en dicha zona. Los ácidos nucleicos se marcan adecuadamente ya sea directamente durante la reacción de amplificación o por contacto con una sonda marcada, que se introduce en la reacción de amplificación o se localiza de manera móvil en el DFL. Por lo tanto, la acumulación de material marcado, por ejemplo, asociado con marcadores en partículas (por ejemplo, cuentas de látex) como se describe anteriormente en una zona de detección, da lugar a una señal visible en el DFL. Ejemplos de tales dispositivos se ilustran, por ejemplo, en la Solicitud US2004/0110167.

40

45

Las membranas adecuadas pueden comprender materiales a base de celulosa tales como celulosa, nitrocelulosa o carboximetilcelulosa, polímeros hidrófilos que incluyen polímeros sintéticos hidrófilos tales como poliésteres, poliamidas, polímeros de carbohidratos, polímeros hidrófobos tales como polímeros halogenados tales como politetrafluoroetileno, fibra de vidrio o polímeros porosos.

50

Las membranas particularmente adecuadas incluyen membranas de celulosa y en particular membranas de nitrocelulosa que pueden laminarse, tales como las disponibles de Millipore. Estas pueden apoyarse sobre un material de refuerzo, como una membrana con refuerzo de plástico, como un poliéster (Mylar®) o una membrana de celulosa con refuerzo de PET. El refuerzo de tales membranas es naturalmente hidrófobo, mientras que la celulosa en sí misma es hidrófila, lo que da lugar al efecto de absorción necesario. Sin embargo, la hidrofiliidad puede dar lugar a problemas cuando las membranas se utilizan en el contexto de un procedimiento de inmunoensayo. Las membranas utilizadas en estos dispositivos pueden, si es necesario, bloquearse utilizando agentes bloqueadores convencionales. Los agentes bloqueadores son aquellos que pueden reducir las interacciones no específicas entre cualquier proteína en la muestra y la membrana o aumentar la velocidad de absorción de la muestra. Generalmente se aplican después de la aplicación de agentes de unión inmovilizados y generalmente se seleccionan entre tres tipos de agentes que incluyen proteínas, tensioactivos y polímeros

55

60

65

sintéticos. Los ejemplos particulares de proteínas que se pueden usar como agentes bloqueadores incluyen albúmina de suero bovino (ASB), de componentes de leche en polvo sin grasa, como la caseína.

5 Ejemplos de tensioactivos que se pueden usar como agentes bloqueadores incluyen tensioactivos no iónicos tales como el monolaureato de polioxietileno sorbitán que se vende con el nombre comercial de Tween™ 20, y los etoxilatos de octilfenol, por ejemplo, como los vende Dow como la serie Triton X™. por ejemplo, Triton X-100.

10 Los polímeros sintéticos adecuados para usar como reactivos bloqueadores incluyen alcohol polivinílico (APV), polivinilpirrolina (PVP), polietilenglicol (PEG) y éteres grasos de polioxietileno, tales como los derivados de los alcoholes de laurilo, cetilo, estearilo y oleilo y que se venden bajo el nombre comercial de Brij™.

15 En general, se reconoce que pueden emplearse particularmente mezclas de dos o más de estos tipos o clases de reactivos bloqueadores, por ejemplo, una mezcla que comprende un tensioactivo y un polímero sintético, tal como se describió anteriormente.

En una realización preferente, sin embargo, no se usa ningún agente bloqueador en la membrana.

20 Los reactivos para llevar a cabo la amplificación, tales como cebadores, enzimas, sondas, etc. pueden precargarse en el primer pocillo para que esté listo para recibir la muestra directamente para la amplificación. En particular, dichos reactivos pueden estar presentes en forma seca y, en particular, liofilizada, para asegurar que no se descompongan o reaccionen prematuramente. Sin embargo, en una realización particular, dichos reactivos se introducen en el dispositivo mediante el uso de un dispensador de reactivos que está adecuadamente en forma de un "tapón", varita o tapa, con los reactivos liofilizados en una superficie exterior de los mismos. Por lo tanto, el dispensador de reactivos también actúa para cerrar el primer pocillo una vez que se hayan agregado los reactivos.

30 Dichos dispensadores de reactivos pueden suministrarse por separado a los dispositivos, ya que estos serán específicos para un ensayo de ácido nucleico particular, mientras que los dispositivos en sí mismos se pueden usar en general en una gama de ensayos. Sin embargo, pueden suministrarse en combinación con los dispositivos y, por lo tanto, la invención proporciona además una combinación de un dispositivo como se describió anteriormente y un dispensador de reactivos (o un tapón, varita o tapa). Los dispensadores de reactivos, como los tapones, las varitas o las tapas, se suministran adecuadamente en un recipiente sellado, que se empaqueta por separado de otros elementos de la combinación, como el dispositivo, para garantizar que permanezcan libres de humedad.

35 En cualquier caso, se prefiere que los componentes líquidos de la reacción de amplificación, como el tampón de amplificación, se introduzcan en el primer pocillo solo al comienzo de la reacción de amplificación. Esto minimiza los riesgos de contaminación y también evita que ocurran reacciones prematuras.

40 Para lograr lo anterior, el dispositivo comprende adecuadamente un cuarto pocillo cerrado, precargado con reactivos líquidos, tales como tampones de ensayo. Así este cuarto pocillo actúa como depósito para los reactivos. También está vinculado al primer pocillo por medio de un canal, de tal modo que los contenidos pueden suministrarse en el primer pocillo cuando sea necesario para llevar a cabo una reacción de amplificación.

45 En general, es preferible que la reacción de amplificación llevada a cabo sea una de las muchas reacciones de amplificación isotérmica conocidas en la técnica, tales como la amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico (NASBA), la amplificación por desplazamiento de cadena (SDA), la amplificación mediada por transcripción (TMA), la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP), la amplificación de círculo rodante y Q-beta replicasa, 3SR, la amplificación por ramificación (según lo descrito por Zhang et al., Diagnóstico Molecular (2001) 6 N° 2, p141-150), la amplificación de polimerasa recombinasa (disponible de TwistDx) y otras.

55 La muestra puede, si se requiere, y si una muestra está disponible en una forma adecuada, agregarse directamente al primer pocillo. Sin embargo, en general, como se mencionó anteriormente, es necesario extraer y purificar ácidos nucleicos de muestras, en particular muestras biológicas.

60 El dispositivo puede incluir además un sistema de purificación y/o extracción de ácido nucleico. Si bien esto puede tomar varias formas, un medio particularmente preferible para extraer ácidos nucleicos purificados de una muestra implica el uso de una membrana bibulosa, como se describe en la solicitud WO2007/104962. Al permitir que una muestra líquida fluya a lo largo de una membrana bibulosa del tipo descrito anteriormente en relación con los DFL, se ha encontrado que los ácidos nucleicos se unen a la superficie de la membrana, lo que proporciona un medio para separar el ácido nucleico del resto del material en la muestra. Se puede incorporar una membrana bibulosa para fines de extracción y purificación de ácido nucleico en el dispositivo.

65 La membrana puede estar sustancialmente encerrada dentro del dispositivo para minimizar el riesgo de contaminación. La membrana está dispuesta para extenderse entre un quinto pocillo, que actúa como un pocillo de retención o recepción de muestras y el primer pocillo, de tal modo que la muestra en el quinto pocillo puede

dirigirse a lo largo de la membrana hasta el primer pocillo. Adecuadamente, la membrana se extiende al menos parcialmente sobre la abertura del primer pocillo. Con esta disposición, se puede cortar una pequeña sección de la membrana de la misma, por ejemplo, utilizando un cortador provisto en el tapón, la varita o la tapa descritas anteriormente. Esta acción hace que la sección de membrana caiga en el primer pocillo, con lo cual puede mezclarse con otros reactivos en el tapón, la varita o la tapa, y el tampón del cuarto pocillo pueda formar una mezcla de reacción de amplificación. Cualquier ácido nucleico presente en la sección de membrana puede amplificarse acordemente.

Aunque en algunos casos el quinto pocillo puede actuar como el pocillo de recepción de muestras, generalmente es preferible que una muestra se someta a un procesamiento previo, por ejemplo, para lisar células o microorganismos presentes en la muestra para liberar contenidos celulares antes de que se extraiga el ácido nucleico. Para este fin, el quinto pocillo se puede cerrar como se describió anteriormente, pero se puede conectar a un sexto pocillo abierto provisto en el dispositivo, por medio de un canal apropiado. En este caso, la muestra líquida se puede agregar al sexto pocillo para una etapa de lisis preliminar, antes de transferirla al quinto pocillo y la región final de la membrana bibulosa. La transferencia en este caso se efectuará adecuadamente utilizando una fuente de energía cinética tal como una fuente de presión hidráulica o neumática o una fuente de vacío, y de este modo el quinto y sexto pocillos estarán provistos de puertos dispuestos adecuadamente para la conexión al sistema de energía cinética del aparato. En el caso de que exista un sistema neumático, también pueden requerirse puertos de ventilación adecuados conectados al quinto pocillo.

La lisis celular se puede efectuar de varias maneras. Por ejemplo, se puede agregar un agente caotrópico como el clorhidrato de guanidina o un detergente al pocillo de recepción de muestras, o se puede dispensar previamente en el mismo. Sin embargo, los procedimientos adecuados mediante los cuales se logra la lisis celular en el pocillo de recepción de muestras pueden ser esencialmente por medios físicos, como la aplicación de calor o sonicación, y en particular calentando el pocillo a temperaturas de aproximadamente 100 °C en el pocillo de recepción de muestras. El aparato en el que se coloca el dispositivo para el ensayo está provisto de medios de calentamiento capaces de efectuar este procedimiento o un dispositivo de sonicación.

El pocillo de recepción de muestras (ya sea el quinto o sexto pocillo) se puede cerrar adecuadamente, por ejemplo, mediante un tapón o tapa una vez que se le haya agregado la muestra, y antes o después de que el dispositivo haya sido colocado dentro del aparatos con el fin de llevar a cabo un ensayo.

Cuando se obtienen muestras líquidas, éstas pueden agregarse al pocillo de recepción de muestras (ya sea el quinto o sexto pocillo) antes de la realización de la operación de lisis. Sin embargo, si la muestra está en una forma sólida como una muestra de hisopo, entonces es posible que sea necesario lavar el hisopo para liberar el material de prueba. En este caso, el dispositivo puede estar provisto de un séptimo pocillo que está adecuadamente cerrado y que contiene un fluido de lavado.

De este modo, en uso, el dispositivo descrito anteriormente se carga en un aparato adaptado para recibirlo. Los elementos de calentamiento controlables provistos en el aparato pueden interactuar con el primer pocillo con el propósito de llevar a cabo una reacción de amplificación de ácido nucleico en el mismo, y opcionalmente también con un pocillo de recepción de muestras para instigar la lisis celular por calor si es necesario. El aparato está programado adecuadamente para realizar varias etapas del procedimiento, incluyendo la transferencia de líquidos de un pocillo a otro y el calentamiento de los pocillos apropiados automáticamente, en una secuencia que garantiza que el ácido nucleico se extrae de una muestra, se purifica, se amplifica y se detecta en una sola operación.

En la presente memoria se describe un sistema para llevar a cabo un ensayo para detectar un ácido nucleico en una muestra, comprendiendo dicho sistema un dispositivo de acuerdo con las reivindicaciones.

El dispositivo da lugar a un medio útil y fácil de operar para llevar a cabo la amplificación y detección de ácidos nucleicos. Al almacenar los reactivos necesarios en el procedimiento en pocillos cerrados en el dispositivo y hacer que el dispositivo sea desechable, se minimizan los riesgos de contaminación.

La Figura 1 es una ilustración esquemática de un dispositivo desechable, dispuesto para la extracción de ácido nucleico de una muestra, así como la amplificación del ácido nucleico extraído y la detección del producto de amplificación.

La invención se describirá ahora particularmente a modo de ejemplo con referencia a las Figuras 2-8 acompañantes.

La Figura 2 es una ilustración esquemática de una forma alternativa de dispositivo desechable para la amplificación y detección de ácido nucleico en una muestra.

La Figura 3 es una vista en planta esquemática de una forma alternativa de un dispositivo.

La Figura 4 es una vista lateral esquemática del dispositivo de la Figura 3.

La Figura 5 es una vista en planta esquemática de otra forma alternativa de un dispositivo.

La Figura 6 es una vista esquemática de la parte inferior del dispositivo de la Figura 5.

La Figura 7 es una vista esquemática de la parte inferior de una parte de un dispositivo, pero con una disposición alternativa del primer pocillo, en comparación con la mostrada en la Figura 5.

La Figura 8 es una ilustración de un dispositivo después de su uso en un ensayo modelo.

Ejemplo comparativo

10 El dispositivo de la Figura 1 comprende una carcasa de plástico (1) que esencialmente tiene una construcción laminar que comprende un bloque central (2) intercalado entre una placa de cubierta superior (3) y una placa de base inferior (4). El bloque central (2) incluye una pluralidad de pocillos (5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11) en su interior junto con canales (12, 13, 14, 15 y 16) que enlazan los pocillos tal como se muestra. Los canales adicionales (17, 18, 19, 20, 21 y 22) conectan la mayoría de los pocillos a los puertos neumáticos (23, 24, 25, 26, 27 y 28 respectivamente) provistos en la cubierta superior (3) de la carcasa (1). La cubierta (3) incluye además una

20 Una membrana bibulosa (31) está dispuesta dentro de un conducto horizontal en el cuerpo (2) y se extiende entre pocillo (7) y pocillo (8) y la cámara de amplificación. Los extremos opuestos de la membrana (31) están ubicados en cada uno de los pocillos (7) y (8), de tal modo que el líquido dentro del pocillo (7) se desplazará a lo largo de la membrana hacia el pocillo (8). Adecuadamente, al menos una porción de la membrana (31) se extiende a través de la abertura (30) en la cubierta (3).

25 Un conducto similar dentro del cuerpo (2) se extiende lejos del pocillo (16) y en este conducto se aloja un dispositivo de flujo lateral (32).

30 Se proporciona un tapón (33) para cerrar el pocillo (6) después de haber recibido una muestra en el mismo. Se proporciona otro tapón (34) para cerrar la cámara de amplificación del pocillo (8). Sin embargo, de forma adecuada, el tapón (34) transporta al menos algunos de los reactivos necesarios para efectuar una reacción de amplificación en la forma liofilizada en la superficie. También puede comprender un cortador (no mostrado) adaptado para cortar una muestra de la membrana (31) que se extiende a través de la abertura (30) del pocillo (8) cuando el tapón (34) se empuja hacia el pocillo. La muestra cortada cae luego en el pocillo (8) lista para amplificación.

40 Ciertos reactivos utilizados en el procedimiento de extracción/amplificación/detección se cargan previamente en algunos de los pocillos cerrados. En particular, un líquido de lavado de muestra se carga en el pocillo (5) y actúa como un depósito de lavado de muestra. De manera similar, el tampón para uso en la reacción de amplificación se carga en el pocillo (9), que adecuadamente tiene dimensiones similares a la del primer pocillo (8). Por último, se carga un diluyente de elución en el pocillo (10).

45 Antes de su uso, una cubierta desechable, como una cinta adhesiva de plástico, una película o una lámina, se aplica sobre la cubierta (3) de modo que las aberturas (30, 31) y los puertos (23, 24, 25, 26, 27 y 28) queden sellados para dos propósitos; primero, para evitar la contaminación atmosférica (por lo tanto, los pocillos dentro del dispositivo y donde sea apropiado sus contenidos permanecen puros) y segundo, para evitar cualquier flujo de aire a través de los puertos y, por lo tanto, retener los líquidos en sus respectivos pocillos.

En uso, se aplica la siguiente secuencia de operación:

- 50
- El usuario desempaqueta el dispositivo (1), retira la cinta de la cubierta (3) para exponer los puertos neumáticos (23, 24, 25, 26, 27 y 28) y los pocillos de muestra y amplificación (30, 31). El dispositivo (1) puede entonces cargarse en un aparato adaptado para acomodar el dispositivo de modo que los puertos neumáticos (23, 24, 25, 26, 27 y 28) se conecten a un suministro neumático. Además, los pocillos (6, 8) están alineados con dispositivos adecuados de calentamiento o termostato en el aparato.
 - 55 • Si se va a utilizar una muestra líquida, el usuario la carga en el pocillo (6) que actúa como puerto de muestra y se inserta el tapón de muestra.
 - Si la muestra se deriva de un hisopo, el aparato activa (a través del puerto neumático 23 y el canal 17) el reactivo de lavado de muestra desde el depósito de lavado de muestras del pocillo (5) a lo largo del canal (12) hasta el pocillo de muestra (6) y el usuario inserta el hisopo para lavar su contenido. El tapón de muestra (33) se inserta en el pocillo de muestra (6).
 - 60 • El pocillo de muestra (6) se calienta con el aparato (a aproximadamente 100 °C) para extraer el ADN de la matriz de la muestra.
 - Luego, el aparato activa (a través del puerto neumático 23 o 24 y los canales 17 y 12 o 18 respectivamente)
 - 65 el producto de extracción en el pocillo adyacente (7) a través del canal (13) para entrar en contacto con la

- membrana 31 (ventilación a través del canal 19 y el puerto neumático 25).
- El aparato permanece inactivo durante un período de tiempo suficiente para permitir que la muestra transite por acción capilar a lo largo de la membrana (31).
- El tapón (34), que lleva reactivos tales como cebadores específicos de amplificación, enzimas, etc., necesarios para llevar a cabo una reacción de amplificación secada sobre una superficie exterior del mismo, se inserta en el pocillo (8) que actúa como cámara de amplificación. El tapón (34) lleva un cortador dispuesto de tal modo que cuando se inserta en el pocillo (8) (ya sea manualmente por el usuario, o automáticamente por el aparato) perfora la punta de la membrana (31) que cae en el fondo del pocillo (8).
- El aparato activa (a través del puerto neumático 26 y los canales 14 y 20) los reactivos de ensayo líquidos, como soluciones de solución salina y tampón al pocillo (8) (ventilación a través de los canales 16 y 22 al puerto neumático 28).
- Luego, el pocillo (8) se somete a condiciones de calentamiento adecuadas para llevar a cabo una reacción de amplificación de ácido nucleico. Por ejemplo, el instrumento calienta el pocillo (8) a una temperatura adecuada para realizar la amplificación isotérmica, que, en la mayoría de los casos, estará en el intervalo de 15-85 °C, más particularmente entre 20-80 °C, por ejemplo aproximadamente a 65 °C.
- Al finalizar la reacción de amplificación, el aparato expulsa el diluyente (a través del puerto neumático 27 y los canales 21 y 15) desde el pocillo (10), de tal modo que pase a través del pocillo (8) recolectando los productos de amplificación y transfiriendo la mezcla al pocillo adyacente (11) (ventilación a través de los canales 16 y 22 al puerto neumático 28) para entrar en contacto con una zona de recepción de muestra del dispositivo de flujo lateral (32). El dispositivo de flujo lateral (32) está configurado para producir una o más señales detectables, como una diana visible y líneas de control, en respuesta a la presencia o ausencia del ácido nucleico o ácidos diana en la muestra.
- El instrumento brinda tiempo antes de solicitar al usuario que lea el resultado del dispositivo de flujo lateral (32) y retire el dispositivo (1) del aparato.

El procedimiento está adecuadamente automatizado, por lo que la presión se aplica a los puertos neumáticos relevantes en una secuencia apropiada. Cuando no se usan, las válvulas dentro del aparato pueden cerrar efectivamente los puertos (23, 24, 25, 26, 27 y 28).

Ejemplo 1

En la Figura 2, se muestra un dispositivo alternativo. En este caso, una carcasa (40) comprende un primer pocillo (41), que se puede cerrar por medio de una tapa (42). El primer pocillo (41) está vinculado a un segundo pocillo (43) por medio de un canal (44). El canal (44) está vinculado al pocillo (43) en una región superior del mismo. Tanto el canal (44) como el segundo pocillo (43) están incrustados dentro de la carcasa (40).

Un dispositivo de flujo lateral (45) que comprende una membrana bibulosa provista de reactivos necesarios para detectar un ácido nucleico diana, se proyecta en el pocillo (43) en una región inferior del mismo.

Un canal adicional (46) se extiende entre una región inferior del primer pocillo (41) y un depósito de diluyente (47), también ubicado dentro de la carcasa (40). El depósito de diluyente (47) se llena con diluyente (48) y se sella del medio ambiente mediante un émbolo (49).

En uso, una muestra que contiene o que se sospecha que contiene un ácido nucleico diana y reactivos necesarios para llevar a cabo una reacción de amplificación se carga en el primer pocillo (41). Posteriormente, el pocillo se cierra con la tapa (42) y el dispositivo se expone a ciertas condiciones, por ejemplo, condiciones de temperatura, por lo que cualquier secuencia de ácido nucleico diana presente en el pocillo (41) se amplifica y cualquier agente de unión o marca requerido para permitir que el producto de amplificación pueda ser detectado en el dispositivo de flujo lateral, se incorpora o se une al producto, por ejemplo, por hibridación.

Una vez que se completa la reacción de amplificación, el émbolo (49) se acciona, por ejemplo, manualmente, aunque puede disponerse de tal modo que se lleve a cabo automáticamente, si el dispositivo está dispuesto dentro de un aparato adecuado. En algunos casos, puede ser preferible levantar primero el émbolo (49) para provocar que el contenido del pocillo (41), incluido el producto de amplificación, se retraiga en la dirección del pocillo (48) donde se mezcla con el diluyente. El émbolo (49) se presiona entonces y cuando esto ocurre, el diluyente (48) sale del depósito (47) a lo largo del canal (46) e inunda el pocillo (41). Como resultado, los contenidos del pocillo (41) que incluyen el producto de la reacción de amplificación son forzados a través del canal (44) en el segundo pocillo (43). El líquido que llega al pocillo (43) encuentra una primera región de extremo de la almohadilla de absorción (50) y se absorbe en la almohadilla (50). La otra región de extremo de la almohadilla de absorción (50) está en contacto con una porción de recepción de muestras de la membrana del dispositivo de flujo lateral (45). Por lo tanto, el líquido se desplaza a lo largo de la almohadilla (50) y se envía al dispositivo de flujo lateral de manera confiable y controlada. Como resultado de los reactivos presentes en el dispositivo de flujo lateral (45) y la inclusión de cualquier reactivo de unión o marcado en la reacción de amplificación, se desarrollará una señal indicativa de la presencia o ausencia de muestra de ácido nucleico diana en el dispositivo de flujo lateral (45).

De este modo, este dispositivo proporciona un medio simple, fácil de usar y confiable para llevar a cabo una reacción de amplificación y detección, con el mínimo riesgo de contaminación.

5 **Ejemplo 2**

En el dispositivo que se muestra en la Figura 3, el primer pocillo (51) en el que se puede llevar a cabo una reacción de amplificación de ácido nucleico se proporciona dentro de una carcasa (52) junto con un segundo pocillo (53) y un pocillo de diluyente (54) unidos entre sí por medio de canales (55,56), como en ciertas realizaciones anteriores. Sin embargo, en este caso, se proporciona un pocillo de diluyente adicional (57) además de un primer pocillo de diluyente (52) que se conecta con el canal (56) por medio de un canal (58). Estos canales (56,58) se intersecan en una unión "T" ubicada aguas arriba del segundo pocillo (53). Como en casos anteriores, los contenidos líquidos del segundo pocillo (53) se pueden transferir a un DFL (59) por medio de una almohadilla de fibra absorbente (60).

Después de que una muestra haya sido sometida a una reacción de amplificación de ácido nucleico en el primer pocillo (51), el pocillo (51) se inunda con diluyente del pocillo (54). De manera adecuada, cada uno de los pocillos de diluyente (54,57) se opera mediante un émbolo (62, 63 respectivamente) y estos están unidos entre sí por medio de una palanca (61), como se ilustra en la Figura 4. El abatimiento de la palanca (61) en la dirección mostrada por la flecha conduce a la expulsión diferencial, pero controlada, del diluyente de ambos pocillos (52, 57) a diferentes velocidades. La disposición de la palanca (61) es tal que proporciona una mezcla en las proporciones requeridas en la unión T. Esto asegurará que los contenidos del primer pocillo se mezclen bien con el diluyente a medida que llegan al segundo pocillo (53).

A continuación, la mezcla pasará a lo largo de la almohadilla de fibra absorbente (60) y sobre la sección de recepción de muestras del DFL (59). Por lo tanto, se desarrollará una señal en el DFL dependiendo de la presencia o ausencia de ácido nucleico diana amplificado.

30 **Ejemplo 3**

En la Figura 5 se muestra un dispositivo adicional. En esta Figura, el dispositivo comprende un cuerpo (70). Para facilitar la fabricación, el cuerpo (70) comprende capas superiores e inferiores (70a y 70b respectivamente) entre las cuales se encuentra un separador (83) en el que se definen varias estructuras, como se detalla a continuación. El cuerpo (70) está provisto de una proyección lateral (71) en la que se aloja un primer pocillo de reacción (72) (Figura 6) que se puede cerrar por medio de una tapa (73).

Un canal (74) que está encerrado dentro del cuerpo (70) se extiende entre el pocillo de reacción (72) y un segundo pocillo (75), que es más grande que el primer pocillo (72) y está incrustado dentro de la estructura del cuerpo (70). Una almohadilla de absorción (76) se proyecta en el segundo pocillo (75). Un extremo de la almohadilla de absorción (76) alejada del pocillo (75) entra en contacto con el primer extremo de una membrana bibulosa alargada (77) de un elemento de ensayo de flujo lateral. La membrana tiene en su interior, inmovilizados o libres, como es convencional en la técnica, agentes de unión y agentes de unión marcados que son específicos para un ácido nucleico diana particular. Estos están dispuestos de forma tal que el líquido que contiene el ácido nucleico diana se desplace a lo largo de este por un flujo capilar desde la almohadilla de absorción (76) hasta el extremo remoto de la membrana (77), por lo que se desarrollará una señal visible dependiendo de la presencia o ausencia de la diana dentro del líquido. De forma adecuada, el cuerpo (70) es transparente para que se pueda ver cualquier señal. Sin embargo, sería posible proporcionar una ventana de visualización dentro del cuerpo (70) para permitir que se pueda apreciar el desarrollo de la señal si es necesario.

La membrana (77) está dispuesta de modo que atraviesa una abertura (78) dentro del cuerpo (70) y está soportada a lo largo de su longitud por una serie de puntales transversales (79), también incrustados dentro de la estructura del cuerpo (70).

También se proporciona un tercer pocillo (80) para el diluyente dentro del cuerpo (70) y se puede cerrar por medio de un émbolo (81). El pocillo (80) también tiene mayor volumen que el pocillo de reacción (72) y está conectado al pocillo (72) por medio de un segundo canal (82).

En uso, una mezcla de reacción química o bioquímica tal como una mezcla de reacción de amplificación de ácido nucleico se agrega al pocillo (72) y se somete a las condiciones apropiadas, por ejemplo, de temperatura, para efectuar la reacción requerida en el mismo. La proyección (71) puede estar encerrada en un aparato de calentamiento adecuado para realizar esta actividad. De este modo, las condiciones aplicadas en el pocillo de reacción (72) no se aplican al resto del dispositivo donde puedan dañar o deteriorar, por ejemplo, la membrana (77). Las condiciones aplicadas dependerán de la reacción particular que se realice, que puede comprender la incubación a una temperatura relativamente constante, por ejemplo, en el caso de reacciones de amplificación de ácido nucleico isotérmicas, o ciclos térmicos entre un intervalo de temperaturas como los son las reacciones

convencionales, como la reacción en cadena de la polimerasa.

A continuación, se administra diluyente al pocillo (80), por ejemplo, dispensándose desde un recipiente sellado. Si es necesario, el recipiente sellado puede precargarse dentro del pocillo (80) que también contiene un medio de perforación (no se muestra) y el diluyente se puede suministrar presionando el recipiente contra el medio de perforación usando el émbolo (81).

Una vez suministrado, el émbolo (81) se presiona para forzar más diluyentes a lo largo del canal (82) en el pocillo (72) donde se mezcla con la mezcla de reacción y se desborda en el canal (74) y luego en la almohadilla de absorción (76). Este absorberá el líquido que fluye y lo pasará a la primera región final de la membrana (77). El líquido viaja a lo largo de la longitud de la membrana (77) por medio de un flujo bibuloso o capilar, durante el cual se mezclará con reactivos como los reactivos de marcado y los elementos diana, como los ácidos nucleicos diana, desarrollarán una señal como las líneas de señal en las áreas diana y/o de control como es convencional en un ensayo de flujo lateral. Estas señales pueden leerse a través del cuerpo (70).

El dispositivo de las Figuras 5 y 6 puede entonces desecharse. Por lo tanto, la invención proporciona un dispositivo simple que puede ser operado fácilmente para una variedad de propósitos, además de que es fácil de operar y minimiza las oportunidades de contaminación de las muestras y, por lo tanto, evita resultados inexactos.

En una forma modificada de este dispositivo (Figura 7), la proyección (71) es sólida, pero incluye un saliente que se proyecta hacia abajo (83) que es capaz de formar un ajuste perfecto con un primer pocillo desmontable (72). Los canales (74 y 82) pasan a través de este saliente 83 que se abre en su superficie inferior. El primer pocillo separado (72) que está adecuadamente precargado con reactivos de amplificación en forma seca, está provisto de un reborde anular (84) para facilitar su manejo. En esta realización, no hay necesidad de una tapa separada (73). En uso, se aplica una muestra al primer pocillo (72) y el saliente (83) se inserta cómodamente en la abertura del pocillo (72) sellándolo de este modo. A partir de esto, el dispositivo se puede usar de la misma manera que se describió anteriormente en relación con la realización de la Figura 5.

Ejemplo 4

El dispositivo sustancialmente como se ilustra en las Figuras 5 y 6 fue utilizado en un ensayo isotérmico LAMP para detectar la presencia de una enfermedad venérea de caballo en una muestra. El ADN de las bacterias diana lisado por ebullición en agua durante 10 minutos se amplificó utilizando cebadores LAMP dirigidos contra el gen del ARN ribosomal 16S de *Taylorella equigenitalis*. Los cebadores de la reacción se marcaron con biotina o fluoresceína y, a través de estos restos, los productos asociados con las cuentas de látex o las áreas de reacción positiva en los DFL respectivamente. La amplificación se realizó en el pocillo de reacción (72) (volumen total de 25 µl) utilizando LAMP mastermix de GeneSys (Camberley, Reino Unido) que se incubó a 65 °C durante 20 minutos antes de la dilución de la reacción, cargada en el dispositivo, en el tampón apropiado (225 µl de PBS). El tampón se cargó en el pocillo (80) y se forzó en el pocillo de reacción (72) presionando el émbolo (81). Los productos de amplificación diluidos fueron, junto con la dilución, forzados por presión positiva a través del canal (74) y sobre el material absorbente del DFL (76). Los productos de la reacción luego viajaron a lo largo de la longitud del DFL por acción capilar con cuentas de látex asociadas que se acumularon (y por lo tanto se hicieron visibles) en el área de reacción, tanto en la línea de prueba como en la de control. Las líneas fueron evidentes para la reacción positiva tanto en la prueba (línea superior) como en el control (línea inferior), lo que indica que el material de prueba se había amplificado y era positivo.

Los resultados, mostrados en la Figura 8, ilustran que el dispositivo y el procedimiento de la invención son efectivos y proporcionan resultados útiles.

REIVINDICACIONES

- 5
1. Un dispositivo para llevar a cabo un ensayo para detectar un ácido nucleico diana en una muestra, comprendiendo dicho dispositivo:
- 10
- (i) un primer pocillo (41) en el que puede efectuarse una reacción de amplificación de ácido nucleico de dicho ácido nucleico diana;
 - (ii) un primer canal (44) que se extiende desde dicho primer pocillo (41);
 - (iii) un dispositivo de ensayo de flujo lateral (45); y
 - (iv) un pocillo de diluyente (48) que contiene diluyente y está conectado al primer pocillo (41), por medio de un segundo canal (46), en el que el pocillo de diluyente (48) comprende una bolsa flexible sellada que contiene diluyente, comprendiendo el pocillo de diluyente medios de perforación dispuestos para abrir la bolsa flexible cuando se aplica presión a la bolsa flexible;
- 15
- en el que el primer pocillo (41) tiene un volumen menor que el volumen del pocillo de diluyente (48); el dispositivo de ensayo de flujo lateral (45) está dispuesto para recibir una muestra desde dicho primer canal (44) en una membrana bibulosa del mismo, en el que dicha membrana contiene elementos que son capaces de detectar dicho ácido nucleico diana; y
- 20
- el segundo canal (46) está dispuesto de tal manera que el diluyente, cuando está contenido en el pocillo de diluyente (48), se puede transferir al primer pocillo (41).
- 25
2. Un dispositivo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el volumen del primer pocillo (41) es de 15-50 μ l y el volumen del pocillo de diluyente (48) es de 50-250 μ l.
- 30
3. Un dispositivo de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, que comprende además (iia) un segundo pocillo (43) conectado a dicho primer pocillo (41) por medio del primer canal (44), en el que el primer canal (44) está dispuesto de tal modo que los contenidos líquidos de dicho primer pocillo (41) pueden transferirse al segundo pocillo (43) y en el que el dispositivo de ensayo de flujo lateral (45) está dispuesto para recibir contenidos líquidos de dicho segundo pocillo (43) en dicha membrana bibulosa del mismo.
- 35
4. Un dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el primer pocillo (41) está precargado con reactivos adecuados para llevar a cabo una reacción de amplificación de ácido nucleico.
- 40
5. Un dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el primer pocillo (41), el segundo pocillo (43), los canales (44, 46) y el dispositivo de ensayo de flujo lateral (45) están contenidos dentro de una carcasa.
- 45
6. Un dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además un cuarto pocillo cerrado, precargado con reactivos líquidos y conectado al primer pocillo (41) por medio de un canal, de tal modo que los contenidos del cuarto pocillo se puedan suministrar al primer pocillo (41).
- 50
7. Un dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, en el que se proporciona un elemento de absorción entre el segundo pocillo (43) y una sección de recepción de muestras (50) del dispositivo de ensayo de flujo lateral (45), y que está dispuesto para permitir que el líquido del segundo pocillo (43) se pueda suministrar a dicha sección de recepción de muestras (50).
- 55
8. Un dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además un sistema de purificación y/o extracción de ácido nucleico.
- 60
- 65

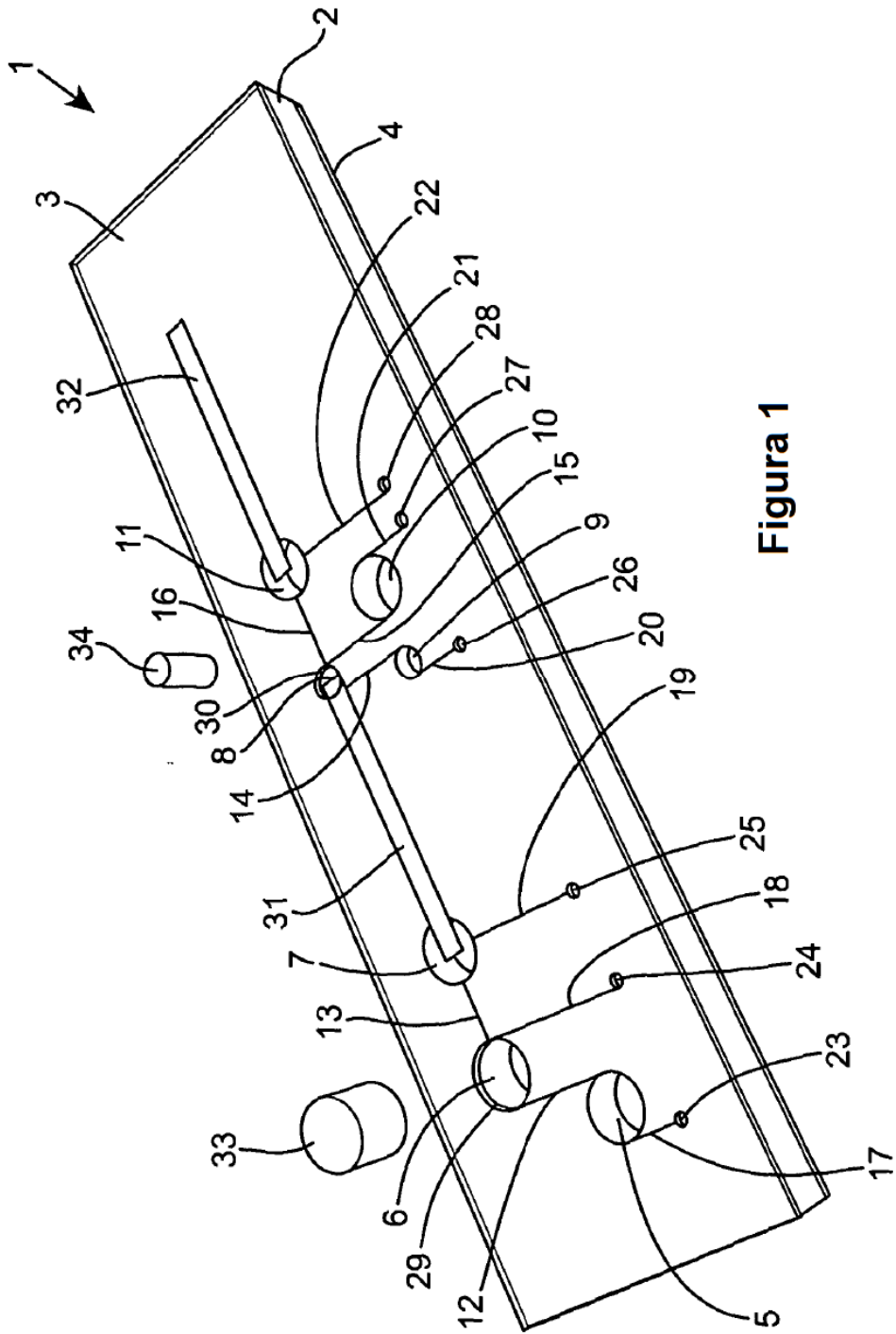


Figure 1

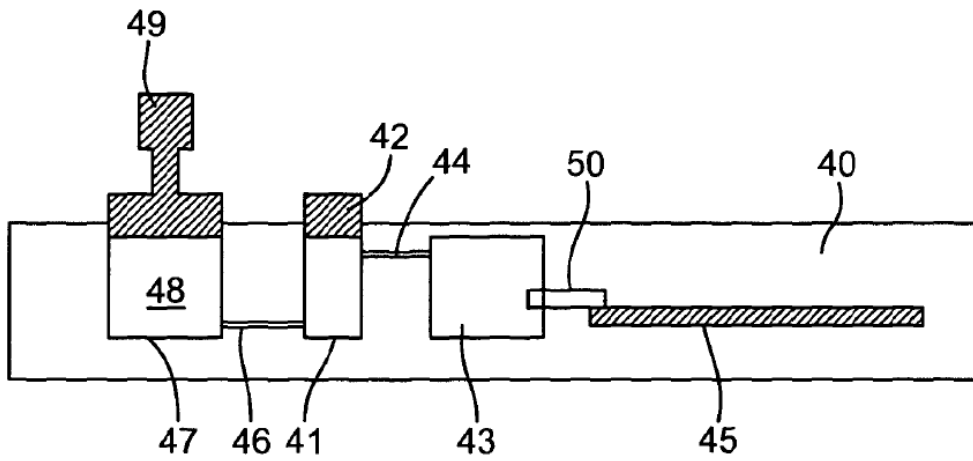


Figura 2

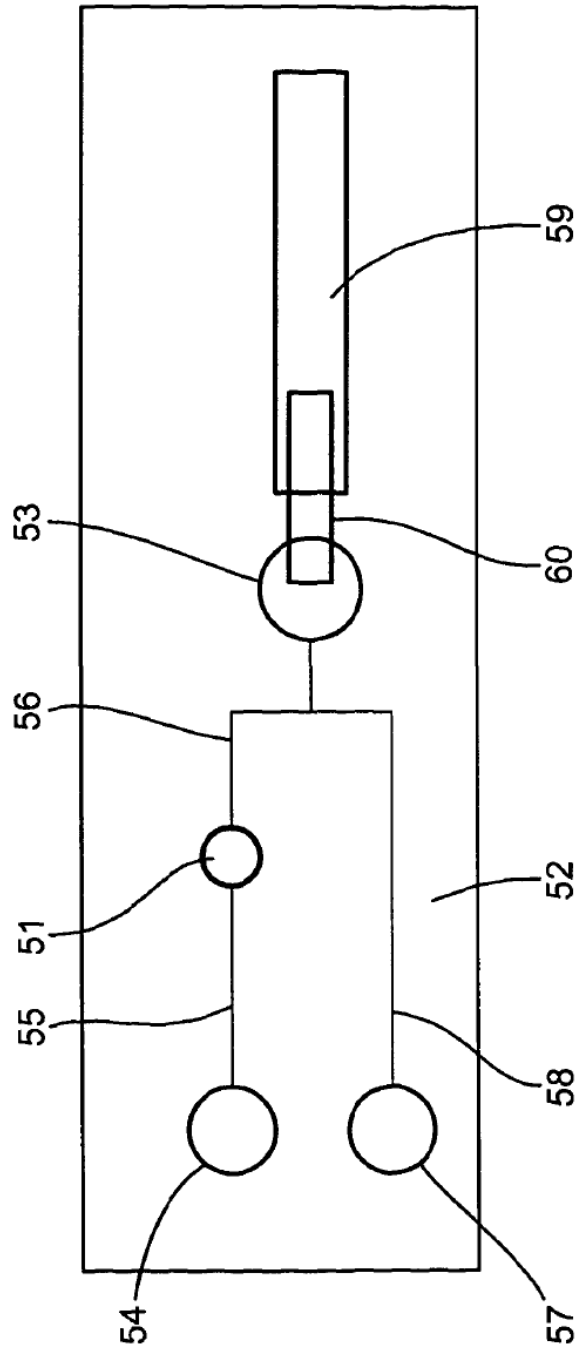


Figura 3

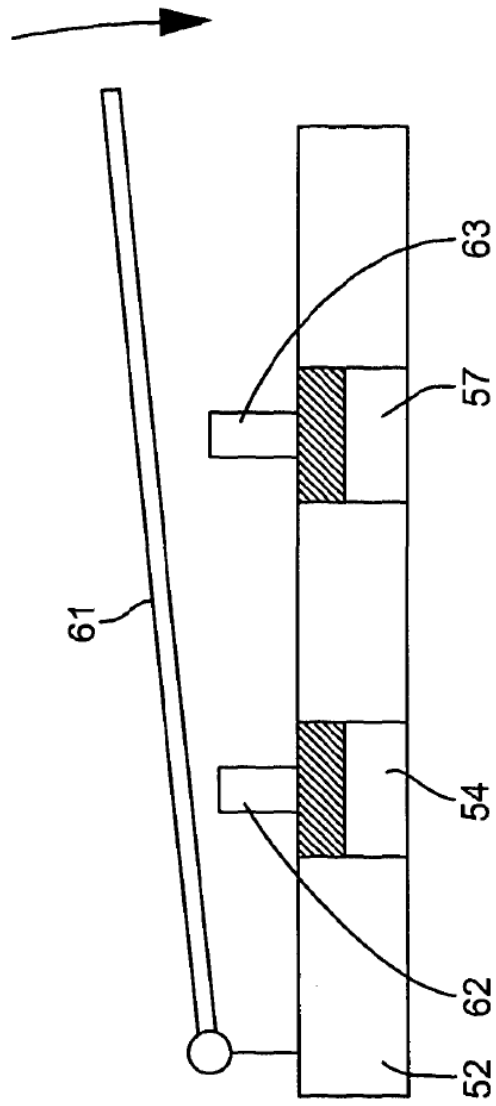


Figura 4

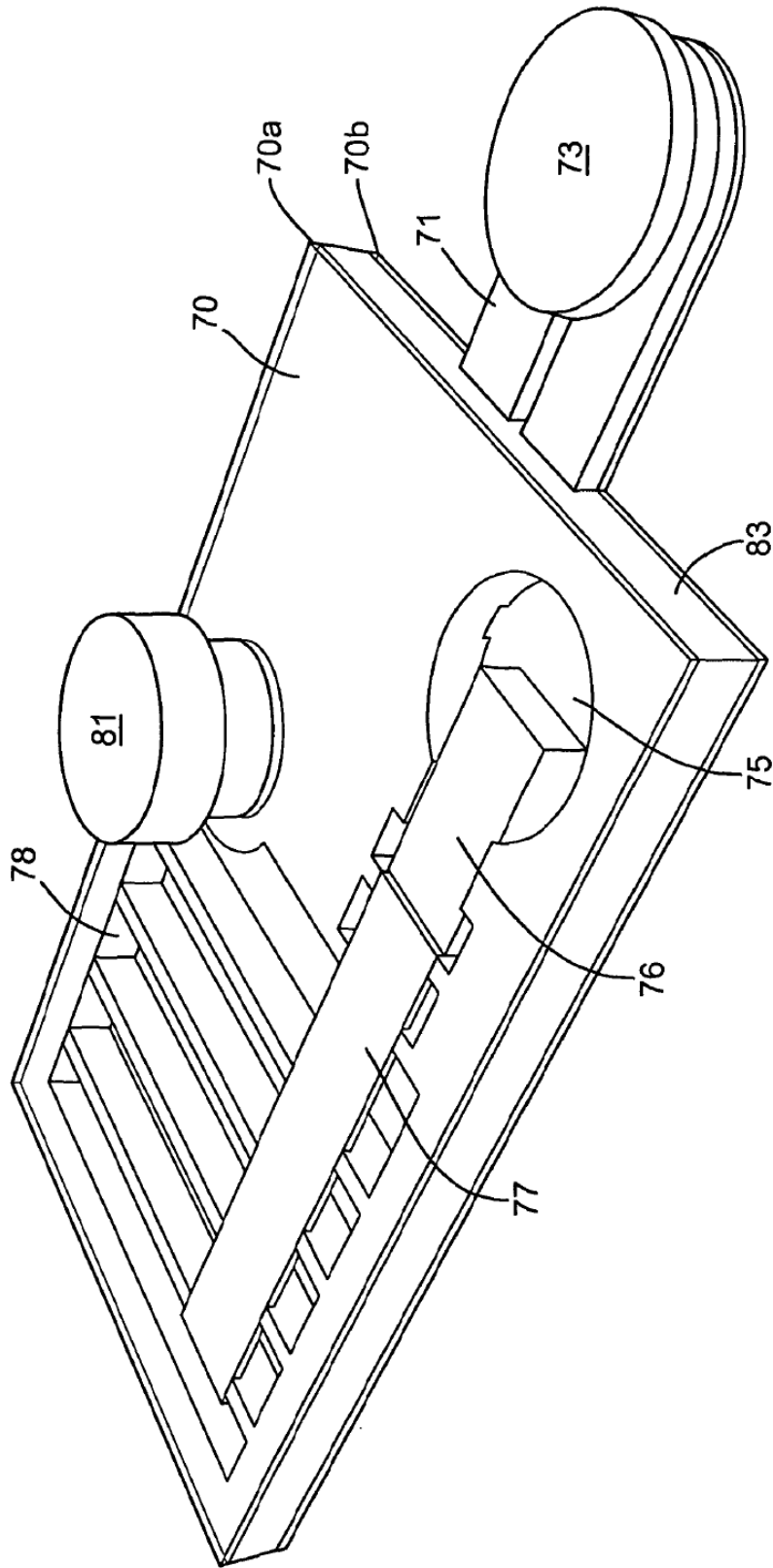


Figura 5

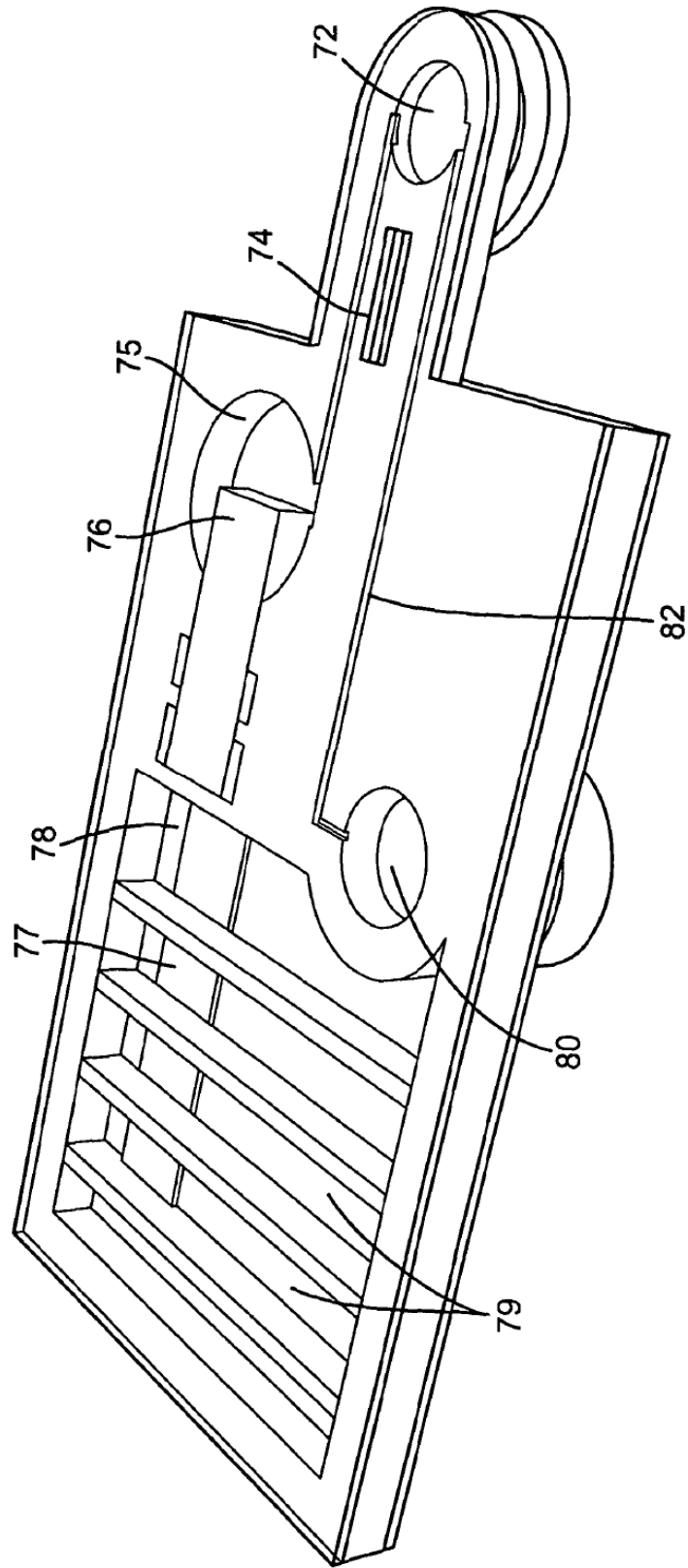


Figura 6

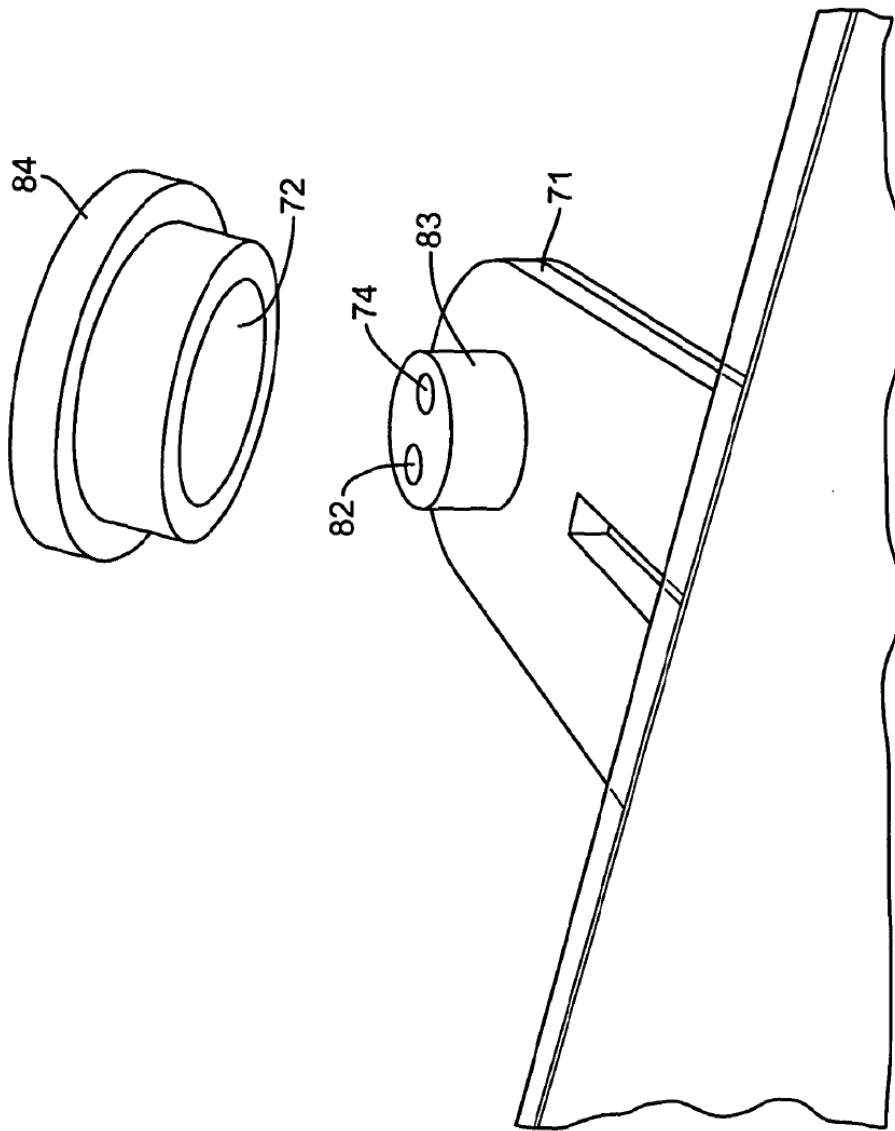


Figura 7

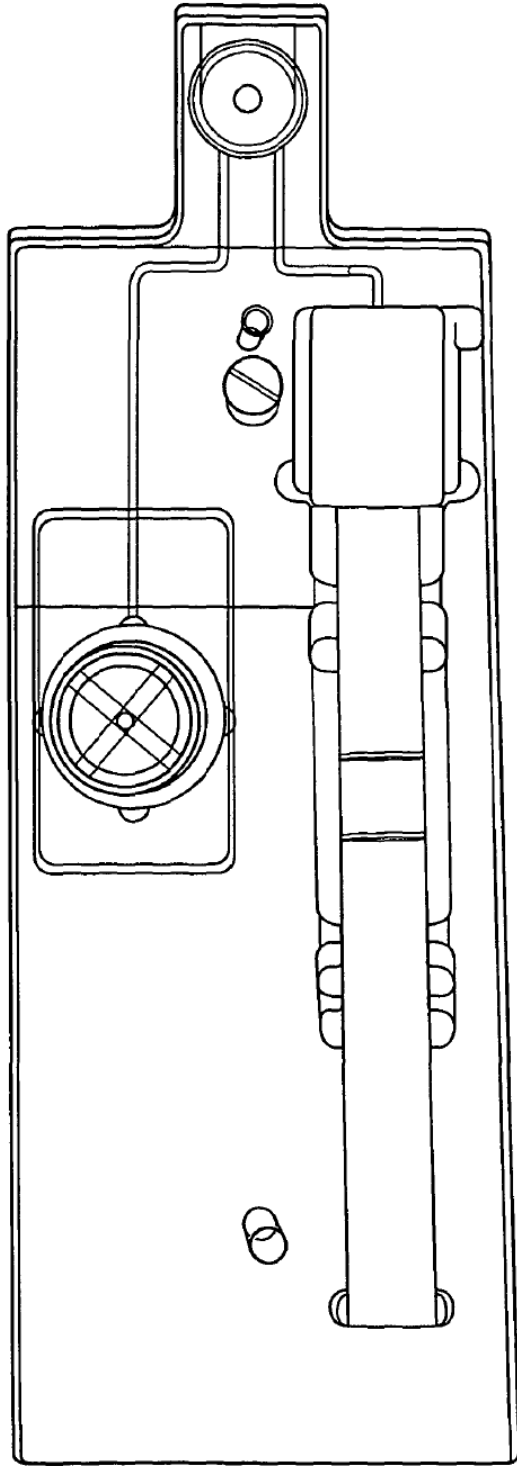


Figura 8