

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 717 940**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/6816** (2008.01)

**C12Q 1/6848** (2008.01)

**C12Q 1/70** (2006.01)

**B01L 3/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.07.2008 E 12192879 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.12.2018 EP 2610007**

54 Título: **Ensayos**

30 Prioridad:

**23.07.2007 US 951358 P**

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

**26.06.2019**

73 Titular/es:

**ALERE TECHNOLOGIES GMBH (100.0%)  
Löbstedter Strasse 103 - 105  
07749 Jena, DE**

72 Inventor/es:

**ERMANTRAUT, EUGEN;  
KAISER, THOMAS;  
SCHULZ, TORSTEN;  
STEINMETZER, KATRIN y  
ULLRICH, THOMAS**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

**ES 2 717 940 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**

Ensayos

**5 CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere a ensayos, por ejemplo, ensayos para polinucleótidos.

**ANTECEDENTES**

10 La presencia de un patógeno en una muestra biológica se puede determinar analizando la muestra en busca de un polinucleótido asociado con la presencia del patógeno. Las bacterias, el moho y los virus son ejemplos de patógenos que se pueden determinar en base a un ensayo para polinucleótidos asociados.

15 Yuen *et al.* (2001, Genome research, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 11:405-412) divulga un módulo de microchip para la preparación de muestras de sangre y reacciones de amplificación de ácidos nucleicos. El documento EP 0 637 999 divulga dispositivos para amplificar un polinucleótido preseleccionado en una muestra mediante la realización de una reacción de polimerización de polinucleótidos. Los dispositivos comprenden un sustrato microfabricado para definir un puerto de entrada de muestra y un sistema de flujo de mesoescala, que se  
20 extiende desde el puerto de entrada. El sistema de flujo de mesoescala incluye una cámara de reacción de polimerización de polinucleótidos en comunicación fluida con el puerto de entrada que se proporciona con los reactivos necesarios para la polimerización y amplificación de un polinucleótido preseleccionado. Los dispositivos se pueden utilizar para implementar una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en la cámara de reacción (cámara de PCR). La cámara de PCR se proporciona con el polinucleótido de muestra, polimerasa, trifosfatos de nucleósido,  
25 cebadores y otros reactivos necesarios para la reacción en cadena de la polimerasa, y el dispositivo se proporciona con medios para controlar térmicamente la temperatura del contenido de la cámara de reacción a una temperatura controlada para deshibridar el polinucleótido bicatenario, hibridar los cebadores, y polimerizar y amplificar el polinucleótido.

30 Sin embargo, puede ser difícil coordinar apropiadamente diversas tareas de los dispositivos microfluídicos convencionales.

**SUMARIO**

35 Puede existir la necesidad de un dispositivo y un procedimiento que permita el análisis de muestras de una manera sencilla. De acuerdo con una divulgación ejemplar, se proporciona un dispositivo, comprendiendo el dispositivo un sustrato rígido, un elemento de cubierta flexible que cubre al menos parcialmente el sustrato, una primera estructura formada en el sustrato, adaptada para alojar líquidos y adaptada para liberar contenidos de uno o más células, esporas o virus, incluyendo los contenidos las moléculas diana (por ejemplo, un tampón secado en la estructura o  
40 cámara o pocillo), una segunda estructura (que puede diferir de la primera estructura) formada en el sustrato, adaptada para alojar líquidos y que comprende al menos un miembro de unión adaptado para capturar las moléculas diana y para determinar un valor indicativo de la presencia y/o cantidad de las moléculas diana, una red microfluídica que interconecta al menos la primera estructura y la segunda estructura, y un miembro de accionador adaptado para efectuar un flujo de fluido entre la primera estructura y la segunda estructura presionando el elemento de cubierta flexible contra el sustrato para cerrar selectivamente una parte de la red microfluídica.  
45

De acuerdo con otra divulgación ejemplar, se proporciona un dispositivo, comprendiendo el dispositivo una estructura adaptada para alojar líquidos, en el que la estructura comprende al menos un miembro de unión y está en comunicación fluida con una red microfluídica, y una unidad de control adaptada para controlar un flujo de fluido a  
50 través de la red microfluídica de tal manera que se capturen las moléculas diana en al menos un miembro de unión, adaptado para controlar una amplificación de las moléculas diana en la estructura, y adaptado para controlar la detección de compuestos indicativos de la presencia y/o cantidad de las moléculas diana y capturadas en el al menos un miembro de unión.

55 De acuerdo con otro modo de realización ejemplar, se proporciona un procedimiento, comprendiendo el procedimiento alojar líquidos en una estructura que comprende al menos un miembro de unión y está en comunicación fluida con una red microfluídica, controlando un flujo de fluido a través de la red microfluídica de tal manera que se capturen las moléculas diana en el al menos un miembro de unión, amplificando las moléculas diana en la estructura y detectando compuestos indicativos de la presencia y/o cantidad de las moléculas de diana y capturadas en el al menos un miembro de unión.  
60

De acuerdo con todavía otra divulgación ejemplar, se proporciona un dispositivo, comprendiendo el dispositivo una estructura adaptada para alojar líquidos, en el que la estructura comprende un primer miembro de unión adaptado para capturar un primer compuesto y comprende un segundo miembro de unión (que puede diferir del primer miembro de unión) adaptado para capturar un segundo compuesto (que puede diferir del primer compuesto) indicativo de la presencia y/o cantidad del primer compuesto.  
65

De acuerdo con una divulgación ejemplar, se puede proporcionar un dispositivo en el que se guía una muestra, bajo el control de una unidad de control, a través de un dispositivo microfluídico de tal manera que realice una tarea de análisis predefinida. En el dispositivo, se puede proporcionar un pocillo central/estructura central (que también se puede indicar como segundo pocillo o segunda estructura) que puede realizar varios o todos los procedimientos de acoplamiento en fase sólida necesarios durante el análisis. En la estructura (que se puede indicar como un pocillo central), puede ser posible capturar moléculas diana de una muestra (para propósitos de purificación o separación), amplificar moléculas diana (por ejemplo, mediante reacción en cadena de la polimerasa, PCR) y realizar un procedimiento de detección (por ejemplo, óptico) que permita obtener información con respecto a la presencia/ausencia o incluso la cantidad de moléculas diana.

Por lo tanto, se puede proporcionar un sistema de análisis bioquímico potente y completamente automático, que puede permitir obtener, de manera rápida y exacta y sin la necesidad de mucha mano de obra, un resultado bioquímico o médico. Por ejemplo, con dichos dispositivo, puede ser posible detectar ácidos nucleicos asociados con una infección por el VIH en una muestra de sangre completa de un paciente, de manera cualitativa o cuantitativa.

A continuación, se explicarán otras divulgaciones ejemplares de los dispositivos. Sin embargo, estas divulgaciones también se aplican al procedimiento.

De acuerdo con una divulgación ejemplar, los compuestos que se detectan en el pocillo central son las moléculas diana. Para este propósito, el pocillo central se puede proporcionar con miembros de unión específicos (por ejemplo, miembros de unión que difieren de otros miembros de unión necesarios para capturar las moléculas diana). En otras palabras, en dicho ejemplo, las moléculas diana (por ejemplo, ácidos nucleicos que se originan a partir de virus libres y asociados a las células, tales como el VIH que comprende ARN originado a partir de virus libres, ARN que se origina a partir de virus asociados a células, ADN provírico, ADN vírico retrotranscrito, es decir, los "intermedios" de la replicación vírica, y los transcritos derivados de ADN provírico, es decir, moléculas de ARN obtenidas por transcripción del genoma del ADN del huésped) se pueden unir a los miembros de unión.

De forma alternativa, también es posible proporcionar compuestos específicos tales como compuestos indicadores que pueden tener la capacidad de unirse, por ejemplo, a un producto de PCR, a ARN o a ADN. En dicho escenario, los compuestos indicadores pueden ser los compuestos que se detectan, permitiendo de este modo obtener indirectamente información con respecto a la presencia y/o cantidad de moléculas diana en una muestra.

El al menos un miembro de unión se puede adaptar para capturar las moléculas diana. Por ejemplo, el al menos un miembro de unión puede comprender microesferas marcadas que pueden capturar complejos que incluyen moléculas diana tales como ácidos nucleicos víricos totales.

El al menos un miembro de unión se puede adaptar para capturar compuestos indicativos de la presencia y/o cantidad de las moléculas diana. Por tanto, no solo las moléculas diana individuales separadas se pueden detectar directamente, sino que también es posible detectar moléculas diana indirectamente, por ejemplo, detectando compuestos indicadores capturados en un miembro de unión.

El al menos un miembro de unión puede comprender un primer miembro de unión adaptado para capturar las moléculas diana y puede comprender un segundo miembro de unión (que puede diferir del primer miembro de unión) adaptado para capturar compuestos indicadores indicativos de la presencia y/o cantidad de las moléculas diana. Por lo tanto, se pueden proporcionar dos tipos diferentes de compuestos, uno específicamente para capturar las moléculas diana después de la lisis, por ejemplo, capturar moléculas que comprenden una parte de unión específica para una región de un polinucleótido diana y un grupo de anclaje; el otro para propósitos de detección, por ejemplo, compuestos indicadores que pueden formar complejos con el polinucleótido diana, inhibiendo la formación de complejos con el polinucleótido diana la captura del compuesto indicador por el segundo miembro de unión. En otras palabras, la captura se puede desacoplar funcionalmente de la detección. Por ejemplo, el primer miembro de unión puede ser microesferas que están configuradas para unir complejos que comprenden una molécula de captura y una molécula diana, por ejemplo, uniendo un grupo de anclaje de la molécula de captura, mientras que el segundo miembro de unión puede ser una superficie del pocillo central que puede capturar compuestos indicadores. La superficie del pocillo central, que es el segundo miembro de unión, puede comprender una o más moléculas de captura específicas de indicador diferentes que pueden capturar un compuesto indicador sobre la superficie.

La estructura, es decir, el miembro central en el que se producen los diversos procedimientos de acoplamiento en fase sólida, puede ser un pocillo. Un "pocillo" puede ser una indentación o un rebajo formado en un sustrato y que proporciona una cámara de muestra en la que se pueden realizar diversos procedimientos de análisis. Dicho pocillo puede ser una estructura cilíndrica o una celda que tenga un volumen del orden de magnitud entre microlitros y mililitros.

El pocillo central o segunda estructura se pueden sellar de manera irreversible, por ejemplo, sellando una entrada y, opcionalmente, una salida del pocillo central.

La red microfluídica puede comprender un canal o una pluralidad de canales interconectados. Un "canal" puede indicar una estructura fluídica (por ejemplo, una estructura esencialmente unidimensional) que tiene una longitud que es significativamente mayor que una anchura y una altura, proporcionando de este modo una vía a lo largo de la cual se pueden transportar líquidos. Se puede proporcionar un solo canal, o varios canales pueden estar interconectados para formar un sistema de canales. Dicho sistema de canales puede permitir un flujo de líquido de un canal a otro canal en las bifurcaciones de dicho sistema. Uno o más pocillos pueden estar integrados en dicho sistema de canales.

Además de una estructura como se describe anteriormente, por ejemplo, la estructura "central", la red microfluídica puede comprender al menos una estructura adicional. En otras palabras, aparte de los canales y el pocillo central, se pueden proporcionar miembros microfluídicos adicionales, tales como canales adicionales y/o pocillos adicionales. Por lo tanto, se puede proporcionar un complejo sistema de pocillos y canales.

Al menos una estructura adicional (tal como una estructura de lisis o un pocillo de lisis) se puede adaptar para liberar contenidos de una o más células, esporas o virus, incluyendo los contenidos las moléculas diana. Por tanto, dicha estructura adicional se puede indicar como una cámara de lisis en la que compuestos biológicos, tales como células, están forzados a liberar su contenido, para su análisis posterior. En otras palabras, la estructura adicional puede comprender una estructura que comprende agentes bioquímicos que realizan dichas tareas para liberar los contenidos, proporcionando de este modo una muestra modificada para su transporte al pocillo central. Para este fin, la estructura adicional, tal como una estructura de lisis, puede comprender un reactivo de lisis, por ejemplo, sales caotrópicas o un reactivo que comprende uno o más detergentes que desintegran las membranas celulares y/o las cápsides víricas. De forma alternativa o además, la estructura adicional, por ejemplo, el pocillo de lisis, se puede adaptar para calentar la muestra para destruir membranas celulares y/o cápsides víricas (por ejemplo, empleando o comprendiendo una unidad de control de temperatura y/o unidad de regulación de temperatura como se describe a continuación).

La al menos una estructura adicional también puede comprender sondas de captura que pueden formar complejos con las moléculas diana. Por lo tanto, puede ser posible lisisar una muestra en presencia de moléculas de captura con grupos de anclaje.

Al menos una estructura adicional (tal como un pocillo que comprende reactivos de PCR) puede comprender al menos una sustancia que promueve la amplificación de las moléculas diana. En otras palabras, se puede proporcionar un pocillo adicional que comprende agentes bioquímicos necesarios para, es decir, promover la amplificación. Sin embargo, aunque los agentes de PCR se pueden incluir en la estructura adicional, el procedimiento de amplificación por PCR real se puede llevar a cabo en otra posición, a saber, en el pocillo central. Sin embargo, como se explicará a continuación con más detalle, puede ser ventajoso transportar la muestra desde el pocillo central a través del pocillo que incluye las sustancias de amplificación hasta el pocillo central nuevamente para evitar la pérdida de material de muestra. Las sustancias que promueven la amplificación pueden ser sustancias necesarias para la PCR (tal como enzima, cebador, tampón, etc.) y se describen en detalle a continuación.

La al menos una estructura adicional también puede ser un pocillo. Por lo tanto, se puede proporcionar una pluralidad de pocillos conectados por la red microfluídica. Sin embargo, también puede ser posible realizar la lisis y/o proporcionar material de amplificación en otras estructuras distintas de los pocillos, por ejemplo en canales.

El dispositivo puede comprender un sustrato, sobre y/o en el que se puede formar la(s) estructura(s). Por lo tanto, los componentes del dispositivo que alojan fluidos pueden estar integrados monolíticamente en el sustrato. De forma alternativa, la(s) estructura(s) se puede(n) formar sobre un sustrato, por ejemplo, impreso o manchado. Ejemplos de materiales de un sustrato rígido que pueden cooperar apropiadamente con un elemento de cubierta flexible son policarbonato, polipropileno, poliestireno, PET, PMMA, polietileno, vidrio acrílico, PU, PEEK, PVC, vidrio y similares.

En particular, el sustrato puede ser rígido, lo que permite cooperar con uno o más elementos de cubierta flexibles que cubren al menos parcialmente el sustrato de una manera muy eficaz. En particular, el elemento de cubierta flexible puede cubrir el sustrato rígido, y un accionador puede presionar el elemento de cubierta contra el sustrato para cerrar canales selectivamente (para realizar funciones de válvula o similares).

De acuerdo con una divulgación ejemplar, el sustrato puede tener una primera superficie y una segunda superficie opuesta a la primera superficie. La estructura se puede proporcionar sobre y/o en la primera superficie (en particular una primera superficie principal) del sustrato. La superficie principal es la superficie principal del sustrato sobre la cual se configura la estructura. Se puede proporcionar una estructura adicional sobre y/o en la segunda superficie (en particular, una segunda superficie principal) del sustrato. Se puede proporcionar una estructura de conexión fluídica, en particular un orificio pasante que penetra en el sustrato y/o una ranura en una parte de superficie del sustrato que conecta la primera superficie con la segunda superficie. Dicha estructura de conexión fluídica puede estar dispuesta entre la primera y la segunda superficie y se puede configurar para proporcionar una comunicación fluida de la estructura con la estructura adicional. En dicho ejemplo, el sustrato se puede procesar en dos superficies principales opuestas para formar de este modo estructuras microfluídicas. Estas estructuras pueden estar

conectadas por la estructura de conexión que puede comprender canales formados a lo largo de una superficie del sustrato, o directamente discurrir a través del sustrato. Por lo tanto, se puede proporcionar un dispositivo en el que ambas partes de superficie principal del sustrato se puedan usar de una manera muy eficaz, ya que ambas superficies principales de dicho sustrato se pueden procesar para proporcionar tareas de transporte de líquidos.

5 Opcionalmente, dicho sustrato se puede cubrir en uno o ambos lados con un elemento de cubierta (en particular, flexible), permitiendo de este modo controlar el flujo de fluido a través de estructuras fluídicas en ambas superficies eficazmente, por ejemplo, mediante accionadores que actúan sobre partes flexibles en una o ambas superficies principales. Por tanto, se puede proporcionar un sustrato central que tiene estructuras fluídicas en ambos lados. En particular, esto puede permitir fabricar un cartucho formado por tres capas, a saber, el sustrato y dos elementos de

10 cubierta al menos parcialmente flexibles. Dicha estructura de tres capas puede tener un elemento de base (por ejemplo, flexible) y un elemento de cubierta (por ejemplo, flexible) que intercalan una capa intermedia (por ejemplo, rígida) que aloja las estructuras microfluídicas. El elemento de base y/o el elemento de cubierta pueden cubrir el sustrato central en su totalidad o solo parcialmente, por ejemplo, en posiciones en las que se desea una función de cubierta como base para un control basado en un accionador (véase, por ejemplo, la FIG. 21).

15 Además del sustrato, el dispositivo puede comprender al menos un sustrato adicional, en el que se puede proporcionar una estructura adicional sobre y/o en el sustrato adicional. El sustrato y el sustrato adicional se pueden adaptar para ser conectables o montables o ensamblables o instalables de manera reversible o desmontable entre sí de tal manera que la estructura y la estructura adicional se puedan poner en comunicación fluida en un estado de

20 funcionamiento en el que el sustrato está conectado o montado o ensamblado o instalado con el sustrato adicional. De acuerdo con dicho ejemplo, se puede proporcionar una construcción modular en la que se puede formar un dispositivo combinando varios módulos que se pueden conectar de manera flexible entre sí. Un cartucho correspondiente puede estar formado por un conjunto de construcción modular, en el que cada uno de los módulos puede tener las siguientes propiedades y se puede usar en combinación con otros módulos formados

25 cooperativamente:

- comprende una cámara que tiene al menos dos conexiones de fluido;
- la cámara comprende un componente rígido y un componente elástico;
- al menos una conexión de fluido se puede cerrar mediante el movimiento del componente elástico, y se puede efectuar una mezcla del contenido de la cámara.

30 El al menos un miembro de unión se puede adaptar de modo que una pluralidad de procedimientos de acoplamiento en fase sólida durante un análisis de las moléculas diana se produzca en el al menos un miembro de unión. El término "procedimiento de acoplamiento en fase sólida" puede incluir en particular cualquier tipo de anclaje e hibridación, etc., en un miembro de funcionalización/unión. En este contexto, el "miembro de unión o miembro de soporte" puede incluir cualquier sustancia, superficie o funcionalización que esté configurada para unir un grupo de anclaje de moléculas de captura y/o una superficie que esté configurada para capturar polinucleótidos. Los

35 procedimientos de acoplamiento en fase sólida pueden incluir cualquier procedimiento en el que las moléculas que se van a analizar o detectar estén específicamente unidas a una superficie sólida, es decir, no estén unidas en una solución sino en una superficie sólida.

40 El al menos un miembro de unión se puede adaptar de modo que todos los procedimientos de acoplamiento en fase sólida durante un análisis de las moléculas diana se produzcan en el al menos un miembro de unión. En otras palabras, en dicho ejemplo, no se producen procedimientos de acoplamiento en fase sólida en otro pocillo que no sea en el pocillo/estructura central. Esto puede permitir realizar todos los procedimientos de acoplamiento en fase sólida en un solo pocillo, lo que permite un dispositivo en miniatura y de alto rendimiento. El al menos un miembro de

45 unión se puede adaptar de modo que exactamente dos procedimientos de acoplamiento en fase sólida durante un análisis de las moléculas diana se produzcan en el al menos un miembro de unión. Estos dos procedimientos de acoplamiento en fase sólida se pueden relacionar con la captura de moléculas diana de una muestra multicomponente, y con la detección de compuestos indicativos de la presencia o ausencia o la cantidad de las moléculas diana. En el ejemplo descrito, estos dos procedimientos se realizan en un solo pocillo, lo que permite usar

50 sinérgicamente las disposiciones del pocillo para ambas tareas. La combinación de estas dos tareas en un pocillo puede mantener las vías de flujo de líquido cortas, mantener el dispositivo pequeño y mantener el tiempo de análisis corto.

55 El al menos un miembro de unión se puede adaptar de modo que exactamente tres procedimientos de acoplamiento en fase sólida durante un análisis de las moléculas diana se produzcan en el al menos un miembro de unión. Estos tres procedimientos de acoplamiento en fase sólida se pueden relacionar con la captura de moléculas diana de una muestra multicomponente, la captura de ácidos nucleicos resultantes de la transcripción inversa de ácidos nucleicos diana y la detección de compuestos indicativos de la presencia o ausencia o la cantidad de las moléculas diana. En el ejemplo descrito, estos tres procedimientos se realizan en un solo pocillo, lo que permite usar sinérgicamente las

60 disposiciones del pocillo para todas estas tareas. La combinación de estas tres tareas en un pocillo puede mantener las vías de flujo de líquido cortas, mantener el dispositivo pequeño y mantener el tiempo de análisis corto.

- De forma alternativa, el al menos un miembro de unión se puede adaptar de manera que exactamente un procedimiento de acoplamiento en fase sólida durante un análisis de las moléculas diana en la muestra se produce en al menos un miembro de unión. Dicho ejemplo puede ser ventajoso en particular, cuando el análisis bioquímico completo o el experimento solo comprende un único procedimiento de acoplamiento en fase sólida, por ejemplo, solo se prevé para la purificación de la muestra, no para la detección.
- Al menos una parte del dispositivo situado adyacente al al menos un miembro de unión puede ser transparente para la radiación electromagnética en un intervalo de longitudes de onda entre esencialmente 1 nm y esencialmente 10  $\mu\text{m}$  para permitir de este modo una detección basada en la radiación electromagnética de los compuestos indicativos para la presencia y/o cantidad de las moléculas diana y capturadas en al menos un miembro de unión. En dichos ejemplos, en particular una parte del sustrato cerca del pocillo central puede ser transparente para la radiación electromagnética usada con fines de detección, en particular para la radiación electromagnética en el dominio del infrarrojo cercano, óptico y ultravioleta. Al adoptar esta medida, puede ser posible realizar también la detección en función de la radiación electromagnética (por ejemplo, una detección basada en fluorescencia) en el pocillo central. Cuando la parte del dispositivo situada adyacente al al menos un miembro de unión es transparente para la radiación electromagnética en un intervalo de longitudes de onda entre esencialmente 400  $\mu\text{m}$  y esencialmente 800  $\mu\text{m}$ , se permite una detección óptica de los compuestos.
- El dispositivo puede comprender o se puede conectar con una unidad de manipulación de la temperatura adaptada para manipular una temperatura de líquidos situados en la estructura. Dicha unidad de manipulación de la temperatura puede comprender un elemento de calentamiento y/o enfriamiento que permita llevar una muestra a una temperatura específica, o realizar un patrón o secuencia de temperatura específicos.
- La unidad de manipulación de temperatura se puede adaptar para manipular una temperatura de líquidos situados en la estructura de acuerdo con una secuencia de temperatura para realizar una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Dicha reacción en cadena de la polimerasa puede requerir ciclos de temperatura hasta, por ejemplo, aproximadamente 95 °C, aproximadamente 55 °C y aproximadamente 72 °C. Dicha secuencia de temperaturas normalmente se tiene que realizar para intervalos de tiempo predefinidos específicos y se tiene que repetir una pluralidad de veces predefinida.
- El al menos un miembro de unión se puede configurar para unirse a un grupo de anclaje de una molécula de captura. En particular, el al menos un miembro de unión puede estar configurado para capturar polinucleótidos.
- El al menos un miembro de unión puede comprender al menos uno del grupo que consiste en moléculas de captura, por ejemplo, moléculas de captura específicas de indicador, dispuestas en una superficie de la estructura (por ejemplo, inmovilizadas en el pocillo), moléculas de captura dispuestas en partículas (por ejemplo, en microesferas), moléculas de captura dispuestas en una superficie porosa de la estructura (por ejemplo, una estructura de vidrio poroso), y una o más moléculas de captura diferentes, por ejemplo, moléculas de captura específicas de indicador, dispuestas en diferentes localizaciones con respecto a una superficie de la estructura (por ejemplo, estando inmovilizadas diferentes tipos de moléculas de captura de forma similar a una matriz, por ejemplo, en el contexto de un ensayo competitivo). El al menos un miembro de unión también puede comprender moléculas de captura para capturar un grupo de anclaje tal como biotina.
- La estructura puede tener un volumen en un intervalo entre esencialmente 1  $\mu\text{l}$  y esencialmente 1 ml, en particular en un intervalo entre esencialmente 20  $\mu\text{l}$  y esencialmente 300  $\mu\text{l}$ . Por ejemplo, se puede proporcionar un pocillo que tenga un volumen de esencialmente 100  $\mu\text{l}$ .
- El sustrato puede tener una ranura configurada para recibir una cánula para suministrar líquidos al dispositivo. En dicho ejemplo, puede ser muy fácil para un usuario manejar el dispositivo, ya que la cánula para el suministro de muestras simplemente se tiene que colocar en la ranura para que esté en debida correspondencia y cooperación con el sistema de canales microfluídico, permitiendo de este modo un fácil análisis que pueden realizar incluso usuarios que no están específicamente capacitados o formados.
- El sustrato puede tener una parte de ventana adyacente a la estructura y ser transparente para la radiación electromagnética en un intervalo de longitudes de onda entre esencialmente 1 nm y esencialmente 10  $\mu\text{m}$  (es decir, para radiación en el infrarrojo cercano, óptica o ultravioleta), en particular en un intervalo de longitudes de onda entre esencialmente 400 nm y esencialmente 800 nm (es decir, en particular para la radiación óptica), para permitir de este modo una detección basada en la radiación electromagnética de un menisco de un líquido que fluye a través de (más precisamente alcanza) la estructura o la red microfluídica. En dicho ejemplo, un detector de radiación puede detectar una parte de ventana ópticamente transparente del sustrato. Cuando un menisco de un fluido bombeado a través de la red microfluídica o la estructura pasa por la parte de ventana, esto puede cambiar bruscamente las propiedades de transmisión a través de la parte de ventana de una manera característica, generando de este modo una señal en un detector de radiación indicativa del hecho de que el menisco ha alcanzado una región específica en el dispositivo. Esta señal puede ser útil para propósitos de activación, o como una señal de control para accionadores, debido a que el movimiento cooperativo de los accionadores y/o el control de las unidades de

manipulación de la temperatura se pueden llevar a cabo en debida correspondencia con la posición actual de una muestra que se esté bombeando a través del dispositivo. Por ejemplo, al adoptar dicha medida, se puede detectar que un volumen predefinido de agua o tampón se ha bombeado al dispositivo, cuando se produce un desbordamiento.

5 Al menos uno del grupo que consiste en la estructura y la estructura adicional puede comprender dos aberturas de fluido. Dichas aberturas de fluido pueden ser una entrada de fluido y una salida de fluido.

10 El elemento de cubierta puede ser un elemento de cubierta flexible. En particular en cooperación con un sustrato rígido, el elemento de cubierta y el sustrato pueden formar canales sellados tridimensionalmente que se pueden controlar apropiadamente por accionadores que actúan sobre el elemento de cubierta. Cuando el elemento de cubierta es al menos parcialmente deformable en una posición específica bajo la influencia de una fuerza externa, puede ser posible activar o desactivar selectivamente un flujo de líquidos abriendo o cerrando la estructura o la red microfluídica. Más allá de esto, es posible un transporte de líquidos a lo largo de la estructura con dicho elemento de cubierta.

15 En particular, cuando se proporciona un miembro de accionador y se adapta para que se accione para deformar el elemento de cubierta, se puede proporcionar un laboratorio en un chip de alto rendimiento que tiene funciones integradas de mezcla, bombeo y/o válvula.

20 Cualquiera de las estructuras puede comprender una o más sustancias que son biológicamente, bioquímicamente y/o químicamente activas. Por lo tanto, cuando dichas sustancias, que pueden incluir moléculas de captura, moléculas de captura específicas de indicador, marcadores detectables, reactivos de lisis y reactivos de PCR, están presentes en los pocillos en forma secada, en particular en forma liofilizada, es posible proporcionar un dispositivo que el usuario simplemente tiene que llenar con líquidos (tales como agua, tampones y muestras) para realizar un análisis completamente automático. Cuando se proporcionan los componentes bioquímicos necesarios en los diferentes pocillos, un usuario puede simplemente comenzar un experimento basándose en una secuencia almacenada en la unidad de control y puede proporcionar agua o tampones a diferentes cámaras de entrada. El resto lo realizará el dispositivo completamente automático.

25 El canal puede tener una anchura (es decir, una dimensión en un plano superficial del sustrato y perpendicular a una dirección de flujo del fluido) en un intervalo entre esencialmente 50  $\mu\text{m}$  y esencialmente 1 mm, particularmente en un intervalo entre esencialmente 100  $\mu\text{m}$  y esencialmente 300  $\mu\text{m}$ . Por ejemplo, una anchura del canal puede ser esencialmente de 200  $\mu\text{m}$ . Una altura (que es una dimensión en una dirección perpendicular a un plano superficial del sustrato y perpendicular a una dirección de flujo del fluido) del canal puede estar en un intervalo entre esencialmente 20  $\mu\text{m}$  y esencialmente 300  $\mu\text{m}$ , particularmente en un intervalo entre esencialmente 50  $\mu\text{m}$  y esencialmente 200  $\mu\text{m}$ . Por ejemplo, una altura del canal puede ser esencialmente de 100  $\mu\text{m}$ . En contraste con esto, la longitud del canal puede ser mucho mayor que la anchura y la altura, por ejemplo, puede ser mayor que 1 mm, en particular puede ser mayor que 1 cm o incluso puede ser de varios centímetros.

35 La estructura puede comprender un material adaptado como medio de transporte para líquidos. Por ejemplo, el material puede comprender al menos uno del grupo que consiste en un material sólido, un material de gel, un material líquido y una combinación de los mismos. Por lo tanto, la estructura puede ser un rebajo o puede estar formada por un material que sirve de vehículo para los líquidos.

40 El elemento de cubierta puede comprender una membrana flexible o un sellado flexible. Dicha membrana flexible o sellado flexible puede estar hecho de materiales tales como látex, permitiendo de este modo que el elemento de cubierta se deforme de forma flexible bajo la influencia de una fuerza mecánica (por ejemplo, generada por un miembro de accionador).

45 El dispositivo puede comprender un miembro de accionador adaptado para ser accionado para deformar el elemento de cubierta para controlar de este modo una propiedad de flujo de fluido de líquidos en la estructura y/o en la red microfluídica. Dicho miembro de accionador puede estar bajo el control de la unidad de control y puede tener una pluralidad de pasadores colaboradores o plantillas que actúen sobre el elemento de cubierta flexible para, de este modo, abrir o cerrar selectivamente canales, reducir temporalmente el volumen de un canal o pocillo para propósitos de bombeo o mezcla, etc.

50 El miembro de accionador se puede adaptar en particular para controlar una propiedad de flujo de fluidos de líquidos a lo largo de una parte recta de un canal. Cuando un fluido fluye a lo largo de un canal recto, un miembro de accionador dispuesto perpendicularmente puede desactivar eficazmente un flujo de fluidos cuando este canal está cerrado en una parte específica.

55 El miembro de accionador se puede adaptar para funcionar como una válvula, como un mezclador de fluidos y/o como una bomba de fluidos.

60

65

- Más en particular, el miembro de accionador puede comprender una pluralidad de elementos de accionador adaptados para ser accionados de forma cooperativa para deformar el elemento de cubierta para controlar de este modo la propiedad de flujo de fluidos de los líquidos de acuerdo con un esquema de flujo de fluidos definido por la unidad de control. Por lo tanto, cuando un usuario ha seleccionado un experimento o ensayo específico, que implica el transporte de fluidos y muestras a través de diversos canales, la unidad de control simplemente controla las plantillas individuales del miembro de accionador para proporcionar dicha compresión reversible del elemento de cubierta flexible, para, de este modo, realizar el ensayo de forma completamente automática.
- La unidad de control puede estar adaptada para controlar el miembro de accionador para deformar el elemento de cubierta de tal manera que las moléculas diana se capturen en al menos un miembro de unión, que las moléculas diana se amplifiquen en la estructura y que se detecten los compuestos que sean indicativos de la presencia y/o la cantidad de las moléculas diana y capturadas en al menos un miembro de unión. Por tanto, la unidad de control puede ser el regulador central del dispositivo que armonice la función de los diversos componentes.
- El miembro de accionador puede comprender uno o más pasadores configurados para que se muevan de forma alternativa. Al mover un pasador en una dirección hacia adelante, se puede cerrar un canal presionando el elemento de cubierta flexible hacia el sustrato en este canal. Cuando el pasador se mueve hacia atrás, el canal se puede abrir nuevamente para permitir un flujo de fluido. El uno o más pasadores pueden tener una punta al menos parcialmente elástica.
- El miembro de accionador se puede proporcionar además para que se pueda mover en una dirección perpendicular a una superficie principal del sustrato. Mediante el movimiento alternativo en una dirección que es perpendicular al sustrato plano, se puede hacer posible una abertura y cierre eficaces. En particular, el miembro de accionador se puede proporcionar de forma móvil para cerrar selectivamente al menos una parte de la estructura para desactivar el transporte de líquidos a través de la estructura. En otro modo de funcionamiento, el miembro de accionador se puede mover para abrir selectivamente al menos una parte de la estructura para activar el transporte de líquidos a través de la estructura.
- El miembro de accionador se puede adaptar para alternarse perpendicularmente a una superficie principal del sustrato para activar o desactivar selectivamente un flujo de fluido de líquidos a través de la estructura. El uso de accionadores alternativos puede permitir activar o desactivar de forma reversible y selectiva los flujos de fluidos, permitiendo un funcionamiento muy flexible del dispositivo y permitiendo usar el dispositivo múltiples veces (a diferencia de los enfoques en los cuales los canales se cierran de forma irreversible para realizar una función de válvula unidireccional).
- El miembro de accionador se puede adaptar para alternar en una dirección perpendicular a una superficie principal del sustrato para bombear líquidos a través de la estructura. Por lo tanto, es posible que el miembro de accionador controle un volumen o altura de la estructura. El miembro de accionador también puede cerrar selectivamente la estructura. El cierre de una estructura se puede realizar en el contexto de una función de válvula, de una función de mezcla o de una función de bombeo. Sin embargo, también es posible usar dicho accionador durante una fase de detección, ya que es posible comprimir la estructura y/o los miembros de unión para propósitos de detección para aumentar la concentración local de moléculas diana que se van a detectar y/o eliminar señales de fondo. Esto puede permitir aumentar la exactitud.
- Se puede proporcionarse una unidad de accionamiento para accionar mecánicamente el miembro de accionador, en el que la unidad de accionamiento puede ser controlable por la unidad de control. Dicha unidad de accionamiento puede comprender un mecanismo de accionamiento neumático, un mecanismo de accionamiento hidráulico o un mecanismo de accionamiento electromagnético.
- El al menos un miembro de unión puede comprender un medio tridimensional, por ejemplo un gel, partículas, microesferas o una matriz porosa. El medio tridimensional se puede disponer y configurar para que sea compresible de manera reversible al mover el miembro de accionador. Al adoptar esta medida, se puede hacer posible una detección muy exacta, ya que la concentración local de las moléculas que se van a detectar se puede aumentar selectivamente comprimiendo el medio tridimensional (tal como las microesferas) que se ha unido a las mismas, compuestos o complejos indicativos de la presencia o la cantidad de las moléculas diana.
- El dispositivo se puede adaptar como un dispositivo de ensayo de biosensor, un cartucho microfluídico o un laboratorio en un chip. Por lo tanto, a pequeña escala, se pueden combinar diversas funciones bioquímicas para realizar un experimento bioquímico completo.
- Se puede proporcionar y adaptar un sensor de temperatura para detectar una temperatura de los líquidos transportados a través del dispositivo. El sensor de temperatura se puede integrar en un sustrato para detectar de este modo la temperatura de los líquidos que fluyen a través de la red microfluídica. De forma alternativa, el sensor de temperatura se puede disponer en el miembro de accionador, por ejemplo, en la punta de un accionador similar a una plantilla, de modo que el accionador, al presionar el elemento de cubierta contra el sustrato, puede medir simultáneamente la temperatura local del fluido.

El dispositivo puede comprender una unidad de manipulación de la temperatura adaptada para manipular una temperatura de líquidos, y preferentemente dispuesta en el miembro de accionador. Dicha unidad de manipulación de la temperatura también se puede integrar dentro del sustrato, por ejemplo, en forma de cables de calentamiento integrados en el sustrato y muestra de calentamiento en el pocillo. De forma alternativa, dicha unidad de manipulación de la temperatura puede ser un dispositivo externo, tal como una fuente de radiación electromagnética externa en la que la radiación electromagnética (por ejemplo, de un láser) se puede dirigir a un pocillo, dando como resultado un calentamiento del fluido en el pocillo usando la radiación electromagnética como fuente de energía. Además, de forma alternativa, la unidad de manipulación de la temperatura puede incluir no o no solo un elemento de calentamiento, sino también un elemento de enfriamiento. Para dicho ejemplo, un enfriador Peltier se puede implementar con un esfuerzo bajo.

Se puede proporcionar y adaptar una unidad de manipulación de la temperatura para manipular una temperatura de líquidos, en la que la unidad de manipulación de temperatura puede comprender un primer elemento de calentamiento y un segundo elemento de calentamiento, estando dispuesta la estructura entre el primer elemento de calentamiento y el segundo elemento de calentamiento. Al proporcionar dos de dichas placas de calentamiento, siendo una una placa continua y siendo la otra una placa anular, el calentamiento se puede realizar sin desactivar el dispositivo que va a funcionar con un detector basado en radiación electromagnética, ya que un rebajo en la placa anular puede permitir que la radiación electromagnética se dirija al pocillo central y puede permitir que la radiación de fluorescencia sea detectada a través del rebajo y el segundo elemento de calentamiento.

De acuerdo con una divulgación ejemplar, al menos uno de los elementos de calentamiento/enfriamiento está montado de manera flexible. El montaje flexible de los elementos de calentamiento/enfriamiento puede permitir una fácil inserción de una estructura, por ejemplo, la segunda estructura o pocillo central, entre los elementos de calentamiento/enfriamiento primero y segundo. Además, el montaje flexible de al menos uno de los elementos de calentamiento/enfriamiento puede permitir adaptar el elemento de calentamiento/enfriamiento flexible flexible a la superficie de la estructura, por ejemplo, la segunda estructura o pocillo central, de modo que el elemento de calentamiento/enfriamiento flexible sea forzado a entrar en contacto con la superficie de la estructura y, por tanto, también permite una conductancia térmica eficaz.

De acuerdo con una divulgación ejemplar, el montaje flexible es un montaje flexible de todo el elemento de calentamiento/enfriamiento.

De acuerdo con otra divulgación ejemplar, el montaje flexible es una flexibilidad del elemento de calentamiento/enfriamiento como tal.

Además, también se pueden montar de manera flexible dos elementos de calentamiento/enfriamiento. Los dos elementos de calentamiento/enfriamiento se pueden disponer en forma de mariposa para intercalar el dispositivo de sonda. De la misma manera, un único elemento de calentamiento/enfriamiento se puede disponer con una placa de contador de presión. Esto puede evitar arañazos al insertar el dispositivo de sonda, en particular cuando los elementos de calentamiento/enfriamiento se moverán hacia las superficies del dispositivo de sonda después de que el dispositivo de sonda haya alcanzado su posición final.

En algunos ejemplos, cada uno de los elementos de calentamiento o enfriamiento, o ambos, es un elemento Peltier.

Se puede proporcionar y adaptar una unidad de regulación de la temperatura para regular la temperatura de los líquidos en la estructura. Dicha entidad de regulación puede incluir la medición de la temperatura real y, basándose en esta medición, el rendimiento de un rendimiento de calefacción y/o enfriamiento para ajustar de este modo la temperatura a un valor deseado.

Se puede proporcionar y adaptar una unidad de detección para detectar, en la estructura, compuestos indicativos de la presencia y/o cantidad de las moléculas diana y capturadas en al menos un miembro de unión. Dicha unidad de detección puede comprender una unidad de detección óptica, en particular una unidad de detección de fluorescencia.

El sustrato y el elemento de cubierta pueden ser componentes separados que están conectados entre sí. De forma alternativa, el sustrato y el elemento de cubierta pueden estar hechos de diferentes materiales.

Se puede proporcionar y adaptar una unidad de transporte para transportar líquidos a través de la estructura y/o la red microfluídica. Dicha unidad de transporte puede comprender una bomba, en particular una del grupo que consiste en una bomba de aire comprimido, una bomba hidráulica, una bomba peristáltica y una bomba de vacío. Además, el dispositivo se puede adaptar de tal manera, durante su uso normal, que la fuerza gravitacional promueva el flujo de líquidos a través del dispositivo de una manera deseada. Por lo tanto, en ausencia de actividad de una unidad de transporte, los líquidos pueden fluir directamente en una dirección deseada. Sin embargo, cuando la unidad de transporte está encendida, la influencia de la unidad de transporte puede ser mayor que la influencia de la gravedad, permitiendo de este modo iniciar selectivamente un flujo de fluidos en una dirección contra la fuerza

gravitacional. Por lo tanto, la combinación de la gravedad y una unidad de transporte especial puede ser altamente ventajosa y puede permitir un funcionamiento con ahorro de energía.

5 La unidad de transporte se puede adaptar para transportar líquidos accionando una burbuja de gas en la estructura y/o en la red microfluídica. Al mover una burbuja de gas a través del dispositivo, se puede apoyar o promover el transporte de los líquidos a través del dispositivo.

10 Al menos un filtro, en particular al menos una frita, se puede disponer en la estructura (es decir, en una entrada y/o en una salida del pocillo central) y se puede adaptar para evitar que el al menos un miembro de unión (por ejemplo, microesferas) dispuesto en la estructura sea retirado mediante lavado de la estructura. Bajo la influencia de un flujo de fluidos, una fuerza mecánica puede actuar sobre las microesferas u otros miembros de unión en la estructura. Sin embargo, cuando se proporciona una frita, es decir, un elemento de filtro poroso que puede estar hecho de un material sinterizado, en una entrada y/o una salida de la estructura, se puede evitar de manera segura que las microesferas se retiren mediante lavado de la cámara central. La frita se puede proporcionar con una conformación anular para permitir que se inserte en una ranura con una conformación anular correspondiente en el dispositivo.

20 El al menos un miembro de unión puede comprender una funcionalización de la superficie. El término "funcionalización de la superficie" puede indicar el hecho de que la superficie se procesa de tal manera que realice una función de unión específica. En dicho ejemplo, el miembro de unión puede ser parte de o estar acoplado o unido a la superficie del pocillo.

25 El sustrato y el elemento de cubierta pueden estar en contacto directo entre sí. De forma alternativa, el sustrato puede estar libre de un contacto directo con el elemento de cubierta. Son posibles diversos modos de realización geométricos.

30 Una parte del sustrato situado adyacente a la estructura puede ser transparente para la radiación electromagnética en un intervalo de longitudes de onda entre esencialmente 400 nm y esencialmente 800 nm para permitir de este modo una detección óptica en la estructura. Por lo tanto, la luz visible se puede usar para fines de detección. Dicha detección se puede realizar sobre la base de la absorción de la luz, la reflexión de la luz o la generación de fluorescencia, por ejemplo usando marcadores de fluorescencia unidos a moléculas o complejos que se van a detectar.

35 El al menos un miembro de unión se puede adaptar de modo que al menos dos procedimientos de acoplamiento en fase sólida durante un análisis de las moléculas diana se produzcan en exactamente uno del al menos un miembro de unión. En otras palabras, uno y el mismo miembro de unión se puede usar para múltiples procedimientos de acoplamiento en fase sólida. Por ejemplo, las microesferas con grupos unidos se pueden usar para capturar moléculas diana de la muestra, y se pueden usar más tarde para capturar compuestos tales como moléculas diana amplificadas y marcadas como base para una detección posterior.

40 De forma alternativa, el al menos un miembro de unión se puede adaptar de modo que al menos dos procedimientos de acoplamiento en fase sólida durante un análisis de las moléculas diana se produzcan en diferentes del al menos un miembro de unión. Por ejemplo, el dispositivo incluye múltiples miembros de unión y al menos un miembro de unión se adapta de modo que al menos dos procedimientos de acoplamiento en fase sólida durante un análisis de las moléculas diana se produzcan en dos o más del al menos un miembro de unión. En dicha configuración, por ejemplo, la captura de moléculas de una muestra, por una parte, y la detección de componentes indicativos de las moléculas diana, por otra parte, se capturan usando dos tipos diferentes de miembros de unión. Por ejemplo, se pueden proporcionar microesferas para capturar las moléculas diana de una muestra. Por otra parte, las moléculas de captura, por ejemplo, moléculas de captura específicas de indicador inmovilizadas en el pocillo se pueden usar en el contexto de un ensayo competitivo para capturar los componentes indicativos de la presencia o la cantidad de moléculas diana en la muestra, por ejemplo, compuestos indicadores.

55 De acuerdo con otra divulgación ejemplar, se proporciona un procedimiento que comprende formar complejos, comprendiendo cada uno de los cuales un ácido nucleico diana y una molécula de captura, en el que cada molécula de captura comprende una parte de unión específica para una región del ácido nucleico diana y un grupo de anclaje; poner en contacto los complejos con un miembro de unión, estando configurado el miembro de unión para unirse al grupo de anclaje de la molécula de captura para unir los complejos al miembro de unión; someter uno o más ácidos nucleicos diana a una amplificación; capturar los ácidos nucleicos diana amplificados con respecto al miembro de unión; y determinar un valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de los ácidos nucleicos diana capturados.

60 El uno o más ácidos nucleicos diana pueden ser ácidos nucleicos monocatenarios o bicatenarios.

El procedimiento puede comprender además someter los ácidos nucleicos diana a transcripción inversa antes de someter a amplificación uno o más ácidos nucleicos diana.

65 El procedimiento puede comprender además liberar los ácidos nucleicos diana amplificados capturados del miembro de unión y repetir las etapas de someter uno o más ácidos nucleicos diana a amplificación y capturar el ácido

nucleico diana amplificado con respecto al miembro de unión. En dicho ejemplo, el ciclo de liberación de los ácidos nucleicos diana amplificados capturados del miembro de unión y la repetición de las etapas de someter uno o más ácidos nucleicos diana a amplificación y la captura de los ácidos nucleicos diana amplificados con respecto al miembro de unión se puede realizar al menos 10 veces o al menos 20 veces.

5 Un valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de los ácidos nucleicos diana capturados se puede determinar después de al menos un ciclo, por ejemplo, después de cada ciclo, de liberación de los ácidos nucleicos diana amplificados capturados del miembro de unión y la repetición de las etapas de someter uno o más ácidos nucleicos diana para amplificación y la captura de los ácidos nucleicos diana amplificados con respecto al miembro de unión.

10 El miembro de unión puede comprender una o más moléculas de captura que pueden capturar los ácidos nucleicos diana. En dicho modo de realización, los ácidos nucleicos diana se capturan con respecto al miembro de unión mediante una o más moléculas de captura.

15 El miembro de unión puede comprender además partículas.

La etapa de formar complejos que comprendan cada uno un ácido nucleico diana y una molécula de captura se puede realizar espacialmente separada de la etapa de poner en contacto los complejos con un miembro de unión.

20 El procedimiento puede comprender además marcar los ácidos nucleicos diana. Los ácidos nucleicos diana se pueden marcar añadiendo o más marcadores detectables, por ejemplo, antes de o durante el sometimiento de uno o más ácidos nucleicos diana a amplificación y/o antes de capturar los ácidos nucleicos diana amplificados con respecto al miembro de unión. El uno o más marcadores detectables pueden ser marcadores fluorescentes.

25 La determinación de un valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de los ácidos nucleicos diana capturados puede comprender la monitorización dependiente del tiempo de uno o más valores indicativos obtenidos.

30 El procedimiento puede comprender además proporcionar los uno o más ácidos nucleicos diana antes de formar complejos que comprendan cada uno un ácido nucleico diana y una molécula de captura. La etapa de proporcionar uno o más ácidos nucleicos diana puede comprender liberar los ácidos nucleicos diana del material biológico. En dicho ejemplo, el material biológico se puede seleccionar del grupo que consiste en una o más células procariontas, una o más células eucariotas, uno o más eritrocitos, y una o más partículas víricas, así como mezclas de las mismas. Además, la liberación de los ácidos nucleicos diana del material biológico puede comprender poner en contacto el material biológico con un reactivo de lisis.

35 Proporcionar los uno o más ácidos nucleicos diana puede comprender proporcionar una muestra que comprenda los uno o más ácidos nucleicos diana en el que la muestra se puede seleccionar del grupo que consiste en sangre completa, plasma, suero, orina, esputo, saliva y líquido cefalorraquídeo.

40 Proporcionar los uno o más ácidos nucleicos diana se puede realizar espacialmente separado de los complejos de contacto que comprenden cada uno un ácido nucleico diana y una molécula de captura, sometiendo a amplificación el uno o más ácidos nucleicos diana, capturando los ácidos nucleicos diana amplificados con respecto al miembro de unión y determinar un valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de los ácidos nucleicos diana capturados.

45 El procedimiento puede comprender además separar el uno o más ácidos nucleicos diana del material concomitante.

50 En otro ejemplo, el procedimiento de acuerdo con esta divulgación ejemplar se realiza en un dispositivo como se describe anteriormente. Por ejemplo, el procedimiento se puede realizar en un dispositivo, que comprende un sustrato rígido; un elemento de cubierta flexible que cubre al menos parcialmente el sustrato; una primera estructura formada en el sustrato, adaptada para alojar líquidos y adaptada para liberar contenido de una o más células, esporas o virus, incluyendo los contenidos moléculas diana tales como ácidos nucleicos diana; una segunda estructura formada en el sustrato, adaptada para alojar líquidos y que comprende al menos un miembro de unión adaptado para capturar las moléculas diana y para determinar un valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de las moléculas diana; una red microfluídica que interconecta al menos la primera estructura y la segunda estructura; y una unidad de accionador adaptada para efectuar un flujo de fluidos entre la primera estructura y la segunda estructura presionando el elemento de cubierta flexible contra el sustrato para cerrar selectivamente una parte de la red microfluídica. Además, el procedimiento se puede realizar en un dispositivo, que comprende una estructura adaptada para alojar líquidos, en el que la estructura comprende al menos un miembro de unión y está en comunicación fluida con una red microfluídica; y una unidad de control adaptada para controlar un flujo de fluidos a través de la red microfluídica de tal manera que las moléculas diana tales como ácidos nucleicos diana se capturen en el al menos un miembro de unión, adaptado para controlar una amplificación de las moléculas diana en la estructura, y adaptado para controlar la detección de compuestos capturados en al menos un miembro de unión.

El dispositivo puede comprender una primera estructura adaptada para alojar líquidos. En dicho ejemplo, los complejos que comprenden cada uno un ácido nucleico diana y una molécula de captura se forman en la primera estructura.

5 Además, el dispositivo puede comprender una segunda estructura configurada para detectar uno o más ácidos nucleicos diana y que comprende un elemento de cubierta que cubre el segundo pocillo y una unidad de accionador adaptada para ser accionada para deformar el elemento de cubierta. En dicho ejemplo, la determinación de un valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de los ácidos nucleicos diana capturados se puede realizar en la segunda estructura.

10 Además, someter uno o más ácidos nucleicos diana a amplificación y/o capturar los ácidos nucleicos diana amplificados con respecto a un miembro de unión también se pueden realizar en la segunda estructura.

15 La determinación de un valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de los ácidos nucleicos diana capturados se puede realizar con el accionador accionado para deformar el elemento de cubierta. El elemento de cubierta se puede deformar de tal manera que se reduzca el volumen de la segunda estructura o pocillo central o pocillo de detección. En dicho ejemplo, el volumen del segundo pocillo se puede volver a aumentar después de determinar un valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de los ácidos nucleicos diana capturados.

20 De acuerdo con otra divulgación ejemplar, se proporciona un procedimiento, que comprende:

25 proporcionar una cantidad de un compuesto indicador; un primer miembro de unión que está configurado para unirse a un grupo de anclaje de una molécula de captura; un segundo miembro de unión que puede de capturar el compuesto indicador; una cantidad de un ácido nucleico diana que puede formar complejos con el compuesto indicador; la formación de complejos con un compuesto indicador que inhibe la captura del compuesto indicador por el segundo miembro de unión; y una cantidad de moléculas de captura en las que cada molécula de captura comprende una parte de unión específica para una región de los ácidos nucleicos diana y un grupo de anclaje;

30 formar complejos que comprendan cada uno un ácido nucleico diana y una molécula de captura;

poner en contacto los complejos con el primer miembro de unión para unir los complejos al primer miembro de unión;

35 liberar al menos un subconjunto de la cantidad de ácido nucleico diana del primer miembro de unión; formar complejos de un subconjunto de la cantidad de un compuesto indicador con al menos un subconjunto de la cantidad de ácido nucleico diana;

40 capturar un subconjunto restante de la cantidad de compuesto indicador que no esté en complejo con un ácido nucleico diana en el segundo miembro de unión; y

determinar un valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de compuesto indicador capturado en el segundo miembro de unión.

45 El compuesto indicador puede comprender uno o más marcadores detectables, por ejemplo, dos marcadores detectables. El uno o más marcadores detectables pueden ser marcadores fluorescentes.

Además, los compuestos indicadores pueden ser oligonucleótidos.

50 El procedimiento puede comprender además determinar un valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de ácido nucleico diana basado en el valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de compuesto indicador capturado en el segundo miembro de unión.

55 El procedimiento puede comprender además liberar el subconjunto restante de la cantidad de compuesto indicador del segundo miembro de unión después de la etapa de determinar un valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de compuesto indicador capturado en el segundo miembro de unión; formar complejos de un subconjunto de la cantidad de compuesto indicador con al menos un subconjunto de la cantidad de ácido nucleico diana; capturar un subconjunto restante de la cantidad de compuesto indicador que no está en complejo con un ácido nucleico diana en el segundo miembro de unión; y determinar el valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de compuesto indicador capturado en el segundo miembro de unión. En dicho ejemplo, las etapas de liberación, formación de complejos, captura y determinación se pueden realizar N veces adicionales, en donde N es un número entero mayor o igual a 1, por ejemplo,  $N \geq 5$ ,  $N \geq 10$  o  $N \geq 20$ .

65 Además, la etapa de formar complejos de un subconjunto de la cantidad de compuesto indicador con al menos un subconjunto de la cantidad de ácido nucleico diana y la etapa de capturar un subconjunto restante de la cantidad de

compuesto indicador que no está en complejo con un ácido nucleico diana en el segundo miembro de unión se pueden realizar concomitantemente.

5 El procedimiento puede comprender además someter el ácido nucleico diana a amplificación. En dicho ejemplo, la amplificación del ácido nucleico diana se puede iniciar antes de la etapa de formar complejos de un subconjunto de la cantidad de compuesto indicador con al menos un subconjunto de la cantidad de ácido nucleico diana.

10 El valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de compuesto indicador capturado en el segundo miembro de unión se puede determinar antes de que las etapas de formar complejos de un subconjunto de la cantidad de compuesto indicador con al menos un subconjunto de la cantidad de ácido nucleico diana y de capturar un subconjunto restante de la cantidad de compuesto indicador que no está en complejo con un ácido nucleico diana en el segundo miembro de unión estén en equilibrio químico. En particular, el valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de compuesto indicador capturado en el segundo miembro de unión se puede determinar de 1 s a 120 segundos después de iniciar las etapas de formar complejos de un subconjunto de la cantidad de compuesto indicador con al menos un subconjunto de la cantidad de ácido nucleico diana, y de capturar un subconjunto restante de la cantidad de compuesto indicador que no está en complejo con un ácido nucleico diana en el segundo miembro de unión.

20 El procedimiento puede comprender además someter los ácidos nucleicos diana a transcripción inversa antes de someterlos a amplificación.

25 El segundo miembro de unión puede comprender una o más moléculas de captura específicas de indicador diferentes que puedan capturar un compuesto indicador en el segundo miembro de unión. En dicho ejemplo, las moléculas de captura pueden ser oligonucleótidos. Las diferentes moléculas de captura específicas de indicador pueden estar dispuestas en diferentes localizaciones con respecto al segundo miembro de unión. Además, los compuestos indicadores se pueden capturar en el segundo miembro de unión formando complejos con las moléculas de captura específicas de indicador. Al menos una parte de un sitio de interacción del compuesto indicador que puede de formar un complejo con un ácido nucleico diana también es posible que pueda formar un complejo con una molécula de captura específica de indicador. Las moléculas de captura específicas de indicador y el ácido nucleico diana pueden competir para formar un complejo con el compuesto indicador.

35 La amplificación puede comprender una etapa de desnaturalizar ácidos nucleicos bicatenarios. Los ácidos nucleicos bicatenarios pueden comprender complejos de compuestos indicadores con ácidos nucleicos diana, complejos de compuestos indicadores con moléculas de captura específicas de indicador, dobles hebras de compuestos indicadores y dobles hebras de ácidos nucleicos diana.

40 La amplificación puede comprender además una etapa de hibridar moléculas de cebador para identificar ácidos nucleicos. En este ejemplo, la etapa de hibridación se puede realizar concomitantemente con la etapa de formar complejos de un subconjunto de la cantidad de compuesto indicador con al menos un subconjunto de la cantidad de ácido nucleico diana y/o la etapa de capturar un subconjunto restante de la cantidad de compuesto indicador que no está en complejo con un ácido nucleico diana en el segundo miembro de unión.

45 La amplificación puede ser una amplificación cíclica, por ejemplo, una PCR. La realización de la PCR puede comprender el uso de una polimerasa que tenga actividad exonucleasa. La amplificación cíclica puede comprender al menos 10 ciclos o al menos 20 ciclos.

50 El valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de compuesto indicador capturado en el segundo miembro de unión se puede determinar después de al menos un ciclo, por ejemplo, después de cada ciclo, de la amplificación cíclica. Además, el valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de ácido nucleico diana se puede determinar cada vez después de determinar el valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de compuesto indicador capturado en el segundo miembro de unión.

55 La determinación del valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de compuesto indicador capturado en el segundo miembro de unión puede comprender un monitorización dependiente del tiempo del valor indicativo.

Además, el valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de ácido nucleico diana se puede determinar en base a una curva de calibración que correlaciona el valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de compuesto indicador con un valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de ácido nucleico diana.

60 El procedimiento de esta divulgación ejemplar también se puede realizar en un dispositivo como se describe anteriormente. Por ejemplo, el procedimiento se puede realizar en un dispositivo, que comprende un sustrato rígido; un elemento de cubierta flexible que cubre al menos parcialmente el sustrato; una primera estructura formada en el sustrato, adaptada para alojar líquidos y adaptada para liberar contenido de una o más células, esporas o virus, incluyendo los contenidos ácidos nucleicos diana; una segunda estructura formada en el sustrato, adaptada para alojar líquidos y que comprende al menos un miembro de unión adaptado para capturar las ácidos nucleicos diana y para determinar un valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de los ácidos nucleicos diana; una red

microfluídica que interconecta al menos la primera estructura y la segunda estructura; y una unidad de accionador adaptada para efectuar un flujo de fluidos entre la primera estructura y la segunda estructura presionando el elemento de cubierta flexible contra el sustrato para cerrar selectivamente una parte de la red microfluídica. El procedimiento también se puede realizar en un dispositivo, que comprende una estructura adaptada para alojar líquidos, en el que la estructura comprende al menos un miembro de unión y está en comunicación fluida con una red microfluídica; y una unidad de control adaptada para controlar un flujo de fluidos a través de la red microfluídica de tal manera que ácidos nucleicos diana se capturen en el al menos un miembro de unión, adaptado para controlar una amplificación de las moléculas diana en la estructura, y adaptado para controlar la detección de compuestos capturados en al menos un miembro de unión.

El dispositivo puede comprender además una primera estructura adaptada para alojar líquidos. En dicho ejemplo, la etapa de formar complejos que comprenden cada uno un ácido nucleico diana y una molécula de captura se realiza en la primera estructura.

El dispositivo puede comprender además una segunda estructura adaptada para alojar líquidos y el primer y, opcionalmente, el segundo miembro de unión se puede proporcionar en la segunda estructura. En dicho ejemplo, formar complejos que comprenden cada uno un ácido nucleico diana y una molécula de captura; poner en contacto los complejos con el primer miembro de unión para unir los complejos al primer miembro de unión; liberar al menos un subconjunto de la cantidad de ácido nucleico diana del primer miembro de unión; formar complejos de un subconjunto de la cantidad de un compuesto indicador con al menos un subconjunto de la cantidad de ácido nucleico diana;

capturar un subconjunto restante de la cantidad de compuesto indicador que no está en complejo con un ácido nucleico diana en el segundo miembro de unión; y determinar un valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de compuesto indicador capturado en el segundo miembro de unión se realiza en la segunda estructura, por ejemplo, el pocillo central.

La determinación de un valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de los compuestos indicadores capturados se puede realizar con el accionador accionado para deformar el elemento de cubierta. El elemento de cubierta se puede deformar de tal manera que se reduzca el volumen del pocillo central o la segunda estructura o el pocillo de detección. En dicho ejemplo, el volumen del pocillo central se puede incrementar nuevamente después de determinar un valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de los compuestos indicadores capturados.

Proporcionar los uno o más ácidos nucleicos diana puede comprender proporcionar una muestra que comprenda el uno o más ácidos nucleicos diana. La muestra puede ser una muestra de líquido que tenga un volumen de 1  $\mu$ l a 50  $\mu$ l. Además, la muestra puede ser una muestra de sangre completa líquida.

El procedimiento puede comprender además añadir una cantidad de un compuesto extintor que pueda formar complejos con el compuesto indicador que no está en complejo con moléculas diana o moléculas de captura específicas de indicador. El compuesto extintor puede comprender uno o más restos que interfieran en la generación de una señal detectable por un marcador (por ejemplo, un grupo extintor que "secuestra" las emisiones que fueron resultado de la excitación de un fluoróforo). Por ejemplo, es posible que los grupos extintores puedan suprimir o inhibir señales emitidas por un marcador detectable del compuesto indicador, por ejemplo, una señal de fluorescencia. En dicho ejemplo, es posible que el compuesto extintor pueda formar complejos con el compuesto indicador que no está en complejo con moléculas diana o moléculas de captura específicas de indicador de modo que el uno o más grupos extintores estén en estrecha proximidad al marcador detectable del compuesto indicador dentro del complejo.

El compuesto extintor puede ser un oligonucleótido. En este ejemplo, el oligonucleótido extintor puede comprender al menos una región de secuencia específica que es complementaria de una región de secuencia de un oligonucleótido indicador, permitiendo, por tanto, el emparejamiento de bases entre el compuesto extintor y el compuesto indicador.

El grupo extintor puede incluir los extintores habituales, tales como, por ejemplo, los extintores Black Hole (Biosearch Technologies), los extintores Qxl (AnaSpec) y los extintores Iowa Black.

Los compuestos extintores se pueden proporcionar en la segunda estructura de un dispositivo como se describe anteriormente. En dicho ejemplo, el compuesto extintor puede formar un complejo con un compuesto indicador no capturado en el segundo miembro de unión.

La segunda estructura de un dispositivo como se describe anteriormente se puede sellar de manera irreversible antes de iniciar la amplificación de los ácidos nucleicos diana. El sellado irreversible de la segunda estructura se puede lograr sellando (por ejemplo, soldando) una entrada y, opcionalmente, una salida de la segunda estructura, por ejemplo, mediante el sellado térmico de canales y/o válvulas conectadas con la segunda estructura.

De acuerdo con otra divulgación ejemplar, se proporciona un procedimiento que comprende amplificar al menos un polinucleótido diana para formar amplicones bicatenarios, poner en contacto los amplicones con una superficie configurada para unir selectivamente a los amplicones (por ejemplo, con un grupo de anclaje) y con los amplicones unidos a la superficie por un grupo de anclaje, determinando ópticamente la presencia de los amplicones. El procedimiento puede comprender además liberar los amplicones de la superficie después de la etapa de detección óptica, someter los amplicones liberados a al menos un ciclo de amplificación más, poner en contacto los amplicones resultantes con la superficie y con los amplicones unidos a la superficie por el grupo de anclaje, determinando ópticamente la presencia de los amplicones. El procedimiento puede comprender además realizar las etapas de liberar, someter, poner en contacto y determinar ópticamente un número N de veces adicionales, donde N es un número entero mayor o igual que 1. En particular,  $N \geq 5$ , más en particular  $N \geq 10$ , y todavía más en particular  $N \geq 20$ .

El procedimiento puede comprender además, antes de la etapa de amplificación, proporcionar los polinucleótidos diana, formar complejos que comprendan cada uno un polinucleótido diana liberado de un patógeno y al menos una molécula de captura, comprendiendo cada molécula de captura una parte de unión específica a una región del polinucleótido diana y un grupo de anclaje, y poner en contacto los complejos con la superficie, estando configurada la superficie para unirse de forma no selectiva al grupo de anclaje de la molécula de captura para unir de forma no selectiva los complejos y la superficie. En dicho procedimiento, proporcionar los polinucleótidos puede comprender la liberación del contenido de una o más células, esporas o virus, incluyendo los contenidos los polinucleótidos diana. La etapa de liberación puede comprender poner en contacto una muestra que comprende una o más células, esporas o virus con un reactivo de lisis y las moléculas de captura. La etapa de poner en contacto la muestra con el reactivo de lisis y las moléculas de captura puede comprender poner en contacto la muestra con el reactivo de lisis y las moléculas de captura en forma liofilizada.

En dicho procedimiento, la etapa de proporcionar los polinucleótidos diana puede incluir proporcionar materiales concomitantes, y el procedimiento puede incluir además separar los complejos unidos a la superficie y los materiales concomitantes. En dicho procedimiento, los materiales concomitantes pueden incluir contenido de al menos una célula, espora o virus a partir del cual se han liberado los polinucleótidos. La superficie puede ser una superficie de una partícula.

De acuerdo con otra divulgación ejemplar, se proporciona un procedimiento que comprende proporcionar uno o más polinucleótidos diana, formar complejos que comprenden cada uno un polinucleótido diana y al menos una molécula de captura, comprendiendo cada molécula de captura una parte de unión específica a una región del polinucleótido diana y un grupo de anclaje, y poner en contacto los complejos con una superficie, estando configurada la superficie para unirse de forma no selectiva al grupo de anclaje de la molécula de captura para unir de forma no selectiva los complejos y la superficie. En dicho procedimiento, la etapa de proporcionar puede comprender la liberación del contenido de una o más células, esporas o virus y el contenido comprende los polinucleótidos. El procedimiento puede comprender además separar los complejos unidos a la superficie y otro contenido liberado de una o más células, esporas o virus.

De acuerdo con otra divulgación ejemplar, se proporciona un procedimiento, comprendiendo el procedimiento formar una composición de materia que comprende una cantidad de un compuesto indicador, un miembro de unión que puede capturar el compuesto indicador, y una cantidad de un ácido nucleico diana que puede formar complejos con el compuesto indicador, la formación de complejos con el compuesto indicador que inhiba la captura del compuesto indicador por el miembro de unión; formar complejos de un subconjunto de la cantidad de compuesto indicador con al menos un subconjunto de la cantidad de ácido nucleico diana; capturar un subconjunto restante de la cantidad de compuesto indicador que no está en complejo con un ácido nucleico diana en el miembro de unión; y determinar un valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de compuesto indicador capturado en el miembro de unión.

En otras palabras, el procedimiento puede comprender permitir que un subconjunto de la cantidad de compuesto indicador forme un complejo con al menos un subconjunto de la cantidad de ácido nucleico diana, y permitir que un subconjunto restante de la cantidad de compuesto indicador que no esté en complejo con un ácido nucleico diana para sea capturado en el miembro de unión.

El procedimiento se puede realizar en un dispositivo seleccionado del grupo que consiste en un dispositivo de ensayo de biosensor, un cartucho microfluídico y un laboratorio en un chip.

El procedimiento puede comprender además determinar un valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de ácido nucleico diana basado en el valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de compuesto indicador capturado en el miembro de unión. La determinación del valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de compuesto indicador capturado en el miembro de unión puede comprender un monitorización dependiente del tiempo del valor indicativo. El valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de ácido nucleico diana se puede determinar en base a una curva de calibración que correlaciona el valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de compuesto indicador con el valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de ácido nucleico diana.

65

5 El procedimiento puede comprender además liberar el subconjunto restante de la cantidad de compuesto indicador del miembro de unión después de las etapas de formar complejos de un subconjunto de la cantidad de compuesto indicador con al menos un subconjunto de la cantidad de ácido nucleico diana; capturar un subconjunto restante de la cantidad de compuesto indicador que no está en complejo con un ácido nucleico diana en el miembro de unión; y determinar un valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de compuesto indicador capturado en el miembro de unión.

10 Las etapas de liberar, formar complejos, capturar y determinar un valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de compuesto indicador y/o de ácido nucleico diana se pueden realizar un número N de veces adicionales, donde N es un número entero mayor o igual que a 1. N puede ser  $\geq 5$ ,  $\geq 10$  o  $\geq 20$ .

15 El procedimiento puede comprender además, antes de la etapa de formar complejos: capturar al menos un subconjunto de la cantidad de compuesto indicador en el miembro de unión; determinar un valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de compuesto indicador capturado en el miembro de unión; y liberar compuestos indicadores capturados del miembro de unión.

20 La etapa de formar complejos de un subconjunto de la cantidad de compuesto indicador con al menos un subconjunto de la cantidad de ácido nucleico diana y la etapa de capturar un subconjunto restante de la cantidad de compuesto indicador que no está en complejo con un ácido nucleico diana en el miembro de unión se pueden realizar concomitantemente.

25 El procedimiento puede comprender someter el ácido nucleico diana a amplificación. La amplificación del ácido nucleico diana se puede iniciar antes de la etapa de formar complejos de un subconjunto de la cantidad de compuesto indicador con al menos un subconjunto de la cantidad de ácido nucleico diana.

30 El valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de compuesto indicador capturado en el miembro de unión se puede determinar antes de que la formación complejos de un subconjunto de la cantidad de compuesto indicador con al menos un subconjunto de la cantidad de ácido nucleico diana y la captura de un subconjunto restante de la cantidad de compuesto indicador que no está en complejo con un ácido nucleico diana en el miembro de unión estén en equilibrio químico. El valor indicativo se puede determinar de 1 s a 120 segundos después de iniciar las etapas de formar complejos de un subconjunto de la cantidad de compuesto indicador con al menos un subconjunto de la cantidad de ácido nucleico diana, y de capturar un subconjunto restante de la cantidad de compuesto indicador que no está en complejo con un ácido nucleico diana en el miembro de unión.

35 Los compuestos indicadores pueden comprender uno o más marcadores detectables, por ejemplo, dos marcadores detectables. El uno o más marcadores detectables pueden ser marcadores fluorescentes. Los compuestos indicadores pueden ser oligonucleótidos.

40 El procedimiento puede comprender además someter los ácidos nucleicos diana a transcripción inversa antes de someterlos a amplificación.

45 La etapa de formar una composición de materia puede comprender formar una composición de materia que comprende una cantidad de un primer compuesto indicador, una cantidad de un primer ácido nucleico diana que puede formar complejos con el primer compuesto indicador, inhibiendo la formación de complejos con el primer compuesto indicador la captura del primer compuesto indicador por el miembro de unión, una cantidad de un segundo compuesto indicador, y una cantidad de un segundo ácido nucleico diana que puede formar complejos con el segundo compuesto indicador, inhibiendo la formación de complejos con el segundo compuesto indicador la captura del segundo compuesto indicador por el miembro de unión.

50 El miembro de unión usado en el procedimiento puede comprender una o más moléculas de captura diferentes que pueden capturar un compuesto indicador en el miembro de unión. Las moléculas de captura también se pueden indicar como moléculas de captura específicas de indicador. Las moléculas de captura pueden ser oligonucleótidos. Las diferentes moléculas de captura también pueden estar dispuestas en diferentes localizaciones con respecto al miembro de unión.

55 Los compuestos indicadores se pueden capturar en el miembro de unión formando complejos con las moléculas de captura. Al menos una parte de un sitio de interacción del compuesto indicador que puede de formar un complejo con un ácido nucleico diana también es posible que pueda formar un complejo con una molécula de captura. Las moléculas de captura y el ácido nucleico diana pueden competir para formar un complejo con el compuesto indicador.

60 La amplificación puede comprender una etapa de desnaturalizar ácidos nucleicos bicatenarios. Los ácidos nucleicos bicatenarios pueden comprender complejos de compuestos indicadores con ácidos nucleicos diana, complejos de compuestos indicadores con moléculas de captura, dobles hebras de compuestos indicadores y dobles hebras de ácidos nucleicos diana.

65

5 La amplificación puede comprender también una etapa de hibridar moléculas de cebador para identificar ácidos nucleicos. La etapa de hibridación se puede realizar concomitantemente con la etapa de formar complejos de un subconjunto de la cantidad de compuesto indicador con al menos un subconjunto de la cantidad de ácido nucleico diana y/o con la etapa de capturar un subconjunto restante de la cantidad de compuesto indicador que no está en complejo con un ácido nucleico diana en el miembro de unión

10 La amplificación puede ser una amplificación cíclica. La amplificación cíclica puede ser una PCR. La amplificación cíclica puede comprender al menos 10 o al menos 20 ciclos. La realización de la PCR puede comprender el uso de una polimerasa que tenga actividad exonucleasa.

15 El valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de compuesto indicador capturado en el miembro de unión se puede determinar después de al menos un ciclo de la amplificación cíclica. Este valor se puede determinar después de cada ciclo de la amplificación cíclica. El valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de ácido nucleico diana se puede determinar también cada vez después de determinar el valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de compuesto indicador capturado en el miembro de unión.

20 El procedimiento puede comprender además añadir una cantidad de un compuesto extintor que pueda formar complejos con el compuesto indicador que no está en complejo con moléculas diana o moléculas de captura específicas de indicador. El compuesto extintor puede comprender uno o más restos que interfieran en la generación de una señal detectable por un marcador (por ejemplo, un grupo extintor que "secuestra" las emisiones que fueron resultado de la excitación de un fluoróforo). Por ejemplo, es posible que los grupos extintores puedan suprimir o inhibir señales emitidas por un marcador detectable del compuesto indicador, por ejemplo, una señal de fluorescencia. En dicho ejemplo, es posible que el compuesto extintor pueda formar complejos con el compuesto indicador que no está en complejo con moléculas diana o moléculas de captura específicas de indicador de modo que el uno o más grupos extintores estén en estrecha proximidad al marcador detectable del compuesto indicador dentro del complejo.

25 El compuesto extintor puede ser un oligonucleótido. En este ejemplo, el oligonucleótido extintor puede comprender al menos una región de secuencia específica que es complementaria de una región de secuencia de un oligonucleótido indicador, permitiendo, por tanto, el emparejamiento de bases entre el compuesto extintor y el compuesto indicador.

30 El grupo extintor puede incluir los extintores habituales, tales como, por ejemplo, los extintores Black Hole (Biosearch Technologies), los extintores Qxl (AnaSpec) y los extintores Iowa Black.

35 De acuerdo con un modo de realización ejemplar, se proporciona un procedimiento, comprendiendo el procedimiento proporcionar una muestra de sangre completa no tratada;

40 introducir la muestra de sangre completa no tratada en un dispositivo adaptado para alojar una muestra en un estado fluido que comprende una cámara de reacción en la que la cámara de reacción comprende una primera y una segunda superficie y comprende además una micromatriz dispuesta sobre la primera superficie o la segunda superficie y comprende además una micromatriz dispuesta sobre la primera superficie o la segunda superficie; y

45 determinar un valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de ácidos nucleicos asociados con una infección vírica en la muestra de sangre completa realizando un análisis basado en micromatrices en el dispositivo.

50 En particular, el valor determinado puede ser indicativo de la presencia y/o la cantidad de ácidos nucleicos totales asociados con una infección vírica. El volumen de la muestra de sangre completa introducida en el dispositivo puede ser de 1  $\mu$ l a 50  $\mu$ l.

55 En algunos modos de realización, el procedimiento comprende además determinar un valor indicativo de la carga vírica en un paciente infectado basado en el valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de ácidos nucleicos totales asociados con una infección vírica.

60 La muestra de sangre completa fluida se puede introducir en el dispositivo directamente desde un paciente. En particular, la muestra de sangre completa fluida se puede obtener de una punción en la yema del dedo del paciente. El procedimiento puede comprender además poner en contacto la sangre obtenida de la punción en la yema del dedo con un capilar mientras el capilar permanece en contacto con la yema del dedo. El procedimiento puede comprender además conectar el capilar al dispositivo después de poner en contacto el capilar y la sangre.

65 De acuerdo con otra divulgación ejemplar, se proporciona un procedimiento, comprendiendo el procedimiento proporcionar una muestra de fluido que tenga un volumen de 1  $\mu$ l a 50  $\mu$ l; y determinar un valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de ácidos nucleicos asociados con una infección vírica en la muestra de fluido. En algunos modos de realización, el procedimiento comprende además introducir la muestra de fluido en un dispositivo adaptado para alojar una muestra en un estado fluido; y determinar un valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de ácidos nucleicos asociados con una infección vírica en la muestra de fluido basado en un análisis realizado en el

dispositivo. El valor determinado puede ser indicativo de la presencia y/o la cantidad de ácidos nucleicos totales asociados con una infección vírica.

5 En algunos modos de realización, el procedimiento comprende además determinar un valor indicativo de la carga vírica en un paciente infectado basado en el valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de ácidos nucleicos totales asociados con una infección vírica.

10 En otros modos de realización, la muestra de fluido es una muestra de sangre completa que puede ser una muestra de sangre completa no tratada. Además, el volumen de la muestra de fluido puede ser de 1 µl a 10 µl.

En modos de realización particulares, la infección vírica es una infección por el VIH.

15 El dispositivo empleado en los procedimientos se puede adaptar para detectar ácidos nucleicos asociados con una infección vírica en una muestra de fluido. El dispositivo se puede seleccionar del grupo que consiste en un dispositivo de ensayo de biosensor, un cartucho microfluidico y un laboratorio en un chip.

En algunos modos de realización, el análisis realizado en el dispositivo comprende además liberar ácidos nucleicos de la muestra, lo que puede implicar poner en contacto la muestra de fluido con un reactivo de lisis.

20 El análisis también puede comprender la formación de complejos, en el que cada complejo comprende un ácido nucleico asociado con una infección vírica y una molécula de captura, y en el que cada molécula de captura comprende un grupo de anclaje y una parte de unión específica a una región del ácido nucleico asociado con una infección vírica.

25 El análisis realizado en el dispositivo puede comprender además poner en contacto los complejos con un primer miembro de unión del dispositivo, estando configurado el primer miembro de unión para unirse al grupo de anclaje de la molécula de captura y, por tanto, para unir los complejos al primer miembro de unión. La etapa de formar complejos se puede realizar espacialmente separada de la etapa de poner en contacto los complejos con el primer miembro de unión.

30 El análisis realizado en el dispositivo puede comprender además la amplificación de los ácidos nucleicos que se van a detectar, típicamente por PCR. Los ácidos nucleicos amplificados se pueden capturar con respecto al primer miembro de unión.

35 El análisis puede comprender además el suministro de una cantidad de un compuesto indicador que puede formar complejos con el ácido nucleico asociado con una infección vírica, y un segundo miembro de unión que puede capturar el compuesto indicador, inhibiendo la formación de complejos con el ácido nucleico la captura del compuesto indicador por el segundo miembro de unión.

40 El procedimiento también puede comprender formar complejos de un subconjunto de la cantidad de compuesto indicador con al menos un subconjunto de la cantidad de ácido nucleico asociado con una infección vírica; capturar un subconjunto restante de la cantidad de compuesto indicador que no está en complejo con un ácido nucleico asociado con una infección vírica en el segundo miembro de unión; y determinar un valor indicativo de la presencia y/o cantidad de compuesto indicador capturado en el segundo miembro de unión; y, opcionalmente, determinar uno o más valores indicativos de la cantidad de ácidos nucleicos asociados con una infección vírica basados en el valor indicativo de la cantidad de compuesto indicador.

45 Además, el procedimiento puede comprender someter a amplificación los ácidos nucleicos asociados con una infección vírica mientras se permite que las moléculas indicadoras se liberen del segundo miembro de unión.

50 También se divulga el uso de un procedimiento, como se define en el presente documento, para detectar el VIH y/o para determinar la carga del VIH en un paciente.

55 También se divulga el uso de la cantidad de ácidos nucleicos víricos totales como marcador de diagnóstico. En ejemplos particulares, la cantidad de ácidos nucleicos víricos totales se determina mediante un procedimiento como se describe en el presente documento.

60 En otros ejemplos particulares, los ácidos nucleicos víricos totales usados como marcadores de diagnóstico son ácidos nucleicos del VIH. La cantidad total de ácidos nucleicos del VIH usados como marcador puede ser indicativa para detectar el VIH, determinar la carga del VIH en un paciente, monitorizar la progresión de la enfermedad en un paciente infectado por el VIH y/o monitorizar la eficacia del tratamiento antivírico de un paciente infectado por el VIH. La cantidad de ácidos nucleicos del VIH totales puede comprender ácidos nucleicos que se originan de virus libres y asociados a células, los cuales, a su vez, pueden comprender ARN que se origina a partir de virus libres, ARN que se origina de virus asociados a células, ADN provírico, ADN vírico retrotranscrito y ARN provírico transcrito.

65

Se proporciona un dispositivo que está configurado para realizar cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente.

**BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

- 5 La ilustración en los dibujos es esquemática. En diferentes dibujos, se proporcionan elementos similares o idénticos con los mismos signos de referencia.
- 10 La figura 1a es un diagrama de flujo de un procedimiento de ensayo de polinucleótidos de acuerdo con un modo de realización ejemplar.
- La figura 1b es una vista de un sistema de detección útil para realizar el procedimiento de la figura 1a de acuerdo con un modo de realización ejemplar.
- 15 La figura 1c es una vista del sistema de detección de la figura 1b, mostrándose el sistema de detección en un estado activado para realizar una etapa de detección del procedimiento de la figura 1a de acuerdo con un modo de realización ejemplar.
- 20 La figura 1d muestra un amplicón unido a una partícula.
- La figura 1e muestra un amplicón unido a una partícula.
- 25 La figura 2 es un dispositivo de ensayo de acuerdo con un modo de realización ejemplar adecuado para su uso en el sistema de detección de las Fig. 1b y 1c.
- 30 La figura 3 es el dispositivo de ensayo de la figura 2 mostrado con un accionador de plantilla para hacer funcionar el dispositivo.
- La figura 4 muestra los resultados (curvas de producto de RT-PCR y electroforesis en gel) de ensayos realizados con tampón de lisis fresco o liofilizado, en los que el tampón de lisis se puede almacenar como sedimento liofilizado sin pérdida de función.
- 35 La figura 5 muestra el efecto de la cantidad de suspensión de estreptavidina sefarosa usada para capturar un oligonucleótido (es decir, ARN del VIH) de una mezcla de lisis sanguínea, en la que los resultados de los ensayos realizados con 200 µl, 100 µl o 50 µl de suspensión de estreptavidina sefarosa revelan que la capacidad de unión de 50 µl de suspensión es suficiente para capturar sustancialmente todas las moléculas de ARN.
- 40 La figura 6 muestra el efecto de la cantidad de suspensión de estreptavidina sefarosa usada para capturar un oligonucleótido (es decir, ARN del VIH) de una mezcla de lisis sanguínea, en la que los resultados de los ensayos realizados con 10 µl y 7 µl de suspensión de estreptavidina sefarosa revelan que la capacidad de unión de 10 µl de suspensión es suficiente para capturar sustancialmente todas las moléculas de ARN.
- 45 La figura 7 muestra el efecto del tiempo de incubación para la formación del complejo (es decir, la hibridación) entre el polinucleótido que se va a analizar y las sondas de captura, en el que una cantidad sustancial de polinucleótido no se recupera después de 2 min de tiempo de incubación, mientras que después de 10 min de incubación no se puede detectar ARN en el sobrenadante.
- 50 La figura 8 muestra el efecto del tiempo de incubación para la formación del complejo (es decir, la hibridación) entre el polinucleótido que se va a analizar y las sondas de captura.
- 55 La figura 9 muestra el efecto del tiempo de incubación para la etapa de captura (es decir, la unión de los grupos de anclaje de biotina de los complejos a las partículas de estreptavidina sefarosa), en el que se muestra que 5 minutos de tiempo de incubación son suficientes para capturar todas las moléculas de polinucleótido (es decir, no se detectan moléculas de ARN en el sobrenadante).
- 60 La figura 10 muestra los resultados (curvas de producto de RT-PCR) de los análisis realizados con partículas de estreptavidina sefarosa frescas o liofilizadas después de un almacenamiento de varias horas o siete días, en el que las partículas de estreptavidina sefarosa se pueden liofilizar y reconstituir sin pérdida de función.
- 65 La figura 11 muestra los resultados (curvas de producto de RT-PCR) de los análisis realizados con tampones de lavado frescos o liofilizados, en el que los tampones de lavado se pueden liofilizar y reconstituir sin pérdida de función.

5 La figura 12 muestra los resultados (curvas de producto de RT-PCR y electroforesis en gel de agarosa) de pruebas realizadas para mostrar la compatibilidad de las partículas de estreptavidina sefarosa con RT-PCR, en el que se pueden aplicar 10 µl de suspensión de partículas de estreptavidina sefarosa a una amplificación por RT-PCR sin pérdida de eficacia de la amplificación.

10 La figura 13 muestra la especificidad del ensayo de acuerdo con una divulgación ejemplar, en la que los resultados (curvas de producto de RT-PCR y electroforesis en gel de agarosa) muestran que ni el ARN del VIH se une de forma no específica (es decir, en ausencia de sondas de captura) a las partículas de estreptavidina sefarosa ni se captura/amplifica ARN de glóbulos sanguíneos humanos que también se libera durante la etapa de lisis.

15 La figura 14 muestra imágenes fluorescentes de la detección de amplicones en partículas de estreptavidina sefarosa, en las que los amplicones marcados con biotina se capturaron en partículas de estreptavidina sefarosa y se visualizaron después de la hibridación de una sonda marcada con fluorescencia al amplicón capturado.

20 La figura 15 ilustra que la electroforesis en gel de agarosa muestra que los polinucleótidos (es decir, el ARN del VIH) capturados en partículas de estreptavidina sefarosa se pueden usar directamente como un molde para la amplificación sin etapas de procesamiento adicional (es decir, elución, dilución o concentración).

La figura 16 muestra las imágenes fluorescentes respectivas de partículas de estreptavidina sefarosa, en las que se detectan más partículas fluorescentes de estreptavidina sefarosa en la sonda positiva en comparación con la sonda negativa.

25 La figura 17 ilustra esquemáticamente un dispositivo de acuerdo con un modo de realización ejemplar.

La figura 18 ilustra un lado frontal de un dispositivo de acuerdo con otro modo de realización ejemplar.

30 La figura 19 ilustra un lado posterior del dispositivo de la figura 18.

La figura 20 ilustra una vista en planta de un dispositivo de acuerdo con un modo de realización ejemplar.

35 La figura 21 ilustra una vista en sección transversal de un dispositivo de acuerdo con un modo de realización ejemplar.

La figura 22 ilustra esquemáticamente un modo de realización ejemplar del procedimiento competitivo para la detección de polinucleótidos de acuerdo con la presente invención.

40 La figura 23 muestra los resultados de un modo de realización ejemplar del ensayo competitivo de acuerdo con la presente invención para determinar la cantidad de ADN de poliovirus humano 1 en una muestra.

45 La figura 24 muestra el principio así como los resultados de un modo de realización ejemplar de un ensayo competitivo basado en matrices de acuerdo con la presente invención para determinar la cantidad de un producto de PCR gag/env de VIH en una muestra.

La figura 25 ilustra diferentes etapas durante el ensayo que se muestra en la figura 24.

50 La figura 26 ilustra esquemáticamente un modo de realización ejemplar del procedimiento competitivo para la detección de polinucleótidos de acuerdo con la presente invención.

La figura 27 muestra los resultados de un modo de realización ejemplar del ensayo competitivo de acuerdo con la presente invención para determinar la cantidad de subtipo B del VIH y subtipo O2 del VIH en una muestra.

55 La figura 28 muestra los resultados de un modo de realización ejemplar del ensayo competitivo de acuerdo con la presente invención para determinar diferentes cantidades de subtipo B del VIH en una muestra.

60 La figura 29 muestra los resultados de un ensayo basado en PCR que determina los números de copias respectivos del ARN del VIH-1 en muestras de plasma sanguíneo y de sangre completa de pacientes VIH positivos. En el análisis se incluyen solo aquellas muestras en las que se han detectado al menos 40 copias de ARN del VIH-1.

65 La figura 30 muestra los resultados del ensayo basado en PCR mostrado a en la figura 29 para aquellas muestras de plasma sanguíneo en las que se han detectado ninguna o menos de 40 copias de ARN del VIH-1.

La figura 31 muestra los resultados de otro ensayo basado en PCR de acuerdo con la figura 29.

Las figuras 32 a 34 representan las respectivas cargas víricas en plasma y sangre completa de diferentes pacientes VIH positivos que reciben un tratamiento antivírico.

La figura 35 muestra las evoluciones temporales típicas de los números de copias víricas en muestras de sangre completa y plasma sanguíneo.

La figura 36 ilustra esquemáticamente un dispositivo de acuerdo con otro modo de realización ejemplar.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA

El análisis de muestras biológicas puede incluir determinar si uno o más polinucleótidos (por ejemplo, un ADN, ARN, ARNm o ARNr) están presentes en la muestra. Por ejemplo, se puede analizar una muestra para determinar si está presente un polinucleótido indicativo de la presencia de un patógeno particular.

De acuerdo con un modo de realización ejemplar de la divulgación, un procedimiento para el análisis comprende formar complejos, comprendiendo cada uno de los cuales un ácido nucleico diana y una molécula de captura, en el que cada molécula de captura comprende una parte de unión específica para una región del ácido nucleico diana y un grupo de anclaje; poner en contacto los complejos con un miembro de unión, estando configurado el miembro de unión para unirse al grupo de anclaje de la molécula de captura para unir los complejos al miembro de unión; someter uno o más ácidos nucleicos diana a una amplificación; capturar los ácidos nucleicos diana amplificados con respecto al miembro de unión; y determinar un valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de los ácidos nucleicos diana capturados.

El término "ácido nucleico diana", como se usa en el presente documento, indica cualquier molécula de ácido nucleico que se puede detectar usando el procedimiento (es decir, ácidos nucleicos diana que pueden formar complejos con una molécula de captura; véase a continuación). Los ejemplos de dichas moléculas de ácido nucleico incluyen ácidos nucleicos naturales tales como ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN), así como ácidos nucleicos diseñados artificialmente, por ejemplo, análogos de ácidos nucleicos tales como, entre otros, ácidos peptidonucleicos (PNA) o ácidos nucleicos bloqueados (LNA), que se sintetizan químicamente o se generan por medio de tecnología génica recombinante (véase, por ejemplo, Sambrook, J. *et al.* (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2.<sup>a</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). Ejemplos específicos de ácidos nucleicos naturales incluyen secuencias de ADN tales como ADN genómico o moléculas de ADNc, así como secuencias de ARN tales como moléculas de ARNnh, ARNm o ARNr o las secuencias de ácidos nucleicos de complemento inversas de los mismos. Dichos ácidos nucleicos pueden ser de cualquier longitud y pueden ser moléculas monocatenarias o bicatenarias. Típicamente, los ácidos nucleicos diana tienen una longitud de 10 a 10 000 nucleótidos, por ejemplo, 20 a 2000 nucleótidos, 30 a 1000 nucleótidos o 50 a 500 nucleótidos. Como se usa en el presente documento, debe entenderse que el término "nucleótido" se refiere tanto a ribonucleótidos como a desoxirribonucleótidos (es decir, moléculas de ARN y ADN).

El ácido nucleico diana es un ácido nucleico asociado con infecciones víricas. Un ácido nucleico asociado con infecciones víricas denota cualquier molécula de ácido nucleico de origen vírico (es decir, cuya secuencia de nucleótidos es idéntica a o complementaria de una secuencia correspondiente dentro del genoma del virus) que está presente en una muestra líquida que se va a analizar que ha sido infectada por una o más especies de virus. Los virus que infectan al huésped, de los cuales se obtiene la muestra líquida, pueden ser cualquier virus de ADN (es decir, un virus que tiene un genoma de ADN) o un virus de ARN (es decir, un virus que tiene un genoma de ARN) (revisado, por ejemplo, en: Büchen-Osmond, C. (2003). *Taxonomy and Classification of Viruses*. En: *Manual of Clinical Microbiology*, 8.<sup>a</sup> ed., vol. 2, p. 1217-1226, ASM Press, Washington DC). Los ejemplos de virus de ADN incluyen, entre otros, las familias de *Papovaviridae* (por ejemplo, papilomavirus), *Adenoviridae* (por ejemplo, adenovirus) y *Herpesviridae* (por ejemplo, virus de Epstein-Barr, citomegalovirus). Los ejemplos de virus de ARN incluyen, entre otros, las familias de *Picornaviridae* (por ejemplo, poliovirus, rinovirus), *Flaviviridae* (por ejemplo, virus de la hepatitis C), *Filoviridae* (por ejemplo, virus de Marburg, virus del ébola) y *Retroviridae* (por ejemplo, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)). En algunos modos de realización de la invención, los ácidos nucleicos que se van a detectar están asociados con infecciones causadas por miembros de *Retroviridae*, en particular, están asociados con infecciones por el VIH. El término "VIH", como se usa en el presente documento, se refiere tanto a las especies de VIH-1 como a las de VIH-2 y a cualquier subtipo derivado de las mismas.

Dado que muchos virus de ADN, así como los *Retroviridae* (en particular, la replicación de los *Retroviridae* requiere, en general, la transcripción inversa del genoma del virus de ARN en ADN), pueden integrar su información genética en el genoma de la célula huésped en forma de un provirus latente, el término "ácidos nucleicos asociados con infecciones víricas" no solo se refiere a los ácidos nucleicos que se originan de virus libres y asociados a células, sino también a las moléculas de ADN províricas que se integran en el genoma del huésped, moléculas de ADN vírico retrotranscritas (es decir, los "intermedios" de la replicación vírica), y transcritos derivados de ADN provírico (es decir, moléculas de ARN obtenidas por transcripción del genoma del ADN del huésped).

Los ácidos nucleicos diana no se someten en forma aislada al procedimiento de acuerdo con la invención, sino en forma de una muestra que se supone que comprende una o más especies de ácidos nucleicos diana. El término "una o más especies", como se usa en el presente documento, se refiere a uno o más tipos diferentes de ácidos nucleicos, tales como moléculas que tienen diferentes secuencias de nucleótidos y/o moléculas que descienden de diferentes orígenes (por ejemplo, ácidos nucleicos derivados de diferentes patógenos que infectan a una célula huésped).

El término "muestra", como se usa en el presente documento, se refiere a una muestra de sangre completa no tratada.

El término "sangre completa", como se usa en el presente documento, se refiere a la sangre con todos sus constituyentes. En otras palabras, la sangre completa comprende tanto glóbulos sanguíneos, tales como eritrocitos, leucocitos y trombocitos, como plasma sanguíneo en el que están suspendidos los glóbulos sanguíneos.

El término "no tratado", como se usa en el presente documento, debe entenderse de forma que, después de recoger la muestra (por ejemplo, mediante extracción de sangre de un paciente) y antes de someterla al procedimiento según la invención, no se produce más procesamiento de la muestra (por ejemplo, procedimientos de fraccionamiento, secado/reconstitución y similares).

A continuación se describe un procedimiento típico de detección de ácidos nucleicos que implica dichas muestras no tratadas.

El volumen de la muestra de fluido que se va a analizar puede estar en el intervalo de 1  $\mu$ l a 50  $\mu$ l, típicamente en el intervalo de 1  $\mu$ l a 45  $\mu$ l o de 1  $\mu$ l a 40  $\mu$ l o de 1  $\mu$ l a 30  $\mu$ l o de 1  $\mu$ l a 25  $\mu$ l o 1  $\mu$ l a 20  $\mu$ l o 1  $\mu$ l a 15  $\mu$ l. En modos de realización particulares, el volumen de la muestra de fluido está en el intervalo de 1  $\mu$ l a 10  $\mu$ l. Sin embargo, en el caso de que se analicen muestras de sangre completa, los volúmenes de muestra que superan los 50  $\mu$ l también están dentro del alcance de la invención.

El término "molécula de captura", como se usa en el presente documento, indica cualquier molécula que muestre un comportamiento de unión específico y/o una reactividad característica, lo que la hace adecuada para la formación de complejos con un ácido nucleico diana. Los ácidos nucleicos se usan típicamente como moléculas de captura. Los ejemplos de ácidos nucleicos que se pueden usar como moléculas de captura incluyen ácidos nucleicos naturales tales como el ácido desoxirribonucleico (ADN) o el ácido ribonucleico (ARN), así como análogos de ácidos nucleicos tales como, entre otros, ácidos peptidonucleicos (ANP) o ácidos nucleicos bloqueados (LNA). Ejemplos específicos de ácidos nucleicos naturales incluyen secuencias de ADN tales como ADN genómico o moléculas de ADNc, así como secuencias de ARN tales como moléculas de ARNnh, ARNm o ARNr o las secuencias de ácidos nucleicos de complemento inversas de los mismos. Dichos ácidos nucleicos pueden ser de cualquier longitud y pueden ser moléculas monocatenarias o bicatenarias. Típicamente, las moléculas de captura de ácido nucleico son oligonucleótidos monocatenarios que tienen una longitud de 10 a 150 nucleótidos, por ejemplo de 20 a 100 nucleótidos o 30 a 70 nucleótidos. En modos de realización específicos, las moléculas de captura se usan como cebadores en una PCR para amplificar cualquier ácido nucleico diana de interés presente en una muestra de fluido dada.

En algunos modos de realización, las moléculas de captura usadas en la invención pueden comprender al menos una región de secuencia específica (es decir, la parte de unión mencionada anteriormente), que es complementaria de una región de secuencia de un ácido nucleico diana (por ejemplo, un ácido nucleico asociado con una infección vírica), permitiendo, por tanto, detectar el emparejamiento de bases entre las moléculas de captura y el ácido nucleico. Típicamente, la región de unión específica tiene una longitud de al menos 20 nucleótidos, por ejemplo, al menos 30 nucleótidos, o al menos 40 nucleótidos. En particular, la secuencia de nucleótidos de la región de unión de las moléculas de captura es complementaria de la secuencia de nucleótidos correspondiente del ácido nucleico diana. Como se usa en el presente documento, debe entenderse que el término "nucleótido" se refiere tanto a ribonucleótidos como a desoxirribonucleótidos (es decir, moléculas de ARN y ADN).

Las moléculas de captura se pueden proporcionar (por ejemplo, en forma liofilizada o secada) en una o más de al menos una estructura adaptada para alojar líquidos del dispositivo como se describe anteriormente antes de la introducción de la muestra de fluido que se va a analizar. De forma alternativa, las moléculas de captura se pueden introducir en el dispositivo junto con la muestra (es decir, concomitantemente) o después de que la muestra ya se haya introducido.

Dentro del alcance de la invención se pueden emplear una o más especies de moléculas de captura. El término "una o más especies" indica uno o más tipos diferentes de moléculas de captura, tales como una o más moléculas de ácido nucleico que tienen diferentes secuencias de nucleótidos. Más de una especie de molécula de captura utilizada concomitantemente también se conoce como "colección". Dichas colecciones comprenden al menos dos, pero también pueden comprender muchas más moléculas diferentes, por ejemplo, al menos 5 especies diferentes, al menos 10 especies diferentes, al menos 30 especies diferentes, etc. Las colecciones también pueden estar presentes en forma de elementos de matriz o cualquier otra disposición espacial.

En algunos modos de realización de la invención, el análisis realizado en el dispositivo comprende además poner en contacto los complejos que comprenden un ácido nucleico diana que se va a detectar y una molécula de captura con un miembro de unión del dispositivo, estando configurado el miembro de unión para unirse al grupo de anclaje de la molécula de captura para unir los complejos al miembro de unión.

Los términos "miembro de unión" o "miembro de soporte", como se usan en el presente documento, se refieren a cualquier matriz, a la que las moléculas de captura, y por tanto también cualquier complejo que comprenda dicha molécula de captura, se pueden acoplar por medio del grupo de anclaje de las moléculas de captura por interacciones covalentes o no covalentes. Los ejemplos de dichas matrices comprenden, entre otros, los sustratos de elementos de matriz o partículas sintéticas tales como microesferas magnéticas (por ejemplo, microesferas de poliestirol paramagnéticas, también conocidas como Dynabeads®) y microesferas de látex, así como superficies porosas tales como CPG y similares. Dependiendo del tipo de molécula de captura, el tipo de grupo de anclaje y la aplicación pretendida, en cada caso es posible una gran variedad de enlaces. Por ejemplo, en caso de que el grupo de anclaje de las moléculas de captura pueda ser un resto de biotina, que puede estar acoplado a una avidina o un grupo de estreptavidina que se une al miembro de unión. De forma alternativa, las moléculas de captura pueden comprender un tramo de residuos de adenosina (por ejemplo, 10 residuos de adenosina) que interactuarán con un tramo correspondiente de residuos de timidina unidos al miembro de unión. Los reactivos de acoplamiento específicos que incluyen grupos de anclaje están disponibles comercialmente de diferentes proveedores y están bien establecidos en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook, J. *et al.*, *supra*; Ausubel, F.M. *et al.*, *supra*, y Lottspeich, F., y Zorbach H., *supra*).

El miembro de unión se puede proporcionar en una o más de las al menos una estructura del dispositivo descrito anteriormente antes de la introducción de la muestra de fluido que se va a analizar. De este modo, el miembro de unión se puede proporcionar en la misma una o más estructuras que las moléculas de captura o en al menos una estructura diferente. Típicamente, la etapa de formar complejos de moléculas de captura con ácidos nucleicos diana se realiza espacialmente separada de la etapa de poner en contacto los complejos con el miembro de unión, es decir, en diferentes estructuras o pocillos o cámaras de reacción del dispositivo. Por ejemplo, la etapa de formar complejos de moléculas de captura con ácidos nucleicos diana se realiza en el "pocillo de lisis" y la etapa de poner en contacto los complejos con el miembro de unión se realiza en el "pocillo central" mencionado en la FIG. 17. En dichos modos de realización, las moléculas de captura y el miembro de unión se proporcionan normalmente en diferentes estructuras adaptadas para alojar líquidos. En lugar de proporcionar el miembro de unión en el dispositivo antes de añadir la muestra, el miembro de unión se puede introducir en el dispositivo junto con la muestra (es decir, concomitantemente) o después de que la muestra ya se haya introducido.

En modos de realización particulares, el procedimiento comprende además someter el ácido nucleico diana a amplificación, es decir, aumentar su cantidad presente en la muestra antes de someter el mismo al análisis adicional para facilitar una detección adicional. Típicamente, la amplificación del ácido nucleico diana se logra por medio de una amplificación cíclica. La amplificación cíclica puede comprender cualquier número de ciclos de amplificación que sea igual o mayor que dos. Normalmente, la reacción de amplificación cíclica comprende al menos 10 o al menos 20 ciclos.

Un ejemplo de amplificación cíclica es una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La PCR es un procedimiento estándar establecido en biología molecular que se describe en detalle, por ejemplo, en Sambrook *et al.*, *supra*; y en Ausubel, F.M. *et al.*, *supra*. Típicamente, la PCR se usa para la amplificación de moléculas de ADN bicatenarias empleando una ADN polimerasa termoestable. En algunos modos de realización, la ADN polimerasa usada en la amplificación cíclica tiene actividad exonucleasa, particularmente actividad exonucleasa 5'→3'. Los ejemplos de dichas ADN polimerasas incluyen, entre otros, ADN polimerasa Taq o ADN polimerasa Tth (que están disponibles comercialmente de múltiples proveedores).

En caso de que el ácido nucleico diana sea una molécula de ARN, el procedimiento de la invención puede comprender además someter el ácido nucleico diana a transcripción inversa (es decir, producir una molécula de ADN a partir de una molécula de ARN correspondiente) antes de someterlo a amplificación. La transcripción inversa es otro procedimiento estándar en biología molecular y también se describe, por ejemplo, en Sambrook *et al.*, *supra*; y en Ausubel, F.M. *et al.*, *supra*.

Para este propósito, es decir, la amplificación de ácidos nucleicos, el dispositivo descrito anteriormente puede comprender además una o más unidades de control de la temperatura y/o unidades reguladoras de la temperatura para controlar y/o regular la temperatura dentro de la cámara de reacción. Dicha unidad de control de la temperatura y/o dicha unidad de regulación de la temperatura pueden comprender uno o más elementos de calentamiento y/o enfriamiento separados, que se pueden poner en contacto directamente con una o más cámaras de reacción del dispositivo. Típicamente, los uno o más elementos de calentamiento y/o enfriamiento están hechos de un material conductor de calor. Los ejemplos de dichos materiales conductores de calor incluyen, entre otros, silicio, materiales cerámicos como cerámicas de óxido de aluminio y/o metales como acero de alto grado, aluminio, cobre o latón. En la solicitud de patente internacional WO 01/02094 también se puede encontrar una descripción detallada ejemplar

de una unidad de control de la temperatura y/o un regulador de la temperatura adecuados para realizar la presente invención.

Por ejemplo, el control/regulación de la temperatura dentro de una estructura adaptada para alojar líquidos también se puede lograr usando un cuerpo de cámara hecho de un material eléctricamente conductor. El término "cuerpo de cámara", como se usa en el presente documento, se entiende que indica un cuerpo sólido que rodea al menos parcialmente la al menos una estructura o cámara de reacción del dispositivo. La al menos una estructura puede ser, al menos en parte, un componente integral del cuerpo de cámara (es decir, está hecho del mismo material que el cuerpo de cámara). Los ejemplos de materiales eléctricamente conductores incluyen materiales sintéticos eléctricamente conductores, como poliamida con un 5 a un 30 % de fibras de carbono, policarbonato con un 5 a un 30 % de fibras de carbono, poliamida con un 2 a un 20 % de fibras de acero inoxidable, y sulfuro de polifenileno con un 5 a un 40 % de fibras de carbono. Además, el cuerpo de cámara se puede diseñar para que comprenda hinchamientos y disminuciones, que permitan un calentamiento específico de la cámara de reacción o de las superficies correspondientes.

La estructura para alojar líquidos se puede rellenar con una solución que comprende los ácidos nucleicos diana que se van a amplificar de tal manera que se incremente la presión en la estructura. El incremento de presión en la estructura puede forzar los elementos de cubierta flexibles de la estructura contra el elemento de calentamiento y/o el elemento de enfriamiento.

La medición de la temperatura en la estructura se puede realizar mediante diversos procedimientos bien establecidos en la técnica, por ejemplo, usando sensores de resistencia integrados, sensores semiconductores, sensores de guía de ondas de luz, tintes policromáticos o cristales líquidos. Además, la temperatura en la cámara de reacción se puede determinar usando un sensor de temperatura integrado en el cuerpo de cámara, un pirómetro o un sensor infrarrojo, o midiendo la alteración dependiente de la temperatura de parámetros tales como el índice de refracción en la superficie en la que tiene lugar la detección o el valor de pH de la muestra, por ejemplo, midiendo la alteración del color de un indicador sensible al pH.

Normalmente, la amplificación, tal como una PCR, comprende tres etapas básicas (desnaturalización, hibridación de los cebadores y extensión de los cebadores) que se realizan de forma iterativa de manera cíclica. Sin embargo, la amplificación puede comprender además una etapa de desnaturalización inicial antes del primer ciclo de amplificación "verdadero" y/o una etapa de extensión final después de completar el ciclo de amplificación final, respectivamente. En algunos modos de realización, la amplificación del ácido nucleico diana comprende (al menos) una etapa de desnaturalización de ácidos nucleicos bicatenarios y/o una etapa combinada de hibridación y extensión de las moléculas de cebadores en los ácidos nucleicos diana (es decir, una "PCR de dos etapas").

Típicamente, la etapa de desnaturalización implica el calentamiento de la muestra que se va a analizar a una temperatura de 94 °C-95 °C, típicamente durante 0,5 s a 5 min, lo que da como resultado, por tanto, la disociación de las hebras de los moldes de ácido nucleico bicatenario. Someter una muestra que se va a analizar a dicha etapa de desnaturalización da como resultado (es decir, permite) la desnaturalización simultánea de los ácidos nucleicos bicatenarios en la muestra, incluyendo los ácidos nucleicos diana bicatenarios y los complejos de moléculas de captura con ácidos nucleicos diana (unidas al miembro de unión), dando como resultado esto último la liberación de los ácidos nucleicos diana del miembro de unión.

Típicamente, la etapa de hibridación implica el enfriamiento de la muestra que se va a analizar a una temperatura de 40 °C-65 °C, típicamente durante 1 s a 5 min, para permitir la asociación (es decir, la hibridación/emparejamiento de bases) de las moléculas de cebador a las hebras del molde de ácido nucleico desnaturalizado. La temperatura de reacción empleada depende de las propiedades químicas y/o físicas de las moléculas del cebador que se van a hibridar, tales como la composición de su secuencia de nucleótidos, su temperatura de fusión, su tendencia al plegado intramolecular (por ejemplo, la formación de estructuras bicatenarias en horquilla o giro) y similares. Dentro de algunos modos de realización de la presente invención, someter una muestra que se va a analizar a dicha etapa de hibridación da como resultado (es decir, permite) la reasociación de moléculas diana bicatenarias, y la formación de complejos de ácidos nucleicos diana con moléculas de captura, dando como resultado esto último la captura o recaptura de los ácidos nucleicos diana en el miembro de unión. Por tanto, en algunos modos de realización de la invención, la etapa de hibridación se realiza concomitantemente con la etapa de captura de ácidos nucleicos diana en el miembro de unión formando complejos con las moléculas de captura.

Finalmente, un etapa de extensión típico implica la extensión de las moléculas de cebador hibridadas para producir copias de longitud completa de las hebras del molde de ADN mediante una ADN polimerasa. La longitud del fragmento de ADN amplificado está determinada por los extremos 5' del par de cebadores empleados. Típicamente, la etapa de elongación se realiza a una temperatura de 70 °C-72 °C durante 1 s a 10 min. En algunos modos de realización de la presente invención, someter una muestra que se va a analizar a dicha etapa de extensión puede dar como resultado la replicación de los ácidos nucleicos diana que se van a analizar al permitir que los complejos de un cebador con un nucleico diana se hayan formado durante la etapa de hibridación se extiendan para generar fragmentos de ácido nucleico amplificados bicatenarios que tengan incorporado opcionalmente un marcador detectable que posteriormente se pueda detectar.

En algunos modos de realización, por ejemplo, por razones de seguridad, el pocillo central o la segunda estructura se pueden sellar de manera irreversible antes de iniciar la amplificación de los ácidos nucleicos diana. El sellado irreversible del pocillo central se puede lograr sellando una entrada y, opcionalmente, una salida del pocillo central. Por ejemplo, un canal y/o una válvula conectados con el pocillo central se puede sellar o soldar. Los canales o válvulas de plástico, por ejemplo, se pueden sellar térmicamente al poner en contacto un pasador caliente con el canal o la válvula, de modo que los plásticos se fundan y el canal o la válvula se bloqueen.

En modos de realización específicos, el procedimiento comprende además capturar los ácidos nucleicos diana que se han amplificado, típicamente sometiendo la muestra que se va a analizar a PCR, con respecto al miembro de unión (es decir, inmovilizando los ácidos nucleicos diana en el mismo). Como ya se ha descrito anteriormente, los ácidos nucleicos diana se pueden capturar con respecto al miembro de unión formando complejos con las moléculas de captura que todavía están acopladas al miembro de unión por medio del grupo de anclaje.

El procedimiento puede comprender además liberar los ácidos nucleicos diana amplificados capturados del miembro de unión y repetir las etapas de someter uno o más ácidos nucleicos diana a amplificación y capturar el ácido nucleico diana amplificado con respecto al miembro de unión. El término "liberar", como se usa en el presente documento, indica el desprendimiento o desunión de los ácidos nucleicos diana del miembro de unión. Esto puede lograrse, por ejemplo, enzimáticamente por medio de la escisión de cualquier enlace covalente o, en casos donde los ácidos nucleicos diana están unidos al miembro de unión por moléculas de captura de ácido nucleico, por medio del emparejamiento de bases complementario, aumentando la temperatura en la estructura en la que se realiza el ensayo, dando como resultado, por tanto, la separación de la hebra de ácido nucleico (es decir, la desnaturalización).

En dicho modo de realización, el ciclo de liberación de los ácidos nucleicos diana amplificados capturados del miembro de unión y la repetición de las etapas de someter uno o más ácidos nucleicos diana a amplificación y la captura de los ácidos nucleicos diana amplificados con respecto al miembro de unión se puede realizar al menos 5 veces, al menos 10 veces, al menos 20 veces, al menos 30 veces, al menos 50 veces o al menos 100 veces. La etapa de determinar un valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de los ácidos nucleicos diana capturados se puede realizar después de al menos un ciclo, por ejemplo, después de cada ciclo, de liberación de los ácidos nucleicos diana amplificados capturados del miembro de unión y la repetición de las etapas de someter uno o más ácidos nucleicos diana para amplificación y la captura de los ácidos nucleicos diana amplificados con respecto al miembro de unión.

La etapa de formar complejos, comprendiendo cada uno un ácido nucleico diana y una molécula de captura, en la que cada molécula de captura comprende una parte de unión específica a una región del ácido nucleico diana y un grupo de anclaje, se puede realizar espacialmente separada de la etapa de poner en contacto los complejos con un miembro de unión, estando configurado el miembro de unión para unirse al grupo de anclaje de la molécula de captura para unir los complejos al miembro de unión. En dicho modo de realización, el procedimiento se realiza en un dispositivo que comprende al menos dos estructuras adaptadas para alojar lípidos. Las al menos dos estructuras pueden estar en comunicación fluida, por ejemplo, con una red microfluídica. Por ejemplo, el procedimiento se puede realizar en el dispositivo 500 como se ilustra en las **figuras 18 y 19**. Los complejos que comprenden cada uno un ácido nucleico diana y una molécula de captura se pueden formar en la primera estructura 502. El complejo se puede transferirse a continuación a la segunda estructura 512, en la que los complejos se ponen en contacto con un miembro de unión como se describe anteriormente, que está configurado para unirse a un grupo de anclaje de la molécula de captura.

El término "determinar un valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de los ácidos nucleicos diana capturados", como se usa en el presente documento, se refiere a la detección/determinación de parámetros tales como conductividad eléctrica, potencial de oxidorreducción, absorción óptica, intensidad de fluorescencia o bioluminiscencia que permiten mediciones cualitativas y/o cuantitativas de los ácidos nucleicos diana capturados (o recapturados) en el miembro de unión. Se puede determinar solo uno de estos parámetros, pero también es posible determinar más de un parámetro (por ejemplo, la conductividad eléctrica y la intensidad de una señal de fluorescencia causada por un marcador adecuado), ya sea concomitante o consecutivamente.

Para realizar la reacción de detección, los ácidos nucleicos diana se pueden marcar con uno o más marcadores detectables. El término "una o más marcadores detectables", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier compuesto o resto que comprende una o más sustancias químicas o enzimas apropiadas, que generan directa o indirectamente un compuesto o señal detectable en una reacción química, física o enzimática. Por tanto, dicho marcador puede ser necesario para o facilitará la detección del compuesto indicador de interés al poder formar interacciones con dicho compuesto indicador. Como se usa en el presente documento, debe entenderse que el término incluye tanto marcadores detectables como tales (también denominados "marcadores") como cualquier compuesto acoplado a uno o más de dichos marcadores detectables. Además, los restos que interfieren en la generación de una señal detectable por un marcador (por ejemplo, un extintor que "secuestra" las emisiones resultantes de la excitación del fluoróforo, siempre que el extintor y el fluoróforo estén en estrecha proximidad) también pueden pertenecer a los marcadores detectables. Los marcadores detectables se pueden incorporar o unir

a los ácidos nucleicos diana, por ejemplo, en forma de ribonucleótidos, desoxinucleótidos o didesoxinucleótidos marcados y/o marcados.

Los marcadores detectables que se pueden usar incluyen cualquier compuesto, que directa o indirectamente genere un compuesto o señal detectable en una reacción química, física o enzimática. El marcado se puede lograr mediante procedimientos bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook, J. *et al.*, *supra*; y Lottspeich, F., y Zorbas H., *supra*). Los marcadores se pueden seleccionar, entre otros, entre marcadores fluorescentes, marcadores enzimáticos, marcadores de colores, marcadores cromogénicos, marcadores luminiscentes, marcadores radioactivos, haptenos, biotina, complejos metálicos, metales y oro coloidal. Todos estos tipos de marcadores están bien establecidos en la técnica. Un ejemplo de una reacción física que está mediada por dichos marcadores es la emisión de fluorescencia o fosforescencia tras la irradiación o excitación o la emisión de rayos X cuando se usa un marcador radiactivo. La fosfatasa alcalina, la peroxidasa de rábano picante, la  $\beta$ -galactosidasa y la  $\beta$ -lactamasa son ejemplos de marcadores enzimáticos, que catalizan la formación de productos de reacción cromógenos. En modos de realización específicos, los marcadores detectables son marcadores fluorescentes. Numerosos marcadores fluorescentes están bien establecidos en la técnica y están disponibles comercialmente de diferentes proveedores (véase, por ejemplo, The Handbook - A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, 10.<sup>a</sup> ed. (2006), Molecular Probes, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EE. UU.).

Para detectar dichos marcadores, se puede usar un sistema de detección que sea adecuado para determinar valores indicativos de la presencia y/o la cantidad de compuesto indicador capturado en un miembro de soporte. El sistema de detección puede estar conectado al dispositivo 500. Típicamente, el sistema de detección se sitúa opuesto a uno de la segunda estructura 512, opcionalmente opuesto a una región de superficie particular donde tiene lugar la detección. La selección de un sistema de detección adecuado depende de varios parámetros, tales como el tipo de marcadores utilizados para la detección o el tipo de análisis realizado. Diversos sistemas de detección ópticos y no ópticos están bien establecidos en la técnica. Se puede encontrar una descripción general de los sistemas de detección que se pueden usar con el procedimiento, por ejemplo, en Lottspeich, F., y Zorbas H., *supra*.

Típicamente, el sistema de detección es un sistema de detección óptica. En algunos modos de realización, la realización del procedimiento implica sistemas de detección simples, que se pueden basar en la medición de parámetros tales como fluorescencia, absorción óptica, transferencia de resonancia y similares.

En otros modos de realización, los sistemas de detección se basan en la comparación de las intensidades de fluorescencia de los ácidos nucleicos excitados espectralmente marcados con fluoróforos. La fluorescencia es la capacidad de las moléculas particulares para emitir su propia luz cuando se excitan con luz de una longitud de onda particular que da como resultado un comportamiento característico de absorción y emisión. En particular, la detección cuantitativa de señales de fluorescencia se realiza por medio de procedimientos modificados de microscopia de fluorescencia (para una revisión, véase, por ejemplo, Lichtman, J.W., y Conchello, J.A. (2005) Nature Methods 2, 910-919; Zimmermann, T. (2005) Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 95, 245-265). De este modo, las señales que se derivan de la absorción de luz y la emisión de luz, respectivamente, se separan por uno o más filtros y/o cordieritas y se visualizan en detectores adecuados. El análisis de los datos se realiza por medio del procesamiento digital de imágenes. El procesamiento de imágenes se puede lograr con varios paquetes de programas informáticos bien conocidos en la técnica (tal como Mathematica Digital Image Processing, EIKONA o Image-PRO). Otro programa informático adecuado para dichos propósitos es el programa informático Iconoclust (ClonDIAG Chip Technologies GmbH, Jena, Alemania).

Los sistemas de detección adecuados se pueden basar en procedimientos "clásicos" para medir una señal fluorescente, tal como la epifluorescencia o la microscopia de fluorescencia de campo oscuro (revisada, por ejemplo, en: Lakowicz, J.R. (1999) Principles of Fluorescence Spectroscopy, 2.<sup>a</sup> ed., Plenum Publishing Corp., NY).

Otro sistema de detección óptica que se puede usar es la microscopia de fluorescencia confocal, en la que el objeto se ilumina en el plano focal de la lente por medio de una fuente de luz puntual. Es importante destacar que la fuente de luz puntual, el objeto y el detector de luz puntual están situados en planos ópticamente conjugados. Ejemplos de dichos sistemas confocales se describen en detalle, por ejemplo, en Diaspro, A. (2002) Confocal and 2-photon-microscopy: Foundations, Applications and Advances, Wiley-Liss, Hoboken, NJ. El sistema óptico de fluorescencia suele ser un microscopio de fluorescencia sin enfoque automático, por ejemplo, un microscopio de fluorescencia que tiene un foco fijo.

Otros procedimientos de detección de fluorescencia que también se pueden usarse incluyen, entre otros, microscopia de fluorescencia interna total (véase, por ejemplo, Axelrod, D. (1999) Surface fluorescence microscopy with evanescent illumination, en: Lacey, A. (ed.) Light Microscopy in Biology, Oxford University Press, New York, 399-423), microscopia de tiempo de vida de imagen fluorescente (véase, por ejemplo, Dowling, K. *et al.* (1999) J. Mod. Optics 46, 199-209), transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET; véase, por ejemplo, Periasamy, A. (2001) J. Biomed. Optics 6, 287-291), transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia (BRET; véase, por ejemplo, Wilson, T., y Hastings, J.W. (1998) Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 14, 197-230) y

espectroscopia de correlación de fluorescencia (véase, por ejemplo, Hess, S.T. *et al.* (2002) *Biochemistry* 41, 697-705).

5 En modos de realización específicos, la detección se realiza usando FRET o BRET, que se basan en la formación respectiva de pares de extinción de fluorescencia o bioluminiscencia. El uso de FRET también se describe, por ejemplo, en Liu, B. *et al.* (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 589-593; y Szollosi, J. *et al.* (2002) *J. Biotechnol.* 82, 251-266. El uso de BRET se detalla, por ejemplo, en Prinz, A. *et al.* (2006) *ChemBiochem.* 7, 1007-1012; y Xu, Y. *et al.* (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 151-156.

10 La determinación de uno o más valores indicativos de la presencia y/o la cantidad de los ácidos nucleicos diana capturados puede comprender la monitorización dependiente del tiempo de uno o más valores indicativos obtenidos (es decir, la realización repetida de la etapa de determinación/detección y la monitorización de la evolución del valor indicativo a lo largo del tiempo).

15 La etapa de proporcionar los ácidos nucleicos diana puede comprender liberar los ácidos nucleicos diana del material biológico comprendido en la muestra. Para este fin, la muestra se puede calentar para destruir las membranas celulares y/o las cápsides víricas (por ejemplo, empleando una unidad de control de la temperatura y/o una unidad de regulación de la temperatura como se describe a continuación). En algunos modos de realización, esta etapa de liberación comprende poner en contacto la muestra de fluido con un reactivo de lisis, por ejemplo, un  
20 reactivo que comprende uno o más detergentes que desintegran las membranas celulares y/o las cápsides víricas. Dichos reactivos de lisis son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook, J. *et al.* (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2.<sup>a</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) y disponible comercialmente de muchos proveedores.

25 El procedimiento puede comprender además separar el uno o más ácidos nucleicos diana del material concomitante.

Proporcionar los ácidos nucleicos diana se puede realizar espacialmente separado de las etapas de poner en contacto los complejos que comprenden cada uno un ácido nucleico diana y una molécula de captura con el miembro de unión, sometiendo a amplificación los ácidos nucleicos diana, capturando los ácidos nucleicos diana  
30 amplificados con respecto al miembro de unión y determinar un valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de los ácidos nucleicos diana capturados. Por ejemplo, los ácidos nucleicos diana se pueden proporcionar en la misma estructura 502 en la que se forman los complejos que comprenden cada uno un ácido nucleico diana y una molécula de captura.

35 En otro modo de realización, el procedimiento se realiza en un dispositivo como se describe anteriormente. Por ejemplo, el dispositivo puede comprender un primer pocillo 502 y los complejos que comprenden cada uno un ácido nucleico diana y una molécula de captura se forman en el primer pocillo 502. Además, el dispositivo puede comprender un segundo pocillo 512 y determinar un valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de los ácidos nucleicos diana capturados se puede realizar en el segundo pocillo 512 configurado para detectar uno o más ácidos  
40 nucleicos diana. El segundo pocillo 512 puede comprender un elemento de cubierta que cubre el segundo pocillo y una unidad de accionador adaptada para ser accionada para deformar el elemento de cubierta. Además, someter uno o más ácidos nucleicos diana a amplificación y/o (re)capturar los ácidos nucleicos diana amplificados con respecto al miembro de unión también se pueden realizar en el segundo pocillo 512.

45 La determinación de un valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de los ácidos nucleicos diana capturados se puede realizar con el accionador accionado para deformar el elemento de cubierta. En dicho modo de realización, el elemento de cubierta se puede deformar de tal manera que se reduzca el volumen del pocillo de detección 512. Además, el volumen del segundo pocillo se puede volver a aumentar después de determinar el valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de los ácidos nucleicos diana capturados.

50 De acuerdo con otra divulgación ejemplar, se proporciona un procedimiento, que comprende

a) proporcionar una cantidad de un compuesto indicador; un primer miembro de unión que está configurado para unirse a un grupo de anclaje de una molécula de captura; un segundo miembro de unión que puede  
55 de capturar el compuesto indicador; una cantidad de un ácido nucleico diana que puede formar complejos con el compuesto indicador; la formación de complejos con un compuesto indicador que inhibe la captura del compuesto indicador por el segundo miembro de unión; una cantidad de moléculas de captura en las que cada molécula de captura comprende una parte de unión específica para una región de los ácidos nucleicos diana y un grupo de anclaje;

60 b) formar complejos que comprendan cada uno un ácido nucleico diana y una molécula de captura;

c) poner en contacto los complejos con el primer miembro de unión para unir los complejos al primer miembro de unión;

65 d) liberar al menos un subconjunto de la cantidad de ácido nucleico diana del primer miembro de unión;

e) formar complejos de un subconjunto de la cantidad de un compuesto indicador con al menos un subconjunto de la cantidad de ácido nucleico diana;

5 f) capturar un subconjunto restante de la cantidad de compuesto indicador que no esté en complejo con un ácido nucleico diana en el segundo miembro de unión; y

g) determinar un valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de compuesto indicador capturado en el segundo miembro de unión.

10 El término "molécula indicadora" o "compuesto indicador", como se usa en el presente documento, indica cualquier molécula que pueda formar complejos con uno o más ácidos nucleicos diana y que se pueda capturar en un miembro de soporte, por ejemplo, el segundo miembro de unión, en el que la formación de complejos con los ácidos nucleicos diana inhibe la captura del compuesto indicador en el miembro de soporte, por ejemplo, el segundo miembro de unión. De este modo, el término "que puede formar complejos", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier interacción entre una molécula indicadora y un ácido nucleico diana. En otras palabras, el término indica la unión de las moléculas entre sí que se puede lograr por medio de una región de unión común o diferente comprendida en la molécula indicadora que media la interacción con la diana (tal como por medio del emparejamiento de bases de Watson-Crick entre secuencias de nucleótidos complementarias). Típicamente, la interacción es reversible. De forma análoga, el término "ser capturado en un miembro de soporte" o "ser capturado en el segundo miembro de unión" también indica cualquier interacción directa o indirecta (por ejemplo, por medio de moléculas de captura; véase a continuación) de una molécula indicadora con un miembro de soporte dado. Esta interacción es también reversible, en general.

25 En general, las moléculas indicadoras pueden ser moléculas de ácido nucleico (es decir, moléculas de ARN o ADN como se describe anteriormente) que tienen una longitud de 10 a 100 nucleótidos, por ejemplo 15 a 50 nucleótidos, 15 a 40 nucleótidos o 20 a 30 nucleótidos. Normalmente, las moléculas indicadoras son moléculas de ácido nucleico monocatenario (es decir, oligonucleótidos). El compuesto indicador está configurado de modo que la unión de dicha molécula indicadora a un ácido nucleico diana que se va a detectar inhibe la captura de la molécula indicadora en el segundo miembro de unión. Las moléculas indicadoras de ácido nucleico pueden comprender al menos una región de unión específica (también denominada en el presente documento "sitio de interacción") que puede no solo interactuar con el ácido nucleico diana (por ejemplo, mediante la unión a una región de secuencia al menos parcialmente complementaria del ácido nucleico diana, permitiendo, por tanto, por ejemplo, detectar el emparejamiento de bases de Watson-Crick entre la molécula indicadora y el ácido nucleico diana), sino también ser capturada en el segundo miembro de unión. Típicamente, la región de unión específica comprendida en la molécula indicadora tiene una longitud de al menos 12 nucleótidos, por ejemplo, al menos 15 nucleótidos, al menos 18 nucleótidos o al menos 22 nucleótidos. La secuencia de nucleótidos de la parte de unión de las moléculas indicadoras puede ser complementaria de la secuencia de nucleótidos correspondiente del ácido nucleico diana.

40 Se pueden emplear una o más especies de moléculas indicadoras. El término "una o más especies" indica uno o más tipos diferentes de moléculas indicadoras, tales como una o más moléculas de ácido nucleico que tienen diferentes secuencias de nucleótidos.

45 Un "primer miembro de unión" como se usa en el presente documento puede ser un miembro de unión como se describe anteriormente. Por ejemplo, un primer miembro de unión se puede referir a cualquier matriz sólida a la cual las moléculas de captura, y por tanto también cualquier complejo que comprenda dichas moléculas de captura, se pueden acoplar por medio del grupo de anclaje de las moléculas de captura por interacciones covalentes o no covalentes. Los ejemplos de dichas matrices comprenden, entre otras, partículas sintéticas, tales como microesferas magnéticas (por ejemplo, microesferas de poliestiril paramagnéticas, también conocidas como Dynabeads®) y microesferas de látex.

50 Un "segundo miembro de unión" como se usa en el presente documento puede ser un miembro de unión como se describe anteriormente. Por ejemplo, un segundo miembro de unión se refiere a cualquier matriz sólida, en la que las moléculas indicadoras se pueden capturar directamente (por ejemplo, por medio de un grupo de anclaje comprendido en la molécula indicadora) o de manera indirecta por medio de una o más especies de moléculas de captura específicas de indicador que pueden capturar una molécula indicadora al segundo miembro de unión mediante interacciones covalentes o no covalentes. Los ejemplos de segundos miembros de unión que se pueden usar incluyen, entre otros, los sustratos de elementos de matriz (por ejemplo, portaobjetos de microscopio, obleas o materiales cerámicos).

60 El término "molécula de captura específica de indicador", como se usa en el presente documento, indica cualquier molécula que esté, por ejemplo, unida a o inmovilizada en el segundo miembro de unión que muestre un comportamiento de unión específico y/o una reactividad característica, lo que la hace adecuada para la formación de complejos con una molécula indicadora (es decir, la unión a la molécula indicadora). Los ácidos nucleicos se usan típicamente como moléculas de captura. Los ejemplos de ácidos nucleicos que se pueden usar como moléculas de captura específica de indicador incluyen ácidos nucleicos naturales tales como el ácido desoxirribonucleico (ADN) o

65

el ácido ribonucleico (ARN), así como análogos de ácidos nucleicos tales como, entre otros, ácidos peptidonucleicos (ANP) o ácidos nucleicos bloqueados (LNA). Ejemplos específicos de ácidos nucleicos naturales incluyen secuencias de ADN tales como ADN genómico o moléculas de ADNc, así como secuencias de ARN tales como moléculas de ARN<sub>h</sub>, ARN<sub>m</sub> o ARN<sub>r</sub> o las secuencias de ácidos nucleicos de complemento inversas de los mismos.

5 Dichos ácidos nucleicos pueden ser de cualquier longitud y pueden ser moléculas monocatenarias o bicatenarias. Típicamente, las moléculas de captura específicas de indicador son oligonucleótidos monocatenarios que tienen una longitud de 10 a 100 nucleótidos, por ejemplo de 15 a 50 nucleótidos o 20 a 30 nucleótidos.

10 Las moléculas de captura específicas de indicador pueden comprender al menos una región de secuencia específica (es decir, la región de unión), que se configura para unirse a una molécula indicadora, por ejemplo, para interactuar con una región de secuencia complementaria de una molécula indicadora por medio del emparejamiento de bases entre las moléculas de captura específicas de indicador y el ácido nucleico que se va a detectar. Típicamente, la región de unión específica tiene una longitud de al menos 12 nucleótidos, por ejemplo, al menos 15 nucleótidos, al menos 18 nucleótidos o al menos 22 nucleótidos. La secuencia de nucleótidos de la región de unión de las moléculas de captura específicas de indicador puede ser complementaria de la secuencia de nucleótidos correspondiente de la molécula indicadora.

20 Al menos una parte de un sitio de interacción del compuesto indicador que puede de formar un complejo con un ácido nucleico diana también es posible que pueda formar un complejo con una molécula de captura específica de indicador. En otras palabras, las moléculas de captura específicas de indicador y los ácidos nucleicos diana compiten para formar un complejo con el compuesto indicador, es decir, las regiones de unión respectivas comprendidas en las moléculas de captura específicas de indicador y los ácidos nucleicos diana reconocen la(s) misma(s) o al menos similar(es) secuencia(s) correspondiente(s) de una molécula indicadora. El término "secuencias similares", como se usa en el presente documento, indica secuencias que difieren solo en uno o más emparejamientos erróneos de nucleótidos individuales (es decir, pares de nucleótidos no complementarios) o en una o más adiciones, inserciones o deleciones de nucleótidos individuales (es decir, residuos adicionales o carentes de nucleótidos). Por tanto, las regiones de unión respectivas comprendidas en las moléculas de captura específicas de indicador y los ácidos nucleicos diana son al menos parcialmente idénticas. El término "parcialmente idéntico", como se usa en el presente documento, indica secuencias que difieren solo en uno o más nucleótidos individuales, como se describe anteriormente, o secuencias que tienen sitios de unión superpuestos, es decir, secuencias que comparten una secuencia de nucleótidos común pero difieren en al menos otra parte de la región de la secuencia. Sin embargo, también es posible que las respectivas regiones de unión comprendidas en las moléculas de captura específicas de indicador y los ácidos nucleicos diana reconozcan diferentes secuencias no superpuestas (por ejemplo, adyacentes) de una molécula indicadora, pero que la unión de la molécula de captura específica de indicador o el ácido nucleico diana a la molécula indicadora interfiera estéricamente en la unión de la otra.

35 El equilibrio químico entre las etapas de formación de complejos de compuesto indicador y ácido nucleico diana por un parte y la captura de compuesto indicador en el segundo miembro de unión (por ejemplo, formando complejos con una molécula de captura específica de indicador) por otra parte se puede ver influido variando el grado de similitud y/o identidad parcial de las secuencias de la molécula de captura específica de indicador (con respecto a las secuencias del compuesto indicador) y el compuesto indicador (con respecto al ácido nucleico diana, respectivamente, como se describe anteriormente).

40 Por ejemplo, las secuencias de moléculas de captura específicas de indicador se pueden seleccionar de modo que la región de unión con respecto a la secuencia del compuesto indicador sea más corta o más larga que la de la región de unión de la secuencia del compuesto indicador con respecto a la secuencia de ácido nucleico diana. De esta manera, la afinidad de unión del compuesto indicador con respecto al ácido nucleico diana en comparación con la del compuesto indicador con respecto a la molécula de captura específica de indicador se puede incrementar o disminuir.

45 Se pueden emplear una o más especies de moléculas de captura específicas de indicador. El término "una o más especies" indica uno o más tipos diferentes de moléculas de captura específicas de indicador, tales como una o más moléculas de ácido nucleico que tienen diferentes secuencias de nucleótidos. Más de una especie de molécula de captura específica de indicador utilizada concomitantemente también se conoce como "colección". Dichas colecciones comprenden al menos dos, pero también pueden comprender muchas más moléculas diferentes, por ejemplo, al menos 10 especies diferentes, al menos 20 especies diferentes, al menos 50 especies diferentes, etc. Las colecciones también pueden estar dispuestas en diferentes localizaciones con respecto al segundo miembro de unión. Por ejemplo, pueden estar presentes en forma de matrices o cualquier otra disposición espacial.

50 El término "matriz" (también denominado "micromatriz"), como se usa en el presente documento, se refiere a una disposición espacial (ordenación) definida de moléculas de captura, tales como moléculas de captura específicas de indicador en un miembro de unión, por ejemplo, el segundo miembro de unión (también denominado "sustrato"), en la que la posición de cada molécula dentro de la matriz se determina por separado. Típicamente, la micromatriz comprende sitios definidos o regiones predeterminadas, es decir, los denominados "elementos de matriz" o "manchas", que se pueden disponer en un patrón particular, en el que cada elemento de matriz típicamente comprende solo una especie de moléculas de captura. La disposición de las moléculas de captura, tales como las

moléculas de captura específicas de indicador en el soporte, por ejemplo, el segundo miembro de unión, se puede generar por medio de interacciones covalentes o no covalentes. Sin embargo, las moléculas de captura también se pueden inmovilizar directamente dentro de la cámara de reacción de un dispositivo usado para realizar el procedimiento (véase a continuación).

Un "ácido nucleico diana" puede ser un ácido nucleico diana como se describe anteriormente. Por ejemplo, el ácido nucleico diana puede ser un ácido nucleico asociado con infecciones víricas tal como el VIH.

Típicamente, los ácidos nucleicos diana no se someten en forma aislada al procedimiento descrito, sino en forma de una muestra como se describe anteriormente que se supone que comprende una o más especies de ácidos nucleicos diana. El término "una o más especies", como se usa en el presente documento, se refiere a uno o más tipos diferentes de ácidos nucleicos, tales como moléculas que tienen diferentes secuencias de nucleótidos y/o moléculas que descienden de diferentes orígenes (por ejemplo, ácidos nucleicos derivados de diferentes patógenos que infectan a una célula huésped).

El término "muestra", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier muestra líquida como se describe anteriormente. Los ejemplos de muestras líquidas que se pueden analizar incluyen, entre otros, fluidos corporales humanos y no humanos tales como sangre completa. En algunos modos de realización de la invención, la muestra analizada es una muestra no tratada tal como una muestra de sangre completa no tratada como se describe anteriormente. El volumen de la muestra de fluido que se va a analizar puede estar en el intervalo de 1 µl a 50 µl, típicamente en el intervalo de 1 µl a 45 µl o de 1 µl a 40 µl o de 1 µl a 30 µl o de 1 µl a 25 µl o 1 µl a 20 µl o 1 µl a 15 µl. En ejemplos particulares, el volumen de la muestra de fluido está en el intervalo de 1 µl a 10 µl. Sin embargo, en el caso de que se analicen muestras de sangre completa, los volúmenes de muestra que superan los 50 µl también están dentro del alcance de la divulgación.

El término "determinar un valor indicativo de la presencia y/o la cantidad del compuesto indicador capturado en el segundo miembro de unión.", como se usa en el presente documento, se refiere a la detección/determinación de parámetros tales como conductividad eléctrica, potencial de oxidorreducción, absorción óptica, intensidad de fluorescencia o bioluminiscencia que permiten mediciones cualitativas y/o cuantitativas de las moléculas indicadoras capturadas (o recapturadas) en el segundo miembro de unión. Se puede determinar solo uno de estos parámetros, pero también es posible determinar más de un parámetro (por ejemplo, la conductividad eléctrica y la intensidad de una señal de fluorescencia causada por un marcador adecuado), ya sea concomitante o consecutivamente.

El procedimiento puede comprender además determinar un valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de ácido nucleico diana basado en el valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de compuesto indicador capturado en el segundo miembro de unión. Es decir, la presencia y/o la cantidad de uno o más ácidos nucleicos diana presentes en una muestra particular se puede calcular en base a la diferencia entre la presencia y/o la cantidad de compuesto indicador que está presente antes de la formación de los complejos de ácido nucleico diana/molécula indicadora y la cantidad de compuesto indicador que se captura en el segundo miembro de unión después de dicha formación de complejos.

Para realizar la reacción de detección, el compuesto indicador puede comprender uno o más marcadores detectables como se describe anteriormente. Por ejemplo, el compuesto indicador puede comprender dos marcadores detectables. Los marcadores detectables pueden ser marcadores fluorescentes. Numerosos marcadores fluorescentes están bien establecidos en la técnica y están disponibles comercialmente de diferentes proveedores (véase, por ejemplo, *The Handbook - A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*, 10.<sup>a</sup> ed. (2006), Molecular Probes, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EE. UU.).

Para detectar dichos marcadores, el dispositivo usado para realizar el procedimiento puede comprender además un sistema de detección adecuado para determinar valores indicativos de la presencia y/o la cantidad de compuesto indicador capturado en el segundo miembro de unión. Por ejemplo, se puede usar un sistema de detección adecuado para determinar valores indicativos de la presencia y/o la cantidad de ácidos nucleicos diana capturados en un miembro de unión como se describe anteriormente.

El procedimiento puede comprender además liberar el subconjunto restante de la cantidad de compuesto indicador del segundo miembro de unión después de las etapas de formar complejos de un subconjunto de la cantidad de compuesto indicador con al menos un subconjunto de la cantidad de ácido nucleico diana; capturar un subconjunto restante de la cantidad de compuesto indicador que no está en complejo con un ácido nucleico diana en el segundo miembro de unión; y determinar el valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de compuesto indicador capturado en el segundo miembro de unión. El término "liberar", como se usa en el presente documento, indica el desprendimiento o desunión de las moléculas indicadoras del segundo miembro de unión. Esto puede lograrse, por ejemplo, enzimáticamente por medio de la escisión de cualquier enlace covalente o, en casos donde las moléculas indicadoras de ácido nucleico están unidos al segundo miembro de unión por moléculas de captura de ácido nucleico específicas de indicador, por medio del emparejamiento de bases complementario, aumentando la temperatura en la estructura en la que se realiza el ensayo, dando como resultado, por tanto, la separación de la hebra de ácido nucleico (es decir, la desnaturalización).

Las etapas de liberación, formación de complejos, captura y determinación se pueden repetir N veces adicionales, donde N es un número entero mayor o igual que 1. En otras palabras, el procedimiento se realiza de manera cíclica. El número entero N puede ser  $\geq 5$ ,  $\geq 10$  o  $\geq 20$ .

Además, la etapa de formar complejos de un subconjunto de la cantidad de compuesto indicador con al menos un subconjunto de la cantidad de ácido nucleico diana y la etapa de capturar un subconjunto restante de la cantidad de compuesto indicador que no está en complejo con un ácido nucleico diana en el segundo miembro de unión se pueden realizar concomitantemente.

El procedimiento puede comprender además someter los ácidos nucleicos diana a amplificación, es decir, aumentar su cantidad presente en la muestra antes de someter los mismos al análisis adicional para facilitar una detección adicional. Típicamente, la amplificación del ácido nucleico diana se logra por medio de una amplificación cíclica. La amplificación cíclica puede comprender cualquier número de ciclos de amplificación que sea igual o mayor que dos. Normalmente, la reacción de amplificación cíclica comprende al menos 10 o al menos 20 ciclos.

Un ejemplo de amplificación cíclica es una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como se describe anteriormente. Típicamente, la PCR se usa para la amplificación de moléculas de ADN bicatenarias empleando una ADN polimerasa termoestable. La ADN polimerasa usada en la amplificación cíclica puede tener actividad exonucleasa, en particular actividad exonucleasa 5'→3'. Los ejemplos de dichas ADN polimerasas incluyen, entre otros, ADN polimerasa Taq o ADN polimerasa Tth (que están disponibles comercialmente de múltiples proveedores). Por medio de esta actividad exonucleasa 5'→3', la ADN polimerasa puede atacar nucleolíticamente los extremos 5' marcados de moléculas indicadoras que están unidas a los ácidos nucleicos diana, dando como resultado una degradación progresiva de dichas moléculas indicadoras. Como resultado, la cantidad de compuesto indicador que se captura en el segundo miembro de unión disminuye adicionalmente durante cada ciclo de la reacción de amplificación. Opcionalmente, la ADN polimerasa empleada también puede presentar una actividad exonucleasa 3'→5' ("actividad de corrección") para retirar un nucleótido incorrecto que se ha añadido a la hebra de ADN naciente en una posición de secuencia particular. Los ejemplos de dichas ADN polimerasas que tienen ambas actividades exonucleasa incluyen, entre otros, la ADN polimerasa Pwo y la ADN polimerasa Pfu (ambas enzimas también están disponibles comercialmente de varios proveedores).

Si el ácido nucleico diana es una molécula de ARN, el procedimiento puede comprender además someter el ácido nucleico diana a una transcripción inversa como se describe anteriormente antes de someterlo a amplificación.

La amplificación del ácido nucleico diana se puede iniciar antes de la etapa de formar complejos de un subconjunto de la cantidad de compuesto indicador con al menos un subconjunto de la cantidad de ácido nucleico diana. Es decir, el ácido nucleico diana se somete a amplificación al tiempo que se permite que los compuestos indicadores formen un complejo con un ácido nucleico diana, y los compuestos indicadores que no están en complejo con un ácido nucleico diana se recapturan en el segundo miembro de unión.

Para este propósito, es decir, la amplificación de ácido nucleico, se puede usar un dispositivo 500 como se ilustra en las **figuras 18 y 19** para realizar el procedimiento, que puede comprender además una o más unidades de control de la temperatura y/o unidades de regulación de la temperatura como se describe anteriormente para controlar y/o regular la temperatura dentro de la estructura o cámara de reacción, por ejemplo, el pocillo central 502.

La estructura para alojar líquidos se puede rellenar con una solución que comprende los ácidos nucleicos diana que se van a amplificar de tal manera que se incremente la presión en la estructura, por lo que el incremento de la presión en la estructura fuerza los uno o más elementos de cubierta flexibles de la estructura contra el elemento de calentamiento y/o elemento de enfriamiento. Por ejemplo, para realizar la amplificación de las dianas de ácido nucleico, la estructura se puede rellenar de modo que los uno o más elementos de cubierta flexibles realicen una flexión convexa presionando, por tanto, los uno o más elementos de cubierta contra el elemento de calentamiento y/o el elemento de enfriamiento y permitiendo una conductancia térmica eficaz.

La medición de la temperatura en la cámara de reacción se puede realizar como se describe anteriormente.

Normalmente, la amplificación, tal como una PCR, comprende tres etapas básicas (desnaturalización, hibridación de los cebadores y extensión de los cebadores) que se realizan de forma iterativa de manera cíclica. Sin embargo, la amplificación puede comprender además una etapa de desnaturalización inicial antes del primer ciclo de amplificación "verdadero" y/o una etapa de extensión final después de completar el ciclo de amplificación final, respectivamente. La amplificación del ácido nucleico diana puede comprender (al menos) una etapa de desnaturalización de ácidos nucleicos bicatenarios y/o una etapa combinada de hibridación y extensión de las moléculas de cebadores en los ácidos nucleicos diana (es decir, una "PCR de dos etapas").

La etapa de desnaturalización implica el calentamiento de la muestra que se va a analizar a una temperatura de 94 °C-95 °C, típicamente durante 0,5 s a 5 min, lo que da como resultado, por tanto, la disociación de las hebras de los moldes de ácido nucleico bicatenario. Someter una muestra que se va a analizar a dicha etapa de

desnaturalización puede dar como resultado además (es decir, permitir) la desnaturalización simultánea de los ácidos nucleicos bicatenarios en la muestra, incluyendo moléculas diana bicatenarias, moléculas indicadoras bicatenarias, complejos de compuestos indicadores con ácidos nucleicos diana y complejos de compuestos indicadores con moléculas de captura específicas de indicador (unidas al segundo miembro de unión), dando como resultado esto último la liberación de los compuestos indicadores del segundo miembro de unión.

La etapa de hibridación implica el enfriamiento de la muestra que se va a analizar a una temperatura de 40 °C-65 °C, típicamente durante 1 s a 5 min, para permitir la asociación (es decir, la hibridación/emparejamiento de bases) de las moléculas de cebador a las hebras del molde de ácido nucleico desnaturalizado. La temperatura de reacción empleada depende de las propiedades químicas y/o físicas de las moléculas del cebador que se van a hibridar, tales como la composición de su secuencia de nucleótidos, su temperatura de fusión, su tendencia al plegado intramolecular (por ejemplo, la formación de estructuras bicatenarias en horquilla o giro) y similares. Someter una muestra que se va a analizar a dicha etapa de hibridación puede dar como resultado además (es decir, permitir) la reasociación de moléculas diana bicatenarias, la reasociación de moléculas indicadoras bicatenarias, la formación de complejos de compuestos indicadores con ácidos nucleicos dianas, y la formación de complejos de compuestos indicadores que no están en complejo con un ácido nucleico diana con moléculas de captura específicas de indicador, dando como resultado esto último la captura o recaptura de los compuestos indicadores en el segundo miembro de unión. Por tanto, la etapa de hibridación se puede realizar concomitantemente con la etapa de formar complejos de un subconjunto de la cantidad de compuesto indicador con al menos un subconjunto de la cantidad de ácido nucleico diana y/o la etapa de capturar un subconjunto restante de la cantidad de compuesto indicador que no está en complejo con un ácido nucleico diana en el segundo miembro de unión.

Finalmente, la etapa de extensión implica la extensión de las moléculas de cebador hibridadas para producir copias de longitud completa de las hebras del molde de ADN mediante una ADN polimerasa. La longitud del fragmento de ADN amplificado está determinada por los extremos 5' del par de cebadores empleados. Típicamente, la etapa de elongación se realiza a una temperatura de 70 °C-72 °C durante 1 s a 10 min. Someter una muestra que se va a analizar a dicha etapa de extensión puede dar como resultado además la replicación de los ácidos nucleicos diana que se van a analizar al permitir que los complejos de un subconjunto de la cantidad de compuesto indicador con al menos un subconjunto de la cantidad de ácido nucleico diana que se ha formado durante la etapa de hibridación se extiendan y generen fragmentos de ácido nucleico amplificado bicatenario que tienen incorporado un compuesto indicador opcionalmente marcado que posteriormente se puede detectar.

Por ejemplo, por razones de seguridad, el pocillo central o la segunda estructura se pueden sellar de manera irreversible antes de iniciar la amplificación de los ácidos nucleicos diana. El sellado irreversible del pocillo central se puede lograr sellando una entrada y, opcionalmente, una salida del pocillo central. Por ejemplo, un canal y/o una válvula conectados con el pocillo central se puede sellar o soldar. Los canales o válvulas de plástico se pueden sellar térmicamente al poner en contacto un pasador caliente con el canal o la válvula, de modo que los plásticos se fundan y el canal o la válvula se bloqueen.

Para realizar la reacción de detección, los compuestos indicadores se pueden marcar con uno o más marcadores detectables como se describe anteriormente, por ejemplo, marcadores fluorescentes. Los marcadores detectables se pueden incorporar o unir a las moléculas indicadoras, por ejemplo, en forma de ribonucleótidos, desoxinucleótidos o didesoxinucleótidos modificados y/o marcados. Para detectar dichos marcadores, se pueden usar sistemas de detección como los descritos anteriormente, por ejemplo, sistemas de detección óptica.

La detección/determinación de un valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de los ácidos nucleicos diana se puede realizar solo una o más de una vez durante el ensayo realizado. En caso de que se realice más de una etapa de detección durante un solo ensayo, se puede calcular el valor medio de los resultados obtenidos. Los datos obtenidos en uno o más ciclos de detección se pueden analizar y procesar matemáticamente usando el programa informático apropiado conocido por los expertos en la técnica para determinar, entre otros, la presencia, la longitud o la secuencia de uno o más ácidos nucleicos diana y/o para calcular su cantidad.

En particular, si el compuesto indicador está en exceso del ácido nucleico diana, el valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de compuesto indicador capturado en el segundo miembro de unión se puede determinar antes de que la formación complejos de un subconjunto de la cantidad de compuesto indicador con al menos un subconjunto de la cantidad de ácido nucleico diana y la captura de un subconjunto restante de la cantidad de compuesto indicador que no está en complejo con un ácido nucleico diana en el segundo miembro de unión estén en equilibrio químico. Por ejemplo, la etapa de determinación/detección se realiza durante la etapa de hibridación de una reacción de amplificación. Sin embargo, también es posible realizar la reacción de determinación/detección después de completar la etapa de hibridación (es decir, durante o después de completar la etapa de elongación).

El valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de compuesto indicador capturado en el segundo miembro de unión se puede determinar de 1 s a 120 s (por ejemplo, 1, 5, 10, 15, 20, 30, 60 o 120 s) después de iniciar las etapas de formar complejos de un subconjunto de la cantidad de compuesto indicador con al menos un subconjunto de la cantidad de ácido nucleico diana, y de capturar un subconjunto restante de la cantidad de compuesto indicador que no está en complejo con un ácido nucleico diana en el segundo miembro de unión.

- 5 El valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de compuesto indicador capturado en el segundo miembro de unión se puede determinar después de al menos un ciclo de la amplificación cíclica que comprende etapas de desnaturalización, hibridación y elongación, por ejemplo, durante o después de la finalización de la etapa de hibridación. Dicho valor se puede determinar después de cada ciclo de la amplificación cíclica. El valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de ácido nucleico diana se puede determinar también cada vez después de determinar el valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de compuesto indicador capturado en el segundo miembro de unión.
- 10 La determinación del valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de compuesto indicador capturado en el segundo miembro de unión puede comprender la monitorización dependiente del tiempo del valor indicativo (es decir, la realización repetida de la etapa de determinación/detección y la determinación de la evolución del valor indicativo a lo largo del tiempo).
- 15 El valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de ácido nucleico diana se puede determinar en base a una curva de calibración que correlaciona el valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de compuesto indicador con el valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de ácido nucleico diana.
- 20 El procedimiento se puede realizar en un dispositivo como se describe anteriormente que comprende una estructura adaptada para alojar líquidos, en el que la estructura comprende al menos un miembro de unión y está en comunicación fluida con una red microfluídica; y una unidad de control adaptada para controlar un flujo de fluidos a través de la red microfluídica de tal manera que moléculas diana se capturen en el al menos un miembro de unión, adaptado para controlar una amplificación de las moléculas diana en la estructura, y adaptado para controlar la detección de compuestos capturados en al menos un miembro de unión. Por ejemplo, el procedimiento se puede realizar en un dispositivo, que comprende un sustrato rígido; un elemento de cubierta flexible que cubre al menos parcialmente el sustrato; una primera estructura formada en el sustrato, adaptada para alojar líquidos y adaptada para liberar contenido de una o más células, esporas o virus, incluyendo los contenidos moléculas diana; una segunda estructura formada en el sustrato, adaptada para alojar líquidos y que comprende al menos un miembro de unión adaptado para capturar las moléculas diana y para determinar un valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de las moléculas diana; una red microfluídica que interconecta al menos la primera estructura y la segunda estructura; y una unidad de accionador adaptada para efectuar un flujo de fluidos entre la primera estructura y la segunda estructura presionando el elemento de cubierta flexible contra el sustrato para cerrar selectivamente una parte de la red microfluídica.
- 25
- 30
- 35 Por ejemplo, se puede usar un dispositivo 500 que comprende un primer pocillo 502. En dicho ejemplo, la etapa de formar complejos que comprenden cada uno un ácido nucleico diana y una molécula de captura se realiza en el primer pocillo.
- 40 El dispositivo 500 puede comprender un segundo pocillo 512. En dicho ejemplo, el primer miembro de unión y el segundo miembro de unión se proporcionan en el segundo pocillo y las etapas de poner en contacto los complejos con el primer miembro de unión para unir los complejos al primer miembro de unión; liberar al menos un subconjunto de la cantidad de ácido nucleico diana del primer miembro de unión; formar complejos de un subconjunto de la cantidad de un compuesto indicador con al menos un subconjunto de la cantidad de ácido nucleico diana; capturar un subconjunto restante de la cantidad de compuesto indicador que no está en complejo con un ácido nucleico diana en el segundo miembro de unión; y determinar un valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de compuesto indicador capturado en el segundo miembro de unión se realizan en el segundo pocillo.
- 45
- 50 La determinación de un valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de los compuestos indicadores capturados se puede realizar con el accionador accionado para deformar el elemento de cubierta. El elemento de cubierta se puede deformar de tal manera que se reduzca el volumen del pocillo central o la segunda estructura o el pocillo de detección. En dicho ejemplo, el volumen del pocillo central se puede incrementar nuevamente después de determinar un valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de los compuestos indicadores capturados.
- 55 El procedimiento puede comprender además añadir una cantidad de un compuesto extintor que pueda formar complejos con el compuesto indicador que no está en complejo con moléculas diana o moléculas de captura específicas de indicador. El compuesto extintor puede comprender uno o más restos que interfieran en la generación de una señal detectable por un marcador (por ejemplo, un grupo extintor que "secuestra" las emisiones que fueron resultado de la excitación de un fluoróforo). Por ejemplo, es posible que los grupos extintores puedan suprimir o inhibir señales emitidas por un marcador detectable del compuesto indicador, por ejemplo, una señal de fluorescencia. En dicho ejemplo, es posible que el compuesto extintor pueda formar complejos con el compuesto indicador que no está en complejo con moléculas diana o moléculas de captura específicas de indicador de modo que el uno o más grupos extintores estén en estrecha proximidad al marcador detectable del compuesto indicador dentro del complejo.
- 60
- 65 El compuesto extintor puede ser un oligonucleótido. En este ejemplo, el oligonucleótido extintor puede comprender al menos una región de secuencia específica que es complementaria de una región de secuencia de un

oligonucleótido indicador, permitiendo, por tanto, el emparejamiento de bases entre el compuesto extintor y el compuesto indicador.

El grupo extintor puede incluir los extintores habituales, tales como, por ejemplo, los extintores Black Hole (Biosearch Technologies), los extintores Qxl (AnaSpec) y los extintores Iowa Black.

Los compuestos extintores se pueden proporcionar en la segunda estructura de un dispositivo como se describe anteriormente. En dicho ejemplo, el compuesto extintor puede formar un complejo con un compuesto indicador no capturado en el segundo miembro de unión.

La segunda estructura de un dispositivo como se describe anteriormente se puede sellar de manera irreversible antes de iniciar la amplificación de los ácidos nucleicos diana. El sellado irreversible de la segunda estructura se puede lograr sellando (por ejemplo, soldando) una entrada y, opcionalmente, una salida de la segunda estructura, por ejemplo, mediante el sellado térmico de canales y/o válvulas conectadas con la segunda estructura.

De acuerdo con otra divulgación ejemplar, el procedimiento comprende:

- formar una composición de materia que comprende:

una cantidad de un compuesto indicador,

un miembro de unión que se puede unir al compuesto indicador, y

una cantidad de un ácido nucleico diana que se puede unir al compuesto indicador, inhibiendo la unión del ácido nucleico diana al compuesto indicador la unión del compuesto indicador al miembro de unión;

- unir un subconjunto de la cantidad de compuesto indicador con al menos un subconjunto de la cantidad de ácido nucleico diana;
- unir un subconjunto restante de la cantidad de compuesto indicador que no esté en complejo con un ácido nucleico diana en el miembro de unión; y
- determinar un valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de compuesto indicador unido al miembro de unión.

El término "ácido nucleico diana", como se usa en el presente documento, indica cualquier molécula de ácido nucleico que se puede detectar usando el procedimiento (es decir, ácidos nucleicos diana que pueden formar complejos con un compuesto indicador; véase a continuación). Los ejemplos de dichas moléculas de ácido nucleico incluyen ácidos nucleicos naturales tales como ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN), así como ácidos nucleicos diseñados artificialmente, por ejemplo, análogos de ácidos nucleicos tales como, entre otros, ácidos peptidonucleicos (PNA) o ácidos nucleicos bloqueados (LNA), que se sintetizan químicamente o se generan por medio de tecnología génica recombinante (véase, por ejemplo, Sambrook, J. *et al.* (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2.<sup>a</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). Ejemplos específicos de ácidos nucleicos naturales incluyen secuencias de ADN tales como ADN genómico o moléculas de ADNc, así como secuencias de ARN tales como moléculas de ARN<sub>nh</sub>, ARN<sub>m</sub> o ARN<sub>r</sub> o las secuencias de ácidos nucleicos de complemento inversas de los mismos. Dichos ácidos nucleicos pueden ser de cualquier longitud y pueden ser moléculas monocatenarias o bicatenarias. Típicamente, los ácidos nucleicos diana tienen una longitud de 10 a 10 000 nucleótidos, por ejemplo, 20 a 2000 nucleótidos, 30 a 1000 nucleótidos o 50 a 500 nucleótidos. Como se usa en el presente documento, debe entenderse que el término "nucleótido" se refiere tanto a ribonucleótidos como a desoxirribonucleótidos (es decir, moléculas de ARN y ADN).

Típicamente, los ácidos nucleicos diana no se proporcionan en forma aislada para el procedimiento sino en forma de una muestra que se supone que comprende una o más especies de ácidos nucleicos diana. El término "una o más especies", como se usa en el presente documento, se refiere a uno o más tipos diferentes de ácidos nucleicos, tales como moléculas que tienen diferentes secuencias de nucleótidos y/o moléculas que descienden de diferentes orígenes (por ejemplo, ácidos nucleicos derivados de diferentes patógenos que infectan a una célula huésped).

El término "muestra", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier líquido, que se va a analizar usando el procedimiento, y que se supone que comprende una o más especies de ácidos nucleicos diana que se van a detectar. Por tanto, el término muestra comprende preparaciones de ácido nucleico purificadas disueltas en agua o un tampón adecuado (por ejemplo, Tris/EDTA), así como diversas muestras biológicas. Los ejemplos de muestras líquidas que se pueden analizar usando el procedimiento incluyen, entre otras, soluciones químicas orgánicas e inorgánicas, agua potable, aguas residuales, fluidos corporales humanos y no humanos tales como

sangre completa, plasma, suero, orina, esputo, saliva o líquido cefalorraquídeo, extractos celulares de animales, plantas o cultivos de tejidos, suspensiones de células procariotas y eucariotas, preparaciones de fagos y similares.

5 La muestra puede comprender además uno o más agentes adicionales tales como diluyentes, disolventes o  
tampones que se pueden derivar de una purificación y/o procesamiento opcional de la muestra antes de someterla al  
procedimiento según la invención. Sin embargo, en algunos modos de realización, la muestra analizada es tal como  
una muestra de sangre completa no tratada. El término "no tratado", como se usa en el presente documento, debe  
entenderse de forma que, después de recoger la muestra (por ejemplo, mediante extracción de sangre de un  
paciente) y antes de someterla al procedimiento según la invención, no se produce más procesamiento de la  
10 muestra (por ejemplo, procedimientos de fraccionamiento, secado/reconstitución y similares).

A continuación se describe un procedimiento típico de detección de ácidos nucleicos que implica dichas muestras no  
tratadas.

15 El término "molécula indicadora" o "compuesto indicador", como se usa en el presente documento, indica cualquier  
molécula que pueda formar complejos con uno o más ácidos nucleicos diana y que se pueda capturar en un  
miembro de unión, en el que la formación de complejos con los ácidos nucleicos diana inhibe la captura del  
compuesto indicador en el miembro de unión. De este modo, el término "que puede formar complejos", como se usa  
en el presente documento, se refiere a cualquier interacción entre una molécula indicadora y un ácido nucleico  
20 diana. En otras palabras, el término indica la unión de las moléculas entre sí que se puede lograr por medio de una  
región de unión común o diferente comprendida en la molécula indicadora que media la interacción con la diana (tal  
como por medio del emparejamiento de bases de Watson-Crick entre secuencias de nucleótidos complementarias).  
Típicamente, la interacción es reversible. De forma análoga, el término "ser capturado en un miembro de unión"  
también indica cualquier interacción directa o indirecta (por ejemplo, por medio de moléculas de captura; véase a  
25 continuación) de una molécula indicadora con un miembro de unión dado. Esta interacción es también reversible, en  
general.

En general, las moléculas indicadoras pueden ser moléculas de ácido nucleico (es decir, moléculas de ARN o ADN  
como se describe anteriormente) que tienen una longitud de 10 a 100 nucleótidos, por ejemplo 15 a 50 nucleótidos,  
30 15 a 40 nucleótidos o 20 a 30 nucleótidos. Normalmente, las moléculas indicadoras son moléculas de ácido nucleico  
monocatenario (es decir, oligonucleótidos). El compuesto indicador está configurado de modo que la unión de dicha  
molécula indicadora a un ácido nucleico diana que se va a detectar inhibe la captura de la molécula indicadora en el  
miembro de unión. Las moléculas indicadoras de ácido nucleico pueden comprender al menos una región de unión  
específica (también denominada en el presente documento "sitio de interacción") que puede no solo interactuar con  
35 el ácido nucleico diana (por ejemplo, mediante la unión a una región de secuencia al menos parcialmente  
complementaria del ácido nucleico diana, permitiendo, por tanto, por ejemplo, detectar el emparejamiento de bases  
de Watson-Crick entre la molécula indicadora y el ácido nucleico diana), sino también ser capturada en un miembro  
de unión. Típicamente, la región de unión específica comprendida en la molécula indicadora tiene una longitud de al  
menos 12 nucleótidos, por ejemplo, al menos 15 nucleótidos, al menos 18 nucleótidos o al menos 22 nucleótidos. La  
40 secuencia de nucleótidos de la parte de unión de las moléculas indicadoras puede ser complementaria de la  
secuencia de nucleótidos correspondiente del ácido nucleico diana.

Se pueden emplear una o más especies de moléculas indicadoras. El término "una o más especies" indica uno o  
45 más tipos diferentes de moléculas indicadoras, tales como una o más moléculas de ácido nucleico que tienen  
diferentes secuencias de nucleótidos.

El término "miembro de unión" o "miembro de soporte", como se usa en el presente documento, se refiere a  
cualquier matriz sólida, en la que las moléculas indicadoras se pueden capturar directamente (por ejemplo, por  
medio de un grupo de anclaje comprendido en la molécula indicadora) o de manera indirecta por medio de una o  
50 más especies de moléculas de captura que pueden capturar una molécula indicadora al miembro de unión mediante  
interacciones covalentes o no covalentes. Los ejemplos de miembros de unión que se pueden usar incluyen, entre  
otros, los sustratos de elementos de matriz (por ejemplo, portaobjetos de microscopio, obleas o materiales  
cerámicos) o partículas sintéticas tales como microesferas magnéticas (por ejemplo, microesferas de poliestirilo  
paramagnéticas, también conocidas como Dynabeads®) y microesferas de látex.

55 El término "molécula de captura" indica cualquier molécula que está comprendida en (por ejemplo, que está unida o  
inmovilizada en) el miembro de unión que muestra un comportamiento de unión específico y/o una reactividad  
característica, lo que la hace adecuada para la formación de complejos con una molécula indicadora (es decir, la  
unión a la molécula indicadora). Las moléculas de captura también se pueden indicar como moléculas de captura  
específicas de indicador. Los ácidos nucleicos se usan típicamente como moléculas de captura. Los ejemplos de  
60 ácidos nucleicos que se pueden usar como moléculas de captura se han descrito anteriormente en relación con las  
moléculas diana e indicadoras, respectivamente. Dichos ácidos nucleicos pueden ser de cualquier longitud y pueden  
ser moléculas monocatenarias o bicatenarias.

65 Típicamente, las moléculas de captura de ácido nucleico son oligonucleótidos monocatenarios que tienen una  
longitud de 10 a 200 nucleótidos, por ejemplo de 15 a 100 nucleótidos o 20 a 70 nucleótidos.

Las moléculas de captura pueden comprender al menos una región de secuencia específica (es decir, la región de unión), que se configura para unirse a una molécula indicadora, por ejemplo, para interactuar con una región de secuencia complementaria de una molécula indicadora por medio del emparejamiento de bases entre las moléculas de captura y el ácido nucleico que se va a detectar. Típicamente, la región de unión específica tiene una longitud de al menos 15 nucleótidos, por ejemplo, al menos 20 nucleótidos, al menos 40 nucleótidos o al menos 50 nucleótidos. La secuencia de nucleótidos de la región de unión de las moléculas de captura puede ser complementaria de la secuencia de nucleótidos correspondiente de la molécula indicadora.

Al menos una parte de un sitio de interacción del compuesto indicador que puede de formar un complejo con un ácido nucleico diana también es posible que pueda formar un complejo con una molécula de captura. En otras palabras, las moléculas de captura y los ácidos nucleicos diana compiten para formar un complejo con el compuesto indicador, es decir, las regiones de unión respectivas comprendidas en las moléculas de captura y los ácidos nucleicos diana reconocen la(s) misma(s) o al menos similar(es) secuencia(s) correspondiente(s) de una molécula indicadora. El término "secuencias similares", como se usa en el presente documento, indica secuencias que difieren solo en uno o más emparejamientos erróneos de nucleótidos individuales (es decir, pares de nucleótidos no complementarios) o en una o más adiciones, inserciones o deleciones de nucleótidos individuales (es decir, residuos adicionales o carentes de nucleótidos). Por tanto, las regiones de unión respectivas comprendidas en las moléculas de captura y los ácidos nucleicos diana son al menos parcialmente idénticas. El término "parcialmente idéntico", como se usa en el presente documento, indica secuencias que difieren solo en uno o más nucleótidos individuales, como se describe anteriormente, o secuencias que tienen sitios de unión superpuestos, es decir, secuencias que comparten una secuencia de nucleótidos común pero difieren en al menos otra parte de la región de la secuencia. Sin embargo, también es posible que las respectivas regiones de unión comprendidas en las moléculas de captura y los ácidos nucleicos diana reconozcan diferentes secuencias no superpuestas (por ejemplo, adyacentes) de una molécula indicadora, pero que la unión de la molécula de captura o el ácido nucleico diana a la molécula indicadora interfiera estéricamente en la unión de la otra.

El equilibrio químico entre las etapas de formación de complejos de compuesto indicador y ácido nucleico diana por una parte y la captura de compuesto indicador en el segundo miembro de unión (por ejemplo, formando complejos con una molécula de captura específica de indicador) por otra parte se puede ver influido variando el grado de similitud y/o identidad parcial de las secuencias de la molécula de captura específica de indicador (con respecto a las secuencias del compuesto indicador) y el compuesto indicador (con respecto al ácido nucleico diana, respectivamente, como se describe anteriormente).

Por ejemplo, las secuencias de moléculas de captura específicas de indicador se pueden seleccionar de modo que la región de unión con respecto a la secuencia del compuesto indicador sea más corta o más larga que la de la región de unión de la secuencia del compuesto indicador con respecto a la secuencia de ácido nucleico diana. De esta manera, la afinidad de unión del compuesto indicador con respecto al ácido nucleico diana en comparación con la del compuesto indicador con respecto a la molécula de captura específica de indicador se puede incrementar o disminuir.

Se pueden emplear una o más especies de moléculas de captura. El término "una o más especies" indica uno o más tipos diferentes de moléculas de captura, tales como una o más moléculas de ácido nucleico que tienen diferentes secuencias de nucleótidos. Más de una especie de molécula de captura utilizada concomitantemente también se conoce como "colección". Dichas colecciones comprenden al menos dos, pero también pueden comprender muchas más moléculas diferentes, por ejemplo, al menos 5 especies diferentes, al menos 10 especies diferentes, al menos 30 especies diferentes, etc. Las colecciones también pueden estar dispuestas en diferentes localizaciones con respecto al miembro de unión. Por ejemplo, pueden estar presentes en forma de matrices o cualquier otra disposición espacial.

El término "matriz" (también denominado "micromatriz"), como se usa en el presente documento, se refiere a una disposición espacial (ordenación) definida de moléculas de captura en un miembro de unión (también denominado "sustrato"), en la que la posición de cada molécula dentro de la matriz se determina por separado. Típicamente, la micromatriz comprende sitios definidos o regiones predeterminadas, es decir, los denominados "elementos de matriz" o "manchas", que se pueden disponer en un patrón particular, en el que cada elemento de matriz típicamente comprende solo una especie de moléculas de captura. La disposición de las moléculas de captura en el soporte se puede generar por medio de interacciones covalentes o no covalentes. Sin embargo, las moléculas de captura también se pueden inmovilizar directamente dentro de la cámara de reacción de un dispositivo usado para realizar el procedimiento (véase a continuación).

En una primera etapa, el procedimiento puede comprender formar una composición de materia que incluya una cantidad de un compuesto indicador, un miembro de unión y una cantidad de un nucleótido diana. El término "formar una composición", como se usa en el presente documento, indica cualquier combinación o mezcla de los componentes descritos anteriormente. Esto se puede lograr introduciendo los componentes de forma simultánea, consecutiva o por separado en una o más cámaras de reacción de un dispositivo analítico adecuado para realizar el

procedimiento. De forma alternativa, también es posible mezclar los componentes individuales antes de introducir la mezcla en el dispositivo.

Como ya se ha descrito anteriormente, el procedimiento también se puede realizar con más de un compuesto indicador y más de un nucleótido diana. Por tanto, la etapa de formar una composición de materia puede comprender formar una composición de materia que comprende:

- una cantidad de un primer compuesto indicador,
- una cantidad de un primer ácido nucleico diana que pueda formar complejos con el primer compuesto indicador, inhibiendo la formación de complejos con el primer compuesto indicador la captura del primer compuesto indicador por el miembro de unión,
- una cantidad de un segundo compuesto indicador, y
- una cantidad de un segundo ácido nucleico diana que puede formar complejos con el segundo compuesto indicador, inhibiendo la formación de complejos con el segundo compuesto indicador la captura del segundo compuesto indicador por el miembro de unión.

El término "dispositivo", como se usa en el presente documento, indica cualquier instrumentación adecuada para analizar muestras por medio del procedimiento. Los dispositivos típicos para su uso en el procedimiento se describen en el presente documento. Las divulgaciones ejemplares de dicho dispositivo se ilustran en las figuras 17 a 19. Otros dispositivos adecuados para realizar el procedimiento se describen en la solicitud de patente europea EP 06 122 695 y la solicitud de patente internacional WO 2007/051861.

Típicamente, los dispositivos pueden comprender al menos una estructura para alojar muestras líquidas (en el presente documento también se denomina "cámara de reacción" o "espacio de reacción"). El término "cámara de reacción", como se usa en el presente documento, indica el espacio formado dentro del dispositivo entre una superficie de base y una superficie superior (también conocida como primera y segunda superficies), en el que se realiza al menos una etapa del análisis real, por ejemplo, la detección de los ácidos nucleicos diana. Las superficies de base y superior se pueden situar opuestas o sustancialmente opuestas entre sí. Por ejemplo, pueden estar dispuestas en paralelo o sustancialmente paralelas entre sí.

La cámara de reacción puede comprender dos o más subcámaras. Esto se puede lograr proporcionando a la primera superficie y/o a la segunda superficie una o más particiones o cavidades, que sirven como paredes laterales entre las dos o más subcámaras.

Un dispositivo usado en el procedimiento puede comprender más de una cámara de reacción para realizar múltiples ensayos de una muestra en paralelo o para realizar diferentes etapas de un ensayo de manera sucesiva en diferentes cámaras de reacción. Para este fin, las cámaras de reacción pueden estar en comunicación fluida entre sí. El término "en comunicación fluida entre sí", como se usa en el presente documento, indica cualquier interconexión entre las cámaras de reacción individuales, ya sea directa o indirectamente por medio de un medio adicional tal como un paso de introducción de muestras común, unidad de llenado, unidad de procesamiento o similar. Sin embargo, como se usa en el presente documento, el término no significa necesariamente que, después de introducir una muestra, las cámaras de reacción estén en comunicación fluida permanente entre sí. También es posible que las cámaras de reacción estén en comunicación fluida transitoria, por ejemplo lograda por válvulas unidireccionales o bidireccionales en las conexiones entre las cámaras de reacción.

Las moléculas indicadoras y/o las moléculas de captura se pueden proporcionar (por ejemplo, en forma liofilizada o secada) en una o más de las al menos una cámara de reacción (o en una o más subcámaras) del dispositivo, en el que se realiza el ensayo de detección, antes de la introducción de la muestra (que comprende los ácidos nucleicos diana) que se va a analizar. Las moléculas indicadoras y/o las moléculas de captura se pueden proporcionar en las mismas cámaras de reacción (o subcámaras) o en diferentes. De forma alternativa, las moléculas indicadoras y/o las moléculas de captura se pueden introducir en el dispositivo junto con la muestra (es decir, concomitantemente) o después de que la muestra ya se haya introducido.

De forma análoga, el miembro de unión se puede proporcionar en una o más de la al menos una cámara de reacción (o en una o más subcámaras) del dispositivo, en el que se realiza el ensayo de detección, antes de la introducción de la muestra (que comprende los ácidos nucleicos diana) que se va a analizar. El miembro de unión se puede proporcionar en las mismas cámaras de reacción (o subcámaras) que las moléculas indicadoras y/o las moléculas de captura o en diferentes. Por ejemplo, puede ser posible realizar la etapa de formar complejos de moléculas indicadoras con los ácidos nucleicos diana separada espacialmente de la etapa de capturar las moléculas indicadoras al miembro de unión, es decir, en diferentes cámaras de reacción (o subcámara) del dispositivo. En dichos ejemplos, los componentes individuales normalmente no se proporcionan en las mismas cámaras de reacción. En lugar de proporcionar el miembro de unión en el dispositivo antes de añadir la muestra, se puede

introducir en el dispositivo junto con la muestra (es decir, concomitantemente) o después de que la muestra ya se haya introducido.

5 El dispositivo usado en el procedimiento puede ser un dispositivo seleccionado del grupo que consiste en un dispositivo de ensayo de biosensor, un cartucho microfluídico y un laboratorio en un chip.

10 Después de formar la composición de materia, el procedimiento puede comprender la etapa de formar complejos de un subconjunto de la cantidad de compuesto indicador con al menos un subconjunto de la cantidad de ácido nucleico diana. En otras palabras, se puede permitir que las moléculas indicadoras se unan a los ácidos nucleicos diana, por ejemplo formando moléculas de ácido nucleico bicatenarias por medio del emparejamiento de bases de secuencias de nucleótidos complementarias del compuesto indicador y el ácido nucleico diana, respectivamente. El hecho de que un subconjunto de la cantidad de compuesto indicador forme complejos con al menos un subconjunto de la cantidad de ácido nucleico diana presente indica que la concentración total de moléculas indicadoras presentes al comienzo del ensayo puede exceder la concentración total de ácidos nucleicos diana presentes.

15 Posteriormente, la cantidad restante de compuesto indicador que no está en complejo con un ácido nucleico diana se puede capturar (es decir, unir) en el miembro de unión por medio de las una o más regiones de unión comprendidas en la molécula indicadora descrita anteriormente (ya sea directamente o mediante unión a moléculas de captura que están unidas al miembro de unión). Dado que la formación de complejos de los ácidos nucleicos diana con las moléculas indicadoras inhibe la captura de la molécula indicadora en el miembro de unión, la formación de complejos de ácido nucleico diana/molécula indicadora disminuye la cantidad de moléculas indicadoras que se pueden capturar en el miembro de unión en comparación con la cantidad que está presente antes de realizar la etapa de formación de complejos de ácido nucleico diana/molécula indicadora.

20 La etapa de formar complejos de un subconjunto de la cantidad de compuesto indicador con al menos un subconjunto de la cantidad de ácido nucleico diana y la etapa de capturar un subconjunto restante de la cantidad de compuesto indicador que no está en complejo con un ácido nucleico diana en el miembro de unión se pueden realizar concomitantemente.

25 Finalmente, el procedimiento puede comprender determinar un valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de compuesto indicador capturado en el miembro de unión. El término "determinar un valor indicativo de la presencia y/o la cantidad del compuesto indicador capturado en el miembro de unión.", como se usa en el presente documento, se refiere a la detección/determinación de parámetros tales como conductividad eléctrica, potencial de oxidorreducción, absorción óptica, intensidad de fluorescencia o bioluminiscencia que permiten mediciones cualitativas y/o cuantitativas de las moléculas indicadoras capturadas (o recapturadas) en el miembro de unión. Se puede determinar solo uno de estos parámetros, pero también es posible determinar más de un parámetro (por ejemplo, la conductividad eléctrica y la intensidad de una señal de fluorescencia causada por un marcador adecuado), ya sea concomitante o consecutivamente.

30 El procedimiento puede comprender además determinar un valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de ácido nucleico diana basado en el valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de compuesto indicador capturado en el miembro de unión. Es decir, la presencia y/o la cantidad de uno o más ácidos nucleicos diana presentes en una muestra particular se puede calcular en base a la diferencia entre la presencia y/o la cantidad de compuesto indicador que está presente antes de la formación de los complejos de ácido nucleico diana/molécula indicadora y la cantidad de compuesto indicador que se captura en el miembro de unión después de dicha formación de complejos.

35 Para realizar la reacción de detección, el compuesto indicador puede comprender uno o más marcadores detectables como se describe anteriormente, por ejemplo, marcadores fluorescentes. Por ejemplo, el compuesto indicador puede comprender dos marcadores detectables. Los marcadores detectables se pueden incorporar o unir a las moléculas indicadoras, por ejemplo, en forma de ribonucleótidos, desoxinucleótidos o didesoxinucleótidos modificados y/o marcados.

40 Para detectar dichos marcadores, el dispositivo usado para realizar el procedimiento puede comprender además un sistema de detección como se describe anteriormente, adecuado para determinar valores indicativos de la presencia y/o la cantidad de compuesto indicador capturado en un miembro de unión, por ejemplo, un sistema de detección óptica. El sistema de detección puede estar conectado a la cámara de reacción. Típicamente, el sistema de detección se sitúa opuesto a una de la al menos una cámara de reacción, opcionalmente opuesto a una región de superficie particular donde tiene lugar la detección.

45 El procedimiento puede comprender además liberar el subconjunto restante de la cantidad de compuesto indicador del miembro de unión después de las etapas de formar complejos de un subconjunto de la cantidad de compuesto indicador con al menos un subconjunto de la cantidad de ácido nucleico diana; capturar un subconjunto restante de la cantidad de compuesto indicador que no está en complejo con un ácido nucleico diana en el miembro de unión; y determinar el valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de compuesto indicador capturado en el miembro de unión. El término "liberar", como se usa en el presente documento, indica el desprendimiento o desunión de las moléculas indicadoras del miembro de unión. Esto puede lograrse, por ejemplo, enzimáticamente por medio de la

escisión de cualquier enlace covalente o, en casos donde las moléculas indicadoras de ácido nucleico están unidos al miembro de unión por moléculas de captura de ácido nucleico, por medio del emparejamiento de bases complementario, aumentando la temperatura en la cámara de reacción en la que se realiza el ensayo, dando como resultado, por tanto, la separación de la hebra de ácido nucleico (es decir, la desnaturalización).

5 Las etapas de liberación, formación de complejos, captura y determinación se pueden repetir N veces adicionales, donde N es un número entero mayor o igual que 1. En otras palabras, el procedimiento se realiza de manera cíclica. El número entero N puede ser  $\geq 5$ ,  $\geq 10$  o  $\geq 20$ .

10 Antes de la etapa de formación de complejos, el procedimiento puede comprender además capturar al menos un subconjunto de la cantidad de compuesto indicador en el miembro de unión; determinar un valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de compuesto indicador capturado en el miembro de unión; y liberar compuestos indicadores capturados del miembro de unión. Por tanto, realizar estos etapas adicionales permite la determinación de la cantidad de compuesto indicador inicialmente presente antes de permitir la formación de complejos entre el  
15 compuesto receptor y el ácido nucleico diana. La comparación del valor obtenido con el determinado después de capturar el subconjunto del compuesto indicador que no está en complejo con un ácido nucleico diana en el miembro de unión proporciona una medida de la presencia y/o la cantidad de ácido nucleico diana presente en una muestra.

20 El procedimiento puede comprender además someter el ácido nucleico diana a amplificación, es decir, aumentar su cantidad presente en la muestra antes de someter los mismos al análisis adicional para facilitar una detección adicional. Típicamente, la amplificación del ácido nucleico diana se logra por medio de una amplificación cíclica. La amplificación cíclica puede comprender cualquier número de ciclos de amplificación que sea igual o mayor que dos. Normalmente, la reacción de amplificación cíclica comprende al menos 10 o al menos 20 ciclos.

25 Un ejemplo de amplificación cíclica es una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como se describe anteriormente. Típicamente, la PCR se usa para la amplificación de moléculas de ADN bicatenarias empleando una ADN polimerasa termoestable. La ADN polimerasa usada en la amplificación cíclica puede tener actividad exonucleasa, en particular actividad exonucleasa 5'→3'. Los ejemplos de dichas ADN polimerasas incluyen, entre otros, ADN polimerasa Taq o ADN polimerasa Tth (que están disponibles comercialmente de múltiples proveedores).  
30 Por medio de esta actividad exonucleasa 5'→3', la ADN polimerasa puede atacar nucleolíticamente los extremos 5' marcados de moléculas indicadoras que están unidas a los ácidos nucleicos diana, dando como resultado una degradación progresiva de dichas moléculas indicadoras. Como resultado, la cantidad de compuesto indicador que se captura en el miembro de unión disminuye adicionalmente durante cada ciclo de la reacción de amplificación. Opcionalmente, la ADN polimerasa empleada también puede presentar una actividad exonucleasa 3'→5' ("actividad de corrección") para retirar un nucleótido incorrecto que se ha añadido a la hebra de ADN naciente en una posición de secuencia particular. Los ejemplos de dichas ADN polimerasas que tienen ambas actividades exonucleasa incluyen, entre otros, la ADN polimerasa *Pwo* y la ADN polimerasa *Pfu* (ambas enzimas también están disponibles comercialmente de varios proveedores).

40 Si el ácido nucleico diana es una molécula de ARN, el procedimiento puede comprender además someter el ácido nucleico diana a una transcripción inversa como se describe anteriormente antes de someterlo a amplificación.

45 La amplificación del ácido nucleico diana se puede iniciar antes de la etapa de formar complejos de un subconjunto de la cantidad de compuesto indicador con al menos un subconjunto de la cantidad de ácido nucleico diana. Es decir, el ácido nucleico diana se somete a amplificación al tiempo que se permite que los compuestos indicadores formen un complejo con un ácido nucleico diana, y los compuestos indicadores que no están en complejo con un ácido nucleico diana se recapturen en el miembro de unión

50 Para este propósito, es decir, la amplificación de ácidos nucleicos, el dispositivo usado puede comprender además una o más unidades de control de la temperatura y/o unidades reguladoras de la temperatura como se describe anteriormente para controlar y/o regular la temperatura dentro de la cámara de reacción.

55 La medición de la temperatura en la cámara de reacción se puede realizar como se describe anteriormente. Normalmente, la amplificación, tal como una PCR, comprende tres etapas básicas (desnaturalización, hibridación de los cebadores y extensión de los cebadores) que se realizan de forma iterativa de manera cíclica. Sin embargo, la amplificación puede comprender además una etapa de desnaturalización inicial antes del primer ciclo de amplificación "verdadero" y/o una etapa de extensión final después de completar el ciclo de amplificación final, respectivamente. La amplificación del ácido nucleico diana puede comprender (al menos) una etapa de desnaturalización de ácidos nucleicos bicatenarios y/o una etapa combinada de hibridación y extensión de las  
60 moléculas de cebadores en los ácidos nucleicos diana (es decir, una "PCR de dos etapas").

65 La etapa de desnaturalización implica el calentamiento de la muestra que se va a analizar a una temperatura de 94 °C-95 °C, típicamente durante 0,5 s a 5 min, lo que da como resultado, por tanto, la disociación de las hebras de los moldes de ácido nucleico bicatenario. Someter una muestra que se va a analizar a dicha etapa de desnaturalización puede dar como resultado además (es decir, permitir) la desnaturalización simultánea de los ácidos nucleicos bicatenarios en la muestra, incluyendo moléculas diana bicatenarias, moléculas indicadoras

bicatenarias, complejos de compuestos indicadores con ácidos nucleicos diana y complejos de compuestos indicadores con moléculas de captura (unidas al miembro de unión), dando como resultado esto último la liberación de los compuestos indicadores del miembro de unión.

5 La etapa de hibridación implica el enfriamiento de la muestra que se va a analizar a una temperatura de 40 °C-65 °C, típicamente durante 1 s a 5 min, para permitir la asociación (es decir, la hibridación/emparejamiento de bases) de las moléculas de cebador a las hebras del molde de ácido nucleico desnaturalizado. La temperatura de reacción empleada depende de las propiedades químicas y/o físicas de las moléculas del cebador que se van a hibridar, tales como la composición de su secuencia de nucleótidos, su temperatura de fusión, su tendencia al plegado intramolecular (por ejemplo, la formación de estructuras bicatenarias en horquilla o giro) y similares. Someter una muestra que se va a analizar a dicha etapa de hibridación puede dar como resultado además (es decir, permitir) la reasociación de moléculas diana bicatenarias, la reasociación de moléculas indicadoras bicatenarias, la formación de complejos de compuestos indicadores con ácidos nucleicos dianas, y la formación de complejos de compuestos indicadores que no están en complejo con un ácido nucleico diana con moléculas de captura, dando como resultado esto último la captura o recaptura de los compuestos indicadores en el miembro de unión. Por tanto, la etapa de hibridación se puede realizar concomitantemente con la etapa de formar complejos de un subconjunto de la cantidad de compuesto indicador con al menos un subconjunto de la cantidad de ácido nucleico diana y/o la etapa de capturar un subconjunto restante de la cantidad de compuesto indicador que no está en complejo con un ácido nucleico diana en el miembro de unión.

20 Finalmente, la etapa de extensión implica la extensión de las moléculas de cebador hibridadas para producir copias de longitud completa de las hebras del molde de ADN mediante una ADN polimerasa. La longitud del fragmento de ADN amplificado está determinada por los extremos 5' del par de cebadores empleados. Típicamente, la etapa de elongación se realiza a una temperatura de 70 °C-72 °C durante 1 s a 10 min. Someter una muestra que se va a analizar a dicha etapa de extensión puede dar como resultado además la replicación de los ácidos nucleicos diana que se van a analizar al permitir que los complejos de un subconjunto de la cantidad de compuesto indicador con al menos un subconjunto de la cantidad de ácido nucleico diana que se ha formado durante la etapa de hibridación se extiendan y generen fragmentos de ácido nucleico amplificado bicatenario que tienen incorporado un compuesto indicador opcionalmente marcado que posteriormente se puede detectar.

30 La detección/determinación de un valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de los ácidos nucleicos diana se puede realizar solo una o más de una vez durante el ensayo realizado. En caso de que se realice más de una etapa de detección durante un solo ensayo, se calcula el valor medio de los resultados obtenidos. Los datos obtenidos en uno o más ciclos de detección se pueden analizar y procesar matemáticamente usando el programa informático apropiado conocido por los expertos en la técnica para determinar, entre otros, la presencia, la longitud o la secuencia de uno o más ácidos nucleicos diana y/o para calcular su cantidad.

35 En particular, si el compuesto indicador está en exceso del ácido nucleico diana, el valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de compuesto indicador capturado en el miembro de unión se determina antes de que la formación de complejos de un subconjunto de la cantidad de compuesto indicador con al menos un subconjunto de la cantidad de ácido nucleico diana y la captura de un subconjunto restante de la cantidad de compuesto indicador que no está en complejo con un ácido nucleico diana en el miembro de unión puedan estar en equilibrio químico. Por ejemplo, la etapa de determinación/detección se realiza durante la etapa de hibridación de una reacción de amplificación. Sin embargo, también es posible realizar la reacción de determinación/detección después de completar la etapa de hibridación (es decir, durante o después de completar la etapa de elongación).

50 El valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de compuesto indicador capturado en el miembro de unión se puede determinar de 1 s a 120 s (por ejemplo, 1, 5, 10, 15, 20, 30, 60 o 120 s) después de iniciar las etapas de formar complejos de un subconjunto de la cantidad de compuesto indicador con al menos un subconjunto de la cantidad de ácido nucleico diana, y de capturar un subconjunto restante de la cantidad de compuesto indicador que no está en complejo con un ácido nucleico diana en el miembro de unión.

55 El valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de compuesto indicador capturado en el miembro de unión se puede determinar después de al menos un ciclo de la amplificación cíclica que comprende etapas de desnaturalización, hibridación y elongación, por ejemplo, durante o después de la finalización de la etapa de hibridación. Dicho valor se puede determinar después de cada ciclo de la amplificación cíclica. El valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de ácido nucleico diana se puede determinar también cada vez después de determinar el valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de compuesto indicador capturado en el miembro de unión.

60 La determinación del valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de compuesto indicador capturado en el miembro de unión puede comprender la monitorización dependiente del tiempo del valor indicativo (es decir, la realización repetida de la etapa de determinación/detección y la determinación de la evolución del valor indicativo a lo largo del tiempo).

El valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de ácido nucleico diana se puede determinar en base a una curva de calibración que correlaciona el valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de compuesto indicador con el valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de ácido nucleico diana.

5 El procedimiento puede comprender además añadir una cantidad de un compuesto extintor que pueda formar complejos con el compuesto indicador que no está en complejo con moléculas diana o moléculas de captura específicas de indicador. El compuesto extintor puede comprender uno o más restos que interfieran en la generación de una señal detectable por un marcador (por ejemplo, un grupo extintor que "secuestra" las emisiones que fueron resultado de la excitación de un fluoróforo). Por ejemplo, es posible que los grupos extintores puedan suprimir o  
10 inhibir señales emitidas por un marcador detectable del compuesto indicador, por ejemplo, una señal de fluorescencia. En dicho ejemplo, es posible que el compuesto extintor pueda formar complejos con el compuesto indicador que no está en complejo con moléculas diana o moléculas de captura específicas de indicador de modo que el uno o más grupos extintores estén en estrecha proximidad al marcador detectable del compuesto indicador dentro del complejo.

15 El compuesto extintor puede ser un oligonucleótido. En este ejemplo, el oligonucleótido extintor puede comprender al menos una región de secuencia específica que es complementaria de una región de secuencia de un oligonucleótido indicador, permitiendo, por tanto, el emparejamiento de bases entre el compuesto extintor y el compuesto indicador.

20 El grupo extintor puede incluir los grupos de extintores habituales, tales como, por ejemplo, los extintores Black Hole (Biosearch Technologies), los extintores Qxl (AnaSpec) y los extintores Iowa Black.

25 Los compuestos extintores se pueden proporcionar en la segunda estructura de un dispositivo como se describe anteriormente. En dicho ejemplo, el compuesto extintor puede formar un complejo con un compuesto indicador no capturado en el segundo miembro de unión.

30 La segunda estructura de un dispositivo como se describe anteriormente se puede sellar de manera irreversible antes de iniciar la amplificación de los ácidos nucleicos diana. El sellado irreversible de la segunda estructura se puede lograr sellando (por ejemplo, soldando) una entrada y, opcionalmente, una salida de la segunda estructura, por ejemplo, mediante el sellado térmico de canales y/o válvulas conectadas con la segunda estructura.

35 De acuerdo con un modo de realización ejemplar, se proporciona un procedimiento, comprendiendo el procedimiento:

- proporcionar una muestra de sangre completa no tratada;
- introducir una muestra de sangre completa fluida en un dispositivo adaptado para alojar una muestra en un estado fluido que comprende una cámara de reacción en la que la cámara de reacción comprende una primera y una segunda superficie y comprende además una micromatriz dispuesta sobre la primera superficie o la segunda superficie;
- determinar un valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de ácidos nucleicos asociados con infecciones víricas en la muestra de sangre completa realizando un análisis basado en micromatrices en el dispositivo.

45 En particular, el valor determinado es indicativo de la presencia y/o la cantidad de ácidos nucleicos totales asociados con una infección vírica.

50 De acuerdo con otra divulgación ejemplar, se proporciona un procedimiento, comprendiendo el procedimiento:

- proporcionar una muestra de fluido con un volumen de 1  $\mu$ l a 50  $\mu$ l; y
- determinar un valor indicativo de la presencia y/o cantidad de ácidos nucleicos asociados con infecciones víricas en la muestra en base a un análisis realizado en el dispositivo.

55 Opcionalmente, el procedimiento puede comprender además introducir la muestra de fluido en un dispositivo adaptado para alojar una muestra en un estado fluido; y determinar un valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de ácidos nucleicos asociados con infecciones víricas en la muestra de sangre completa basado en un análisis realizado en el dispositivo.

60 En particular, el valor determinado es indicativo de la presencia y/o la cantidad de ácidos nucleicos totales asociados con una infección vírica.

65 El término "muestra de fluido" o "muestra de líquido", como se usa en el presente documento, indica una muestra de sangre completa no tratada.

El volumen de la muestra de fluido que se va a analizar puede estar en el intervalo de 1 µl a 50 µl, típicamente en el intervalo de 1 µl a 45 µl o de 1 µl a 40 µl o de 1 µl a 30 µl o de 1 µl a 25 µl o 1 µl a 20 µl o 1 µl a 15 µl. En modos de realización particulares, el volumen de la muestra de fluido está en el intervalo de 1 µl a 10 µl. Sin embargo, en el caso de que se analicen muestras de sangre completa, los volúmenes de muestra que superan los 50 µl también están dentro del alcance de la invención.

El término "sangre completa", como se usa en el presente documento, se refiere a la sangre con todos sus constituyentes. En otras palabras, la sangre completa comprende tanto glóbulos sanguíneos, tales como eritrocitos, leucocitos y trombocitos, como plasma sanguíneo en el que están suspendidos los glóbulos sanguíneos.

El término "plasma sanguíneo" (o "plasma"), como se usa en el presente documento, indica el medio líquido de la sangre y es una solución sustancialmente acuosa que contiene agua, proteínas del plasma sanguíneo y cantidades mínimas de otros materiales tales como seroalbúmina, factores de coagulación de la sangre, inmunoglobulinas (anticuerpos), hormonas, dióxido de carbono, otras diversas proteínas y diversos electrólitos (principalmente sodio y cloruro).

El término "suero sanguíneo" (o "suero"), como se usa en el presente documento, se refiere al plasma del que se han retirado las proteínas de coagulación.

En otros modos de realización, la muestra de fluido introducida en el dispositivo es una muestra de sangre completa no tratada. El término "no tratado", como se usa en el presente documento, debe entenderse de forma que, después de recoger la muestra (por ejemplo, mediante extracción de sangre de un paciente) y antes de someterla al procedimiento de la invención, no se produce más procesamiento de la muestra (por ejemplo, procedimientos de fraccionamiento, secado de la sangre completa, por ejemplo, en papel de filtro, para el almacenamiento de la muestra, y reconstitución de muestras de sangre seca mediante redisolución en agua, y similares).

Sin embargo, el almacenamiento de las muestras en sí, por ejemplo, en un refrigerador o congelador, no se debe considerar una etapa de procesamiento como se define anteriormente. Por tanto, la muestra se puede introducir en el dispositivo inmediatamente después de la recogida o se puede introducir en el dispositivo después del almacenamiento de la muestra durante una o más horas a uno o más días o semanas.

Además, dado que las muestras de sangre completa comprenden factores de coagulación de la sangre, que provocarán la formación de coágulos sanguíneos tras el almacenamiento prolongado de las muestras y cuya presencia puede interferir, por tanto, en el análisis posterior, la adición de anticoagulantes (es decir, inhibidores de la coagulación de la sangre) tampoco es un tratamiento de la muestra dentro del significado de la presente invención. Son bien conocidos en la técnica múltiples compuestos que actúan como anticoagulantes. Los ejemplos de anticoagulantes incluyen, entre otros, antagonistas de la vitamina K naturales, sintéticos (es decir, obtenidos mediante síntesis química y/o tecnología de ADN recombinante), inhibidores directos de la trombina naturales o sintéticos, citrato, oxalato, heparina y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).

En otros modos de realización, la muestra de sangre completa fluida se introduce en el dispositivo directamente (es decir, en forma no tratada, como se define anteriormente) desde un paciente. En particular, la muestra de sangre completa fluida se puede obtener de una punción en la yema del dedo del paciente. Por ejemplo, después de realizar una punción la yema del dedo, la sangre que sale se puede recoger poniendo en contacto con la sangre con un capilar, de modo que la sangre se introduzca por la fuerza capilar sin manipulación externa. El capilar se puede situar a continuación con respecto al dispositivo de ensayo empleado de modo que la sangre pueda pasar o se pueda transferir activamente al dispositivo. De forma alternativa, la yema del dedo punzada se puede situar inmediatamente adyacente a una de las aberturas del dispositivo, que se detallan a continuación (por ejemplo, presionando la yema del dedo directamente sobre dicha abertura) de modo que la sangre que sale de la punción se pueda introducir en el dispositivo.

El término "ácidos nucleicos asociados con infecciones víricas", como se usa en este documento, indica cualquier molécula de ácido nucleico de origen vírico (es decir, cuya secuencia de nucleótidos es idéntica a o complementaria de una secuencia correspondiente dentro del genoma del virus) que está presente en una muestra de fluido que se va a analizar que ha sido infectada por una o más especies de virus. Los virus que infectan al huésped, de los cuales se obtiene la muestra de fluido, pueden ser cualquier virus de ADN (es decir, un virus que tiene un genoma de ADN) o un virus de ARN (es decir, un virus que tiene un genoma de ARN) (revisado, por ejemplo, en: Büchen-Osmond, C. (2003). *Taxonomy and Classification of Viruses*. En: *Manual of Clinical Microbiology*, 8.<sup>a</sup> ed., vol. 2, p. 1217-1226, ASM Press, Washington DC). Los ejemplos de virus de ADN incluyen, entre otros, las familias de *Papovaviridae* (por ejemplo, papilomavirus), *Adenoviridae* (por ejemplo, adenovirus) y *Herpesviridae* (por ejemplo, virus de Epstein-Barr, citomegalovirus). Los ejemplos de virus de ARN incluyen, entre otros, las familias de *Picornaviridae* (por ejemplo, poliovirus, rinovirus), *Flaviviridae* (por ejemplo, virus de la hepatitis C), *Filoviridae* (por ejemplo, virus de Marburg, virus del ébola) y *Retroviridae* (por ejemplo, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)). En algunos modos de realización, los ácidos nucleicos que se van a detectar están asociados con infecciones causadas por miembros de *Retroviridae*, en particular, están asociados con infecciones por el VIH. El término "VIH",

como se usa en el presente documento, se refiere tanto a las especies de VIH-1 como a las de VIH-2 y a cualquier subtipo derivado de las mismas.

5 Dado que muchos virus de ADN, así como los *Retroviridae* (en particular, la replicación de los *Retroviridae* requiere, en general, la transcripción inversa del genoma del virus de ARN en ADN), pueden integrar su información genética en el genoma de la célula huésped en forma de un provirus latente, el término "ácidos nucleicos asociados con infecciones víricas" no solo se refiere a los ácidos nucleicos que se originan de virus libres y asociados a células, sino también a las moléculas de ADN províricas que se integran en el genoma del huésped, moléculas de ADN vírico retrotranscritas (es decir, los "intermedios" de la replicación vírica), y transcritos derivados de ADN provírico (es decir, moléculas de ARN obtenidas por transcripción del genoma del ADN del huésped).

15 En modos de realización particulares, los procedimientos pretenden determinar la cantidad de ácidos nucleicos víricos totales en una muestra de fluido que se va a analizar. En otras palabras, el procedimiento puede tener como objetivo la detección de todas las especies diferentes (es decir, moléculas tanto de ARN como de ADN) y subconjuntos celulares (es decir, mezclas de ácidos nucleicos separados espacialmente) de ácidos nucleicos asociados con una infección vírica de un paciente. Típicamente, los ácidos nucleicos que se van a detectar están asociados con un solo tipo de infección vírica, como una infección por el VIH. Sin embargo, también puede ser posible que un paciente padezca una coinfección por diferentes tipos de virus. El procedimiento puede comprender además determinar la presencia y/o la cantidad (total) de los ácidos nucleicos asociados con los respectivos tipos diferentes de virus, ya sea concomitantemente en un solo análisis o en una pluralidad de análisis separados (que, sin embargo, se pueden realizar usando la misma muestra de fluido).

25 Por lo tanto, en caso de que un paciente haya sido infectado por el VIH, entonces los ácidos nucleicos asociados con la infección por el VIH que pueden estar presentes en una muestra de sangre completa obtenida de ese paciente comprenden moléculas de ARN que se originan a partir del VIH libre (es decir, partículas de virus que circulan libremente en el plasma), moléculas de ARN que se originan a partir de VIH asociado a células (es decir, partículas de virus unidas a cualquier tipo de glóbulos sanguíneos), moléculas de ADN del VIH províricas que se integran en el genoma del huésped, moléculas de ADN del VIH retrotranscritas y transcritos del VIH derivados de ADN provírico. Sin embargo, una muestra de plasma sanguíneo obtenida del mismo paciente solo comprende moléculas de ARN que se originan a partir del VIH libre, ya que todas las demás especies de ácido nucleico del VIH se asocian con los glóbulos sanguíneos del paciente que se han retirado.

35 El término "dispositivo", como se usa en el presente documento, indica cualquier instrumentación adecuada para someter a ensayo muestras por medio de los procedimientos descritos anteriormente, siempre que el dispositivo esté "adaptado para alojar las muestras en un estado fluido", lo que significa que el dispositivo está configurado de modo que el estado fluido (es decir, líquido) de la muestra se mantiene mientras la muestra está alojada en el dispositivo. Es decir, la muestra no se seca de ninguna manera en el dispositivo antes de que tenga lugar el análisis del ácido nucleico, tal como aplicando la muestra sobre papel de filtro y permitiendo que se evapore el exceso de líquido. En el presente documento, dicho dispositivo también se denomina "dispositivo microfluídico".

40 Los dispositivos típicos para su uso en el procedimiento se describen en el presente documento. Los modos de realización ejemplares de dicho dispositivo se ilustran en las figuras 17 a 19. Otros dispositivos adecuados para realizar el procedimiento se describen en la solicitud de patente europea EP 06 122 695 y la solicitud de patente internacional WO 2007/051861.

45 Los dispositivos utilizados para realizar los procedimientos comprenden al menos una estructura para alojar muestras líquidas (en el presente documento también se denomina "cámara de reacción" o "espacio de reacción"). El término "cámara de reacción", como se usa en el presente documento, indica el espacio formado dentro del dispositivo entre una superficie de base y una superficie superior (también conocida como primera y segunda superficies), en el que se realiza al menos una etapa del análisis real, por ejemplo, la detección de los ácidos nucleicos diana. Las superficies de base y superior se pueden situar opuestas o sustancialmente opuestas entre sí. Por ejemplo, pueden estar dispuestas en paralelo o sustancialmente paralelas entre sí.

55 En algunos modos de realización, al menos una parte de la al menos una cámara de reacción está hecha de un material transparente, es decir, un material permeable a la luz, para facilitar la detección de ácidos nucleicos. Los ejemplos de materiales transparentes adecuados incluyen, entre otros, vidrios o materiales similares a vidrio (por ejemplo, vidrio acrílico) así como polímeros sintéticos (por ejemplo, polimetilmetacrilato, acrílico o polietileno).

60 En otros modos de realización, al menos una parte de la al menos una cámara de reacción puede ser flexible o elásticamente deformable. Es decir, al menos una o más partes de la cámara de reacción están hechas de un material elásticamente deformable, por ejemplo una membrana elástica (por ejemplo, goma de silicona).

65 En algunos dispositivos usados, la al menos una cámara de reacción puede comprender dos o más subcámaras. Esto se puede lograr proporcionando a la primera superficie y/o a la segunda superficie una o más particiones o cavidades, que sirven como paredes laterales entre las dos o más subcámaras.

En algunos modos de realización, un dispositivo comprende más de una cámara de reacción para realizar múltiples ensayos de una muestra en paralelo o para realizar diferentes etapas de un ensayo de manera sucesiva en diferentes cámaras de reacción (véase también la figura 17). Para este fin, las cámaras de reacción pueden estar en comunicación fluida entre sí. El término "en comunicación fluida entre sí", como se usa en el presente documento, indica cualquier interconexión entre las cámaras de reacción individuales, ya sea directa o indirectamente por medio de un medio adicional tal como un paso de introducción de muestras común, unidad de llenado, unidad de procesamiento o similar (también denominada "red microfluídica"). Sin embargo, como se usa en el presente documento, el término no significa necesariamente que, después de introducir una muestra, las cámaras de reacción estén en comunicación fluida permanente entre sí. También es posible que las cámaras de reacción estén en comunicación fluida transitoria, por ejemplo lograda por válvulas unidireccionales o bidireccionales en las conexiones entre las cámaras de reacción.

En los dispositivos de ensayo usados en el procedimiento, la distancia entre la superficie de base y la superficie superior de al menos una de la al menos una cámara de reacción puede ser variable por medio de uno o más accionadores (también denominados desplazadores). Un accionador indica un medio para permitir el movimiento vertical de la superficie de base y/o la superficie superior, o al menos una o más de las partes de las mismas, una con respecto a la otra. Por tanto, la variación de la distancia entre dichas superficies puede no producirse necesariamente en toda el área de la superficie, sino que también puede estar restringida localmente a al menos una parte del área de la superficie de una o ambas de dichas superficies. Típicamente, la distancia entre la superficie de base y/o la superficie superior se reduce, por ejemplo, aplicando presión por medio del(de los) accionador(es) a al menos una parte de una o ambas de dichas superficies. Un accionador puede constituir una parte integral de la superficie de base o la superficie superior (por ejemplo, configurado como una protuberancia o hebilla) o puede representar una entidad independiente, es decir, autónoma (como un taqué o una plantilla) situada fuera de la cámara de reacción.

La variación de la distancia entre la superficie superior y la superficie de base por medio de uno o más accionadores puede dar como resultado el desplazamiento de al menos una parte de la muestra dentro de una cámara de reacción particular y/o en el movimiento (transporte) de al menos una parte de la muestra entre diferentes cámaras de reacción (o subcámaras) en las que pueden tener lugar diferentes etapas del procedimiento. Es decir, al hacer funcionar el(los) accionador(es), la muestra se mueve dentro o entre la al menos una cámara de reacción del dispositivo. Por tanto, la reducción y el reaumento repetitivos y alternantes de la distancia entre dichas superficies también darán como resultado un movimiento correspondiente hacia adelante y hacia atrás de la muestra dentro de la cámara de reacción (es decir, la mezcla de una muestra).

En lugar de variar la distancia entre la superficie de base y la superficie superior de una cámara de reacción por medio de uno o más accionadores, el transporte o el movimiento de una muestra de fluido en el dispositivo se puede lograr, entre otros, por medio de una bomba, en particular empleando una bomba de vacío o una bomba peristáltica.

Una cámara de reacción de un dispositivo usado en el presente documento puede comprender además una o más micromatrices (en el presente documento también denominadas "matrices" o "elementos de matriz") que se disponen sobre la superficie de base y/o la superficie superior de la al menos una cámara de reacción. Como se usa en el presente documento, una "micromatriz" indica una disposición espacial definida (ordenamiento) de moléculas de captura (por ejemplo, una o más especies de moléculas de sonda o una colección de sustancias; consúltese también a continuación) en un miembro de soporte (también denominado "sustrato" o "miembro de unión"), en el que la posición de cada molécula dentro de la micromatriz se determina por separado. Típicamente, la micromatriz comprende sitios definidos o regiones predeterminadas, es decir, los denominados elementos de matriz o manchas, que se pueden disponer en un patrón particular, en el que cada elemento de matriz típicamente comprende solo una especie de moléculas de captura. La disposición de las moléculas de captura en el soporte se puede generar por medio de interacciones covalentes o no covalentes. Los sustratos adecuados para micromatrices incluyen, entre otros, portaobjetos de microscopio, obleas o materiales cerámicos. Sin embargo, las moléculas de captura también se pueden inmovilizar directamente sobre la superficie de base y/o la superficie superior.

Una cámara de reacción de un dispositivo usado en el procedimiento puede comprender además una o más aberturas, que se pueden bloquear y/o sellar, y que se pueden usar para la introducción directa de una muestra que se va a analizar, así como cualquier reactivo adicional, gente de detección o similares que también se pueden requerir opcionalmente para realizar el procedimiento. De forma alternativa, dichas aberturas también se pueden usar para la fijación de los módulos adicionales (suplementarios) del dispositivo que no se hayan diseñado como partes integrales del dispositivo, tales como, entre otros, unidades de llenado, unidades de procesamiento, unidades de control de la temperatura, unidades de detección específicas y recipientes de residuos.

En modos de realización específicos, el dispositivo es un dispositivo seleccionado del grupo que consiste en un dispositivo de ensayo de biosensor, un cartucho microfluídico y un laboratorio en un chip.

En algunos modos de realización, el dispositivo está adaptado para detectar ácidos nucleicos en una muestra de fluido (es decir, líquida). En otras palabras, el dispositivo comprende además un sistema de detección como se describe anteriormente, por ejemplo, un sistema de detección óptico, que se puede conectar a la cámara de

reacción. Típicamente, el sistema de detección se sitúa opuesto a una de la al menos una cámara de reacción, opcionalmente opuesto a una región de superficie particular donde tiene lugar la detección. La selección de un sistema de detección adecuado depende de varios parámetros, tales como el tipo de marcadores utilizados para la detección o el tipo de análisis realizado. En algunos modos de realización, la realización del procedimiento puede implicar sistemas de detección simples, que se pueden basar en la medición de parámetros tales como fluorescencia, absorción óptica, transferencia de resonancia y similares.

Típicamente, los dispositivos y sistemas son autónomos. Es decir, no necesariamente requieren la retirada y/o reemplazo de la muestra y/o cualquier otro reactivo en la cámara de reacción mientras se realiza un ensayo. Por tanto, dichos dispositivos solo pueden comprender un puerto de entrada de muestra pero ningún puerto de salida.

La muestra de fluido que se va a analizar se puede introducir directamente en el dispositivo por medio de una o más aberturas de la al menos una cámara de reacción, que puede se puede bloquear y/o sellar. La muestra se puede transferir, opcionalmente junto con reactivos adicionales (tales como tampones u otros diluyentes, tintes, marcadores, reactivos de ensayo o enzimas para realizar el análisis de detección), a la cámara de reacción usando un medio adecuado de generación de presión, por ejemplo, una pipeta, una jeringa o una unidad automatizada, que puede ser, por ejemplo, una unidad funcional de un aparato de procesamiento. De forma alternativa, la muestra también se puede introducir en la cámara de reacción por fuerza capilar sin ninguna manipulación externa, por ejemplo, situando la muestra inmediatamente adyacente a una de las aberturas que están presentes en cualquiera de las superficies que definen la cámara de reacción.

El procedimiento se puede realizar sin necesidad de retirar y/o reemplazar la muestra y/o cualquier otro reactivo en la cámara de reacción mientras se realiza el procedimiento. Sin embargo, algunas aplicaciones pueden requerir la introducción de reactivos adicionales en la cámara de reacción, tal como uno o más agentes que comprenden cualquier marcador para permitir una detección adicional de los ácidos nucleicos de interés. Dichas soluciones adicionales también se pueden introducir directamente en la cámara de reacción, como se describe anteriormente, ya sea antes de introducir la muestra o concomitantemente con la muestra o después de que la muestra se haya introducido en la cámara de reacción. En algunos modos de realización, los reactivos adicionales se proporcionan dentro del dispositivo antes de añadir la muestra, en particular en forma liofilizada o seca, tal como polvos, gránulos o miniesferas.

De forma alternativa, la introducción de la muestra que se va a analizar, y opcionalmente de otros reactivos, también puede ser posible de manera indirecta por medio de una o más unidades de llenado que pueden ser parte integral del dispositivo o se pueden diseñar como una parte separada que se puede fijar a la cámara de reacción para rellenar la misma y separarla después de su uso. Cualquier recipiente que pueda contener una muestra líquida que se va a analizar y que se pueda conectar (reversiblemente) a la cámara de reacción se puede usar como unidad de llenado. Por ejemplo, la unidad de llenado puede ser un capilar adecuado para obtener una muestra de sangre.

El dispositivo puede comprender un recipiente de residuos separado desmontable o integrado, que sirve para recoger los medios sobrantes de la cámara de reacción. Opcionalmente, el contenedor de residuos comprende un medio de relleno gaseoso, líquido o sólido adicional tal como, entre otros, celulosa, materiales de filtro y geles de sílice, que se unen de forma reversible o irreversible a las sustancias sobrantes. Además, el recipiente de residuos puede comprender uno o más orificios de ventilación o se puede proporcionar con un vacío en su interior para mejorar la transferencia del material sobrante al recipiente de residuos.

Después de que la muestra, y opcionalmente cualquier reactivo adicional, se hayan introducido en la cámara de reacción o se hayan transferido de una o más unidades de llenado a la cámara de reacción, la muestra se puede incubar opcionalmente en la cámara de reacción durante un período de tiempo dado para permitir la difusión apropiada en todo el espacio de reacción. Típicamente, el período de incubación está en el intervalo de 1 s a 30 min, por ejemplo, en el intervalo de 10 s a 15 min, o en el intervalo de 30 s a 10 min.

En algunos modos de realización, el análisis realizado en el dispositivo comprende además liberar los ácidos nucleicos de la muestra de fluido que se va a analizar. Para este fin, la muestra se puede calentar para destruir las membranas celulares y/o las cápsides víricas (por ejemplo, empleando una unidad de control de la temperatura y/o una unidad de regulación de la temperatura como se describe a continuación). En algunos modos de realización, esta etapa de liberación comprende poner en contacto la muestra de fluido con un reactivo de lisis como se describe anteriormente.

En otros modos de realización, el análisis realizado en el dispositivo comprende además amplificar los ácidos nucleicos asociados con infecciones víricas, es decir, aumentar su cantidad presente en la muestra antes de someter los mismos al análisis adicional para facilitar una detección adicional. Típicamente, la amplificación de ácidos nucleicos se logra por medio de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como se describe anteriormente.

Entre otros para este propósito, es decir, la amplificación de ácidos nucleicos, el dispositivo usado puede comprender además una unidad de control de la temperatura y/o unidad reguladora de la temperatura como se describe anteriormente para controlar y/o regular la temperatura dentro de la cámara de reacción.

5 La medición de la temperatura en una cámara de reacción se puede realizar como se describe anteriormente.

En algunos modos de realización, el análisis realizado en el dispositivo comprende además la formación de complejos, comprendiendo cada complejo un ácido nucleico asociado con una infección vírica y una molécula de captura, en el que la molécula de captura comprende una parte de unión específica a una región del ácido nucleico asociada con una infección vírica y un grupo de anclaje.

El término "molécula de captura", como se usa en este modo de realización, indica cualquier molécula que muestre un comportamiento de unión específico y/o una reactividad característica, lo que la hace adecuada para la formación de complejos con un ácido nucleico que se va a detectar. Los ácidos nucleicos se usan típicamente como moléculas de captura. Los ejemplos de ácidos nucleicos que se pueden usar como moléculas de captura incluyen ácidos nucleicos naturales tales como el ácido desoxirribonucleico (ADN) o el ácido ribonucleico (ARN), así como análogos de ácidos nucleicos tales como, entre otros, ácidos peptidonucleicos (ANP) o ácidos nucleicos bloqueados (LNA). Ejemplos específicos de ácidos nucleicos naturales incluyen secuencias de ADN tales como ADN genómico o moléculas de ADNc, así como secuencias de ARN tales como moléculas de ARN<sub>nh</sub>, ARN<sub>m</sub> o ARN<sub>r</sub> o las secuencias de ácidos nucleicos de complemento inversas de los mismos. Dichos ácidos nucleicos pueden ser de cualquier longitud y pueden ser moléculas monocatenarias o bicatenarias. Típicamente, las moléculas de captura de ácido nucleico son oligonucleótidos monocatenarios que tienen una longitud de 10 a 150 nucleótidos, por ejemplo de 20 a 100 nucleótidos, 25 a 80 nucleótidos o 30 a 70 nucleótidos. En modos de realización específicos, las moléculas de captura se usan como cebadores en una PCR para amplificar cualquier ácido nucleico diana de interés presente en una muestra de fluido dada.

En algunos modos de realización, las moléculas de captura pueden comprender al menos una región de secuencia específica (es decir, la parte de unión mencionada anteriormente), que es complementaria de una región de secuencia de un ácido nucleico asociado con una infección vírica (por ejemplo, el ácido nucleico diana), permitiendo por lo tanto detectar el emparejamiento de bases entre las moléculas de captura y el ácido nucleico. Típicamente, la región de unión específica tiene una longitud de al menos 12 nucleótidos, por ejemplo, al menos 15 nucleótidos, al menos 18 nucleótidos o al menos 22 nucleótidos. En particular, la secuencia de nucleótidos de la región de unión de las moléculas de captura es complementaria de la secuencia de nucleótidos correspondiente del ácido nucleico diana. Como se usa en el presente documento, debe entenderse que el término "nucleótido" se refiere tanto a ribonucleótidos como a desoxirribonucleótidos (es decir, moléculas de ARN y ADN).

Las moléculas de captura se pueden proporcionar (por ejemplo, en forma liofilizada o seca) en una o más de la al menos una cámara de reacción del dispositivo antes de la introducción de la muestra de fluido que se va a analizar. De forma alternativa, las moléculas de captura se pueden introducir en el dispositivo junto con la muestra (es decir, concomitantemente) o después de que la muestra ya se haya introducido.

Se pueden emplear una o más especies de moléculas de captura. El término "una o más especies" indica uno o más tipos diferentes de moléculas de captura, tales como una o más moléculas de ácido nucleico que tienen diferentes secuencias de nucleótidos. Más de una especie de molécula de captura utilizada concomitantemente también se conoce como "colección". Dichas colecciones comprenden al menos dos, pero también pueden comprender muchas más moléculas diferentes, por ejemplo, al menos 5 especies diferentes, al menos 10 especies diferentes, al menos 30 especies diferentes, etc. Las colecciones también pueden estar presentes en forma de elementos de matriz o cualquier otra disposición espacial.

50 En otros modos de realización, el análisis realizado en el dispositivo comprende además poner en contacto los complejos que comprenden un ácido nucleico que se va a detectar y una molécula de captura con un primer miembro de unión del dispositivo, estando configurado el primer miembro de unión para unirse al grupo de anclaje de la molécula de captura para unir los complejos al primer miembro de unión.

El término "primer miembro de unión", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier matriz sólida, a la que las moléculas de captura, y por tanto también cualquier complejo que comprende dicha molécula de captura, se pueden acoplar por medio del grupo de anclaje de las moléculas de captura por interacciones covalentes o no covalentes. Los ejemplos de dichas matrices comprenden, entre otros, los sustratos de elementos de matriz (consultese anteriormente) o partículas sintéticas, tales como microesferas magnéticas (por ejemplo, microesferas de poliestirol paramagnéticas, también conocidas como Dynabeads®) y microesferas de látex. Dependiendo del tipo de molécula de captura, el tipo de grupo de anclaje y la aplicación pretendida, en cada caso es posible una gran variedad de enlaces. Por ejemplo, el grupo de anclaje de las moléculas de captura pueda ser un resto de biotina, que puede estar acoplado a una avidina o un grupo de estreptavidina que se une al miembro de unión. De forma alternativa, las moléculas de captura pueden comprender un tramo de residuos de adenosina (por ejemplo, 10 residuos de adenosina) que interactuarán con un tramo correspondiente de residuos de timidina unidos al miembro de unión. Los reactivos de acoplamiento específicos están disponibles comercialmente de diferentes proveedores y

están bien establecidos en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook, J. *et al.*, *supra*; Ausubel, F.M. *et al.*, *supra*, y Lottspeich, F., y Zorbas H., *supra*).

5 El primer miembro de unión se puede proporcionar en uno o más de la al menos una cámara de reacción del dispositivo antes de la introducción de la muestra de fluido que se va a analizar. De este modo, el miembro de unión se puede proporcionar en la misma una o más cámaras de reacción que las moléculas de captura o en al menos una cámara de reacción diferente. Típicamente, la etapa de formar complejos de moléculas de captura con ácidos nucleicos asociados con una infección vírica se realiza separada espacialmente de la etapa de poner en contacto los complejos con el primer miembro de unión, es decir, en diferentes cámaras de reacción del dispositivo (por ejemplo, el "pocillo de lisis" y el "pocillo central" mencionado en la FIG. 17). En dichos ejemplos, las moléculas de captura y el primer miembro de unión se proporcionan normalmente en diferentes cámaras de reacción. En lugar de proporcionar el primer miembro de unión en el dispositivo antes de añadir la muestra, el primer miembro de unión se puede introducir en el dispositivo junto con la muestra (es decir, concomitantemente) o después de que la muestra ya se haya introducido.

15 En modos de realización específicos, el procedimiento comprende además capturar los ácidos nucleicos diana que se han amplificado, típicamente sometiendo la muestra que se va a analizar a PCR, con respecto al primer miembro de unión (es decir, inmovilizando los ácidos nucleicos diana en el mismo).

20 En otros modos de realización específicos, el análisis realizado en el dispositivo comprende además proporcionar moléculas indicadoras que comprenden un sitio de interacción que puede formar un complejo con un ácido nucleico asociado con una infección vírica y que se puede capturar en un segundo miembro de unión del dispositivo.

25 El término "molécula indicadora" o "compuesto indicador", como se usa en el presente documento, indica cualquier molécula que pueda interactuar tanto con un ácido nucleico diana que se va a detectar como con un segundo miembro de unión. De este modo, la interacción se produce por medio de una región de unión común o diferente comprendida en la molécula indicadora. En general, las moléculas indicadoras son moléculas de ácido nucleico (es decir, moléculas de ARN o ADN como se describe anteriormente) que tienen una longitud de 10 a 100 nucleótidos, por ejemplo 15 a 50 nucleótidos, o 20 a 30 nucleótidos. Normalmente, las moléculas indicadoras son moléculas de ácido nucleico monocatenario (es decir, oligonucleótidos). En algunos modos de realización, las moléculas indicadoras de ácido nucleico comprenden una única región de unión que no solo puede interactuar con el ácido nucleico diana sino también ser capturada en un segundo miembro de unión. Típicamente, las interacciones son reversibles. La etapa de capturar en el segundo miembro de unión se puede lograr por medio de un grupo de anclaje comprendido en las moléculas indicadoras, como se ha descrito anteriormente para las moléculas de captura. En general, la región de unión específica comprendida en la molécula indicadora tiene una longitud de al menos 12 nucleótidos, por ejemplo, al menos 15 nucleótidos, al menos 18 nucleótidos o al menos 22 nucleótidos. En particular, la secuencia de nucleótidos de la parte de unión de las moléculas indicadoras es complementaria de la secuencia de nucleótidos correspondiente del ácido nucleico diana.

40 Las moléculas indicadoras se pueden proporcionar (por ejemplo, en forma liofilizada/seca) en una o más de la al menos una cámara de reacción del dispositivo usado en la invención antes de la introducción de la muestra de fluido que se va a analizar. De este modo, las moléculas indicadoras se pueden proporcionar en la misma una o más cámaras de reacción que las moléculas de captura y/o el primer miembro de unión o en al menos una cámara de reacción diferente. De forma alternativa, sin embargo las moléculas indicadoras se pueden introducir también en el dispositivo junto con la muestra (es decir, concomitantemente) o después de que la muestra ya se haya introducido.

45 En algunos modos de realización, las moléculas indicadoras y las moléculas de captura específicas de indicador como se describe anteriormente compiten por la unión a un ácido nucleico asociado con una infección vírica, es decir, las regiones de unión respectivas comprendidas en las moléculas de captura específicas de indicador y las moléculas indicadoras reconocen la(s) misma(s) o al menos similar(es) secuencia(s) correspondiente(s) del ácido nucleico diana. El término "secuencias similares", como se usa en el presente documento, indica secuencias que difieren solo en uno o más emparejamientos erróneos de nucleótidos individuales (es decir, pares de nucleótidos no complementarios) o en una o más adiciones, inserciones o deleciones de nucleótidos individuales (es decir, residuos adicionales o carentes de nucleótidos). En otras palabras, las regiones de unión respectivas comprendidas en las moléculas de captura específicas de indicador y las moléculas indicadoras son al menos parciales idénticas. El término "parcial idéntico", como se usa en el presente documento, indica secuencias que difieren solo en uno o más nucleótidos individuales, como se describe anteriormente, o secuencias que tienen sitios de unión superpuestos, es decir, secuencias que comparten una secuencia de nucleótidos común pero difieren en al menos otra parte de la región de la secuencia. Sin embargo, también es posible que las respectivas regiones de unión comprendidas en las moléculas de captura que compiten y los ácidos nucleicos diana reconozcan diferentes secuencias no superpuestas (por ejemplo, adyacentes) de una molécula indicadora, pero que la unión de la molécula de captura o el ácido nucleico diana a la molécula indicadora interfiera estéricamente en la unión de la otra.

60 Las moléculas indicadoras típicas para su uso en la presente invención, así como un ensayo competitivo típico para la detección de ácidos nucleicos asociados con infecciones víricas, se describen en el presente documento.

El término "segundo miembro de unión", como se usa en el presente documento, se puede referir al mismo tipo de matriz sólida que el primer miembro de unión (es decir, el primer y segundo miembro de unión pueden ser idénticos) o a un tipo diferente de matriz sólida. El segundo miembro de unión se puede proporcionar en uno o más de la al menos una cámara de reacción del dispositivo usado en la invención antes de la introducción de la muestra de fluido que se va a analizar. De este modo, el segundo miembro de unión se puede proporcionar en la misma una o más cámaras de reacción que las moléculas de captura y/o el primer miembro de unión y/o las moléculas indicadoras o en al menos una cámara de reacción diferente. En lugar de proporcionar el segundo miembro de unión en el dispositivo antes de añadir la muestra, el segundo miembro de unión se puede introducir en el dispositivo junto con la muestra (es decir, concomitantemente) o después de que la muestra ya se haya introducido.

En algunos modos de realización, el ensayo realizado en el dispositivo comprende además:

- permitir que las moléculas indicadoras se liberen del segundo miembro de unión, que las moléculas formadas liberadas formen un complejo con un ácido nucleico asociado con una infección vírica, y que las moléculas indicadoras que no están en complejo con un ácido nucleico asociado con una infección vírica se recapturen el segundo miembro de unión;
- determinar uno o más valores indicativos de la cantidad de moléculas indicadoras que se capturan en el segundo miembro de unión; y/o
- determinar uno o más valores indicativos de la cantidad de ácidos nucleicos asociados con una infección vírica en base a los valores indicativos de la cantidad de moléculas indicadoras.

La etapa de liberar las moléculas indicadoras del segundo miembro de unión se puede realizar incrementando la temperatura en la una o más cámaras de reacción del dispositivo, en las que se proporciona el segundo miembro de unión. La variación de la temperatura se puede lograr empleando una o más unidades de control de la temperatura y/o de regulación de la temperatura como se describe anteriormente. Dicho aumento de temperatura se puede producir, por ejemplo, durante la etapa de desnaturalización de una PCR realizada en el dispositivo. La formación de complejos entre moléculas indicadoras y un ácido nucleico diana y/o la recaptura de moléculas indicadoras que no están en complejo con un ácido nucleico diana en el segundo miembro de unión se puede lograr disminuyendo la temperatura en la respectiva una o más cámaras de reacción, por ejemplo, durante las etapas de hibridación y/o elongación de una PCR. Las configuraciones experimentales y los perfiles de temperatura para realizar amplificaciones por PCR están bien establecidos en la técnica. Por tanto, en algunos modos de realización, los ácidos nucleicos asociados con una infección vírica se someten adicionalmente a amplificación, mientras que se permite que las moléculas indicadoras se liberen del segundo miembro de unión, que las moléculas formadas liberadas formen un complejo con un ácido nucleico asociado con una infección vírica, y que las moléculas indicadoras que no están en complejo con un ácido nucleico asociado con una infección vírica se recapturen el segundo miembro de unión.

En algunos modos de realización, el procedimiento comprende además introducir uno o más agentes, comprendiendo cada uno uno o más restos detectables en la cámara de reacción del dispositivo antes de realizar la reacción de detección real. Es decir, los agentes que comprenden uno o más restos detectables se pueden introducir en la cámara de reacción antes de introducir la muestra (es decir, se pueden proporcionar en una o más cámaras de reacción), concomitantemente con la muestra, o después de que la muestra se haya introducido directamente o por medio de una unidad de llenado, como se describe anteriormente.

El término "agente que comprende uno o más restos detectables", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier compuesto que comprende una o más sustancias químicas o enzimas apropiadas (es decir, uno o más "restos"), que directa o indirectamente generan un compuesto o señal detectable en una reacción química, física o enzimática. Por tanto, dicho agente puede ser necesario para o facilitará la detección de los ácidos nucleicos diana y/o compuestos indicadores de interés al poder formar interacciones con dichos ácidos nucleicos diana y/o compuestos indicadores. Como se usa en el presente documento, debe entenderse que el término incluye tanto marcadores detectables como tales (también denominados "marcadores") como cualquier compuesto acoplado a uno o más de dichos marcadores detectables. Además, los restos que interfieren en la generación de una señal detectable por un marcador (por ejemplo, un extintor que "secuestra" las emisiones resultantes de la excitación del fluoróforo, siempre que el extintor y el fluoróforo estén en estrecha proximidad) también pertenecen a los marcadores detectables. Los marcadores detectables también pueden ser parte de o estar acoplados a las moléculas de captura y/o los ácidos nucleicos diana y/o las moléculas indicadoras, por ejemplo en forma de ribonucleótidos, desoxinucleótidos o didesoxinucleótidos modificados y/o marcados.

Los marcadores detectables que se pueden usar se describen anteriormente e incluyen marcadores fluorescentes.

El término "determinar un valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de ácidos nucleicos asociados con infecciones víricas", como se usa en el presente documento, se refiere a la detección/determinación de parámetros tales como conductividad eléctrica, potencial de oxidorreducción, absorción óptica, intensidad de fluorescencia o

bioluminiscencia, que permiten mediciones cualitativas y/o cuantitativas de los ácidos nucleicos diana presentes en una muestra de fluido dada. Se puede determinar solo uno único de estos parámetros, pero también es posible determinar más de un parámetro (por ejemplo, la conductividad eléctrica y la intensidad de una señal de fluorescencia causada por un marcador adecuado), ya sea concomitante o consecutivamente.

En algunos modos de realización, el procedimiento comprende además la determinación de uno o más valores indicativos de la carga vírica en un paciente basado en el valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de ácidos nucleicos totales asociados con una infección vírica. El término "carga vírica", como se usa en el presente documento, se refiere a la cantidad de virus presentes en un volumen dado de sangre (habitualmente calculada como el número de copias de virus presentes por ml de sangre). El número de copias de virus se puede determinar, entre otras, en base a la concentración total de ácidos nucleicos víricos presentes en una muestra dada empleando de paquetes de programas informáticos apropiados bien conocidos en la técnica (véase anteriormente).

La reacción de detección se puede realizar en una cámara de reacción particular del dispositivo usado (también denominada "cámara de detección") o en un segmento particular de una cámara de reacción denominado "zona de detección" (por ejemplo, un área situada entre esas una o más partes de la superficie de base y/o la superficie superior de la cámara de reacción que están hechas de un material transparente). Para mediciones cuantitativas, se puede emplear un dispositivo que comprende una cámara de detección y/o una zona de detección que tienen volúmenes conocidos, respectivamente.

La detección/determinación de un valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de los ácidos nucleicos diana se puede realizar solo una o más de una vez durante el ensayo realizado. En caso de más de una etapa de detección durante un solo ensayo, se calcula el valor medio de los resultados obtenidos. Los datos obtenidos en uno o más ciclos de detección se pueden analizar y procesar matemáticamente usando el programa informático apropiado conocido por los expertos en la técnica para determinar, entre otros, la presencia, la longitud o la secuencia de uno o más ácidos nucleicos diana y/o para calcular su cantidad.

También se divulga el uso de un procedimiento, como se define en el presente documento, para detectar el VIH en una muestra de fluido dada, en particular en una muestra de sangre completa (es decir, para determinar la mera presencia del virus), así como para el uso para determinar la carga del VIH en un paciente (es decir, para determinar la cantidad de virus presente).

De acuerdo con otro ejemplo, la presente divulgación se refiere al uso de la cantidad de ácidos nucleicos víricos totales, por ejemplo, como se determina mediante un procedimiento como se define en el presente documento, como un marcador de diagnóstico. En ejemplos particulares, los ácidos nucleicos víricos totales usados como marcadores de diagnóstico son ácidos nucleicos del VIH.

Se ha descubierto que el fraccionamiento de la muestra u otras etapas de procesamiento pueden provocar resultados falsos negativos de ensayo porque todos los polinucleótidos que están presentes en las partes "descartadas" de la muestra se desviarán, por tanto, de un análisis posterior. Esto es de particular importancia no solo en aplicaciones donde se requiere la detección fiable de polinucleótidos raros (es decir, ácidos nucleicos presentes solo en un número de copias muy bajo), por ejemplo, para probar el inicio de una afección patógena en una fase precoz, sino también en cualquier uso destinado a la determinación cuantitativa exacta de uno o más polinucleótidos presentes en una muestra, por ejemplo, para usar estos datos como un marcador para evaluar el estado de la enfermedad y/o la progresión.

Por ejemplo, tras la infección, los virus del huésped pueden sufrir una replicación inmediata, lo que da como resultado una liberación continua del virus y, por tanto, la propagación y diseminación del virus. Adicionalmente o de forma alternativa, al menos algunos tipos de virus pueden pasar por un estado de latencia (es decir, inactividad) antes de la reproducción, por ejemplo, en forma de provirus integrado en el genoma de la célula huésped. Por tanto, para determinar si un paciente está infectado por un virus particular, el procedimiento puede comprender no solo la detección de los ácidos nucleicos que se originan a partir de partículas de virus activamente replicadas, sino también de los ácidos nucleicos províricos como partes íntimas de las propias células diana. Además, los virus pueden aparecer como partículas libres o unidos a la superficie de células huésped usadas como "vehículos de transporte". Un ejemplo clínicamente importante de un virus que se puede producir concomitantemente en un paciente infectado como una partícula libre y/o como una partícula unida a las células huésped y/o como un provirus es el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

Como ya se ha indicado anteriormente, los ciclos de vida de los virus pueden ser muy diversos. Típicamente, tras la infección, los virus se replican en las células huésped desde donde se liberan los descendientes después del ensamblaje de nuevas partículas víricas. Sin embargo, en lugar de replicarse inmediatamente al infectar un huésped, algunos virus integran su información genética en el genoma de la célula huésped en forma de un provirus latente. Además, los virus se pueden diseminar dentro del huésped únicamente en forma de partículas víricas libres que circulan, por ejemplo, en la circulación sanguínea. Otros virus no solo se producen como partículas víricas libres sino también en forma de virus asociados a células que permanecen unidos, por ejemplo, a los glóbulos sanguíneos, usándolos como vehículos de transporte. Notablemente, dichas mezclas de virus diversos también pueden presentar

diferentes esperanzas de vida (semividas *in vivo*) en el huésped, es decir, pueden ser detectables durante diferentes períodos de tiempo (consúltese también la FIG. 35). Por ejemplo, en el caso de infecciones por el VIH, se ha demostrado que los virus libres que circulan en el plasma sanguíneo tienen una esperanza de vida de 0,3 días (es decir, una semivida *in vivo* de 0,24 días) en promedio, mientras que las células infectadas (por ejemplo, leucocitos) que albergan un provirus del VIH) tienen una esperanza de vida media de 2,2 días (es decir, una semivida *in vivo* de 1,6 días) (véase, por ejemplo, Perelson, A.S. *et al.* (1996) *Science* 271, 1582-1586).

Por lo tanto, usar una medida que incluya todos los diferentes estados de un ciclo de vida vírico y detecte todas las mezclas víricas diferentes (especialmente restringidas) que se pueden producir en un huésped dado con una alta sensibilidad es adecuada para detectar de manera fiable un virus en particular en un paciente afectado y/o para determinar con exactitud la carga vírica. Esto puede ser de particular importancia en pacientes que tienen solo una carga vírica bastante baja (por ejemplo, menos de 5000 copias víricas/ml de plasma sanguíneo o menos de 2000 copias víricas/ml de plasma sanguíneo), donde incluso cambios mínimos en el número de copias del virus pueden ser indicativos, por ejemplo, del inicio de una reinfección o la eficacia nueva de un tratamiento antivírico.

Se ha descubierto que la cantidad de ácidos nucleicos víricos totales, en particular la cantidad de ácidos nucleicos víricos totales en una muestra no tratada obtenida de un paciente, representa dicha medida, que puede representar, por tanto, un marcador clínico superior para diagnosticar una infección vírica.

Por ejemplo, en caso de que un paciente haya sido infectado por el VIH, entonces los ácidos nucleicos asociados con la infección por el VIH que pueden estar presentes en una muestra de sangre completa obtenida de ese paciente comprenden moléculas de ARN que se originan a partir del VIH libre (es decir, partículas de virus que circulan libremente en el plasma), moléculas de ARN que se originan a partir de VIH asociado a células (es decir, partículas de virus unidas a cualquier tipo de glóbulos sanguíneos), moléculas de ADN del VIH províricas que se integran en el genoma del huésped, moléculas de ADN del VIH retrotranscritas y transcritos del VIH derivados de ADN provírico. Sin embargo, una muestra de plasma sanguíneo obtenida del mismo paciente solo comprende moléculas de ARN que se originan a partir del VIH libre, ya que todas las demás especies de ácido nucleico del VIH se asocian con los glóbulos sanguíneos del paciente que se han retirado. Por lo tanto, es evidente que la cantidad de ácidos nucleicos del VIH totales que se originan a partir de una muestra de sangre completa representa un marcador diagnóstico más auténtico para el VIH que la cantidad de ácidos nucleicos del VIH totales que se originan a partir de una muestra de plasma sanguíneo (consúltese también la FIG. 35)

La cantidad total de ácidos nucleicos del VIH usados como marcador puede ser indicativa para detectar el VIH, determinar la carga del VIH en un paciente, monitorizar la progresión de la enfermedad en un paciente infectado por el VIH y/o monitorizar la eficacia del tratamiento antivírico de un paciente infectado por el VIH. La cantidad de ácidos nucleicos del VIH totales puede comprender ácidos nucleicos que se originan de virus libres y asociados a células, los cuales, a su vez, pueden comprender ARN que se origina a partir de virus libres, ARN que se origina de virus asociados a células, ADN provírico, ADN vírico retrotranscrito y ARN provírico transcrito.

En referencia a la **FIG. 1a**, un procedimiento 100 para la determinación de dianas moleculares incluye una etapa de lisis 102 (para lisar una muestra, por ejemplo, sangre completa, en presencia de moléculas de captura con grupos de anclaje), una etapa de formación de complejos 110 (para formar un complejo de ácidos nucleicos del VIH y sondas de captura con grupos de anclaje, por ejemplo, hibridación), una etapa de captura 114 (para capturar complejos en una matriz sólida, por medio de grupos de anclaje), una etapa de lavado 118 (para retirar todo el material no unido, por ejemplo, ácidos nucleicos, proteínas, contaminantes de peso molecular bajo, etc.), una etapa de amplificación 120 (para amplificar y marcar los ácidos nucleicos capturados) y una etapa de detección 126 (para detectar amplicones). De acuerdo con el procedimiento 100, los polinucleótidos se liberan de uno o más patógenos diana de una muestra. Los polinucleótidos liberados que están asociados con los patógenos diana se capturan en una superficie. Los polinucleótidos capturados se separan de los materiales concomitantes (por ejemplo, inhibidores de la amplificación) de la muestra. Los polinucleótidos capturados separados se amplifican para formar amplicones. La presencia de los polinucleótidos se determina detectando los amplicones. Debido a que los polinucleótidos amplificados se asocian con los patógenos diana, se puede determinar la presencia y/o identidad de los uno o más patógenos diana (por ejemplo, cualitativamente y/o cuantitativamente). En un modo de realización ejemplar, el procedimiento 100 incluye la determinación de la carga vírica en base a la determinación de uno o más virus presentes en una muestra de sangre. A continuación, se analizará diversas etapas del procedimiento 100.

En la etapa de lisis 102, los polinucleótidos 106 se liberan de patógenos presentes en una muestra de sangre 104. Los polinucleótidos se pueden liberar de los patógenos diana como se desee (por ejemplo, térmicamente, químicamente, mecánicamente, o por combinación de los mismos). En un modo de realización ejemplar, los polinucleótidos se liberan combinando la muestra 104 con un líquido de lisis que incluye materiales que lisan patógenos en la muestra. Ejemplos de líquidos que pueden lisar patógenos se encuentran en Boom R., Sol C.J., Salimans M.M., Jansen C.L., Wertheim-van Dillen P.M., van der Noordaa J., *Rapid And Simple Method For Purification Of Nucleic Acids*, *J. Clin. Microbiol.* 1990 Mar;28(3):495-503.

Un líquido de lisis ejemplar incluye uno o más de un desnaturalizante (por ejemplo, tiocianato de guanidina (GuSCN) (por ejemplo, aproximadamente 4,57 M)), un tampón de pH (por ejemplo, Tris-HCl, (por ejemplo, pH 6.4, 45 mM), un

quelante (por ejemplo, EDTA 20 mM) y un detergente (por ejemplo, Triton X-100 al 1,2 % (p/v) y/o saponina (por ejemplo, 0,2 %)), una sal (por ejemplo, MgCl<sub>2</sub> (por ejemplo, 75 mM) y/o ZnCl<sub>2</sub> (por ejemplo, 1 mM)).

5 La etapa de lisis 102 típicamente incluye formar una mezcla que comprende polinucleótidos liberados 106, concomitantes de la muestra 104 (por ejemplo, componentes celulares, inhibidores de la amplificación, proteínas y otros materiales) y moléculas de captura 108i. Cada molécula de captura 108i incluye una parte de unión a polinucleótido 109i y un grupo de anclaje de biotina 111. Cada parte de unión a polinucleótido 109i es una secuencia de polinucleótido complementaria de (por ejemplo, específica para) una región diferente del polinucleótido 106. Por ejemplo, la molécula de captura 108a incluye una parte de unión 109a complementaria de una región diana 113 del polinucleótido 106 y la molécula de captura 108b incluye una parte de unión 109b complementaria de una región diana diferente 115 del polinucleótido 106. Típicamente, se usa al menos una (por ejemplo, dos o más, tres o más, cuatro o más) molécula de captura diferente para cada polinucleótido que se va a determinar.

15 En algunos modos de realización, los polinucleótidos 106 se liberan de patógenos diana en presencia de moléculas de captura 108i. Esto se puede lograr, por ejemplo, combinando esencialmente de forma simultánea la muestra 104 con las moléculas de captura 108i y lisando los componentes líquidos. La muestra 104 se puede combinar con las moléculas de captura 108i y los componentes del líquido de lisis se pueden combinar con las moléculas de captura 108i y los componentes del líquido de lisis en un estado líquido o en un estado secado (por ejemplo, liofilizado).

20 En modos de realización alternativos, los polinucleótidos se liberan a partir de patógenos de la muestra 104 y la mezcla resultante se combina con las moléculas de captura 108i. Por ejemplo, la muestra 104 y los componentes líquidos de lisis excluyendo las moléculas de captura 108i se pueden combinar y dejar incubar durante un período de tiempo antes de combinar la mezcla incubada con las moléculas de captura 108i.

25 En un modo de realización ejemplar, los polinucleótidos 106 son ARN del VIH y las partes de unión 109i de las moléculas de captura 108i son complementarias a regiones de las mismas.

30 Pasando a la etapa de formación del complejo 110, una o más moléculas de captura 108i se combinan con (por ejemplo, hibridan con) el polinucleótido 106 para formar un complejo 112. La etapa de formación del complejo 110 se puede realizar, por ejemplo, permitiendo que los polinucleótidos liberados 106 se incuben durante un período de tiempo en presencia de moléculas de captura 108i suficientes para formar complejos 112. En algunos modos de realización, el período de incubación es de al menos aproximadamente 60 segundos (por ejemplo, al menos aproximadamente 120 segundos, al menos aproximadamente 360 segundos). En algunos modos de realización, el período de incubación es de aproximadamente 600 segundos o menos (por ejemplo, aproximadamente 480 segundos o menos, aproximadamente 420 segundos o menos). En un modo de realización ejemplar, el período de incubación es de aproximadamente 5 minutos.

35 Para cada polinucleótido que se va a determinar, la concentración total de moléculas de captura 108i es típicamente suficiente para capturar la mayoría (por ejemplo, al menos un 60 %, al menos un 75 %, al menos un 90 %, esencialmente la totalidad) del polinucleótido en los complejos 112. En algunos modos de realización, la concentración de cada una de una o más (por ejemplo, la mayoría o todas) de las moléculas de captura 108i es al menos aproximadamente 0,1 μM (por ejemplo, al menos aproximadamente 0, 25 μM, al menos aproximadamente 0,5 μM). La concentración en cada una de una o más (por ejemplo, la mayoría o todas) de las moléculas de captura es típicamente de aproximadamente 2 μM o menos (por ejemplo, aproximadamente 1,5 μM o menos, aproximadamente 1 μM o menos). En un modo de realización ejemplar, la concentración de cada una de una o más (por ejemplo, la mayoría o todas) de las moléculas de captura es aproximadamente 0,625 μM.

40 Pasando a la etapa de captura 114, los complejos 112 y las partículas de captura 117 se combinan para formar complejos de captura 119. Cada complejo de captura 119 incluye uno o más complejos 112 y una partícula de captura 117. Los complejos 112 están típicamente unidos no selectivamente a la partícula 117. Cada partícula de captura 117 incluye una superficie de captura de estreptavidina 116. Las partículas de captura 117 capturan cada complejo 112 mediante la interacción entre uno o más grupos de anclaje de biotina 111 de las moléculas de captura 108i y la superficie de captura de estreptavidina 116. Las partículas de captura ejemplares 117 incluyen microesferas de sefarosa con estreptavidina (Amersham) que tiene un diámetro de aproximadamente 34 μm antes del lavado con diH<sub>2</sub>O para retirar el etanol. Se usan aproximadamente de 10 000 a 20 000 microesferas por análisis, lo que corresponde a una capacidad de unión de aproximadamente 3 nmol de biotina por 10 μl de sangre completa.

45 Típicamente, la etapa de captura 114 se inicia después de incubar la muestra 104 con polinucleótidos 106 y las moléculas de captura 108i durante un tiempo suficiente para formar complejos 112. Por ejemplo, la muestra 104 se puede incubar en presencia del líquido de lisis y las moléculas de captura 108i antes de combinar la mezcla resultante con partículas de captura 117.

50 Típicamente, la concentración total de moléculas de captura 108i y partículas 117 es suficiente para capturar cuantitativamente cada uno de uno o más polinucleótidos seleccionados 106 asociados con cada uno de uno o más patógenos diana en la muestra 104. Por tanto, para cada polinucleótido 106 que se va a determinar, sustancialmente

65

la totalidad (por ejemplo, al menos un 75 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 97,5 %, o esencialmente la totalidad) del polinucleótido es capturada por las moléculas de captura 108i y las partículas 117.

5 Pasando a la etapa de lavado 118, los complejos de captura 119 se separan del material concomitante (por ejemplo, ácidos nucleicos, proteínas, componentes celulares, reactivos de lisis y similares) no capturados por las partículas 117. En algunos modos de realización, los complejos de captura 119 se filtran usando un filtro con poros lo suficientemente pequeños para evitar el paso de los complejos 119 pero lo suficientemente grandes como para permitir el paso de material no capturado por las partículas 117.

10 Los complejos de captura 119 se pueden lavar con un líquido de lavado para mejorar la separación del material concomitante. En algunos modos de realización, se usan dos o más líquidos de lavado diferentes. En algunos modos de realización, un primer líquido de lavado contiene un detergente para retirar sustancias de bajo peso molecular, proteínas y otros componentes celulares que se adhieren a las partículas por medio de interacción hidrófoba y un segundo líquido de lavado retira el detergente que, de otro modo, podría interferir en el proceso de  
15 amplificación posterior. Un primer líquido de lavado ejemplar incluye LiCl 0,15 M, SDS al 0,1 % (dado que SDS es un inhibidor de la PCR, se puede eliminar antes de un procedimiento de PCR), Tris-HCl 10 mM pH 8,0 y EDTA 1 mM). Un segundo líquido de lavado ejemplar incluye LiCl 0,15 M, Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM. Los líquidos de lavado adecuados se describen, por ejemplo, en la publicación de patente de EE.UU. n.º 20040215011A1.

20 Pasando a la etapa de amplificación 120, los polinucleótidos 106 se amplifican usando sondas 122. Típicamente, la amplificación es una amplificación por PCR. En un modo de realización ejemplar, los polinucleótidos 106 son ARN y la amplificación es por RT-PCR. En algunos modos de realización, el patógeno es el VIH.

25 En referencia a la **FIG. 1d**., en algunos modos de realización, la etapa de amplificación 120 produce amplicones 130. En condiciones de hibridación (por ejemplo, temperaturas), los amplicones 130 son capturados por las moléculas de sonda de captura inmovilizadas 108a, 108b y 108c en la superficie de estreptavidina 116 de las partículas 117. Los amplicones se marcan con un agente de marcado fluorescente 125 que comprende un marcador óptico 124 (por ejemplo, un marcador fluorescente) y una parte de polinucleótido 129 complementaria de una región del amplicón  
30 130.

Con referencia a la **FIG. 1e**, en un modo de realización alternativo, cada sonda 122 incluye un marcador óptico 124 (por ejemplo, un marcador fluorescente). Otras sondas 108j incluyen una parte de polinucleótidos 109j complementaria de una región del amplicón 130 y también lleva un grupo de anclaje de biotina 111. Las moléculas de sonda 108j se capturan en la superficie de estreptavidina 116 de las partículas 117. La etapa de amplificación  
35 124 produce amplicones 130 directamente marcados, cada uno de los cuales incluye un marcador 124. Los amplicones 130 son capturados por las moléculas de sonda inmovilizadas 108j sobre la superficie de estreptavidina 116 de las partículas 117. Las partes de unión 109j de las sondas 108j pueden ser las mismas o diferentes de las sondas 108i usadas en la etapa de captura 114. Las sondas 108j y/o las microesferas 117 se pueden combinar con polinucleótidos 106 junto con otros componentes usados para realizar la etapa de amplificación 120.

40 En la etapa de detección 126, se detectan amplicones 130 (por ejemplo, mediante detección fluorescente de marcadores 111). La etapa de detección 126 se puede realizar con amplicones 130 capturados en la superficie de estreptavidina 116 de las partículas 117. La etapa de detección 126 se puede realizar sin combinar en primer lugar los amplicones con un líquido libre de sondas 122. Por ejemplo, la etapa de detección 126 se puede realizar con los  
45 amplicones capturados 130 presentes entre las superficies primera y segunda después de reducir una distancia las superficies. Un modo de realización de este procedimiento para realizar la etapa de detección 126 se describe a analiza con respecto a la FIG. 1b y la FIG. 1c.

50 Con referencia a la **FIG. 1b** y la **FIG. 1c**, un sistema 200 para realizar al menos la etapa de detección 126 del procedimiento 100 incluye un cartucho microfluídico 202, un sistema de detección 210, un accionador de plantilla 212 y un procesador 218, en comunicación con el sistema de detección 210 y el accionador 212.

El cartucho 202 incluye un primer sustrato 206 y un segundo sustrato 208, que conjuntamente definen una cámara de detección 204. El primer sustrato 206 es típicamente transmisor ópticamente (por ejemplo, transparente) con  
55 respecto a una longitud de onda de luz útil para excitar y detectar la fluorescencia de los marcadores 124 de los amplicones 130. El primer sustrato 206 puede estar formado, por ejemplo, por un polímero, vidrio o sílice. El segundo sustrato 208 está formado por un material maleable o flexible (por ejemplo, un polímero elastomérico). El primer sustrato 206 es, en general, menos flexible que el segundo sustrato 208.

60 El accionador 212 incluye una plantilla 214 y un controlador de plantilla 236 configurado para dirigir la plantilla hacia y desde el segundo sustrato 208. El controlador de la plantilla 236 se puede accionar, por ejemplo, por aire comprimido, electroimanes, accionamiento piezoeléctrico u otro adecuado. Como se observa en la FIG. 1c, cuando se acciona hacia una pared 238 del segundo sustrato 208, la plantilla 214 reduce una distancia "d" entre la pared interna 232 del primer sustrato 206 y la pared interna 234 del segundo sustrato 208.

65

En el estado de distancia reducida de la FIG. 1c, al menos algunas partículas de captura 117 con los amplicones capturados 130 permanecen entre las superficies 232, 234. Por el contrario, gran parte del líquido que rodea las partículas 117 se desliza de entre las superficies 232, 234.

5 El sistema de detección 210 está configurado para detectar la presencia de amplicones 130 con el cartucho 202 en el estado de distancia reducida de la FIG. 1c. El sistema de detección 210 incluye una fuente de luz 246 (por ejemplo, un láser), un detector de imágenes 240 y un sistema óptico 242. En uso, la fuente de luz 246 ilumina el material presente entre las superficies internas 232, 234 de los sustratos 206, 208. Se detecta la fluorescencia 250 emitida por los marcadores 124 desde los amplicones 130. La fluorescencia detectada 250 es indicativa de la presencia de amplicones 130. El procesador 218 recibe una señal del sistema de detección 210 indicativa de la fluorescencia detectada. El procesador 218 puede determinar la presencia de los amplicones 130 y, por lo tanto, la presencia de los patógenos correspondientes en la muestra 104.

15 En general, el líquido que queda entre las superficies internas 232,234 emite una fluorescencia de fondo 252 no asociada con la presencia de amplicones 130. La intensidad de la fluorescencia de fondo 252 es, en general, proporcional a la cantidad de líquido que queda entre las superficies internas 232,234. Sin embargo, la intensidad de la fluorescencia del marcador 250 de los marcadores 124 de los amplicones 130 se sitúa espacialmente en la vecindad de las partículas 117. El detector de imágenes 240 recibe y detecta tanto la fluorescencia del marcador 250 como la fluorescencia de fondo 252. Sin embargo, debido al desplazamiento de líquido de entre las superficies internas 232, 234 en el estado de distancia reducida de la FIG. 1c, la relación señal-ruido de la fluorescencia del marcador 252 con respecto a la fluorescencia de fondo 250 es mayor que en el estado no reducido de la FIG. 1b.

25 Un modo de realización ejemplar del procedimiento 100 se puede realizar como sigue. Se obtiene de un individuo entre aproximadamente 5 y 10  $\mu$ l de sangre capilar (por ejemplo, yema de un dedo, lóbulo de la oreja). La muestra de sangre se combina con aproximadamente 90  $\mu$ l de un tampón de lisis que incluye componentes de lisis y moléculas de captura 108i. La mezcla resultante se incuba con agitación durante aproximadamente 5 min a 21 °C. La mezcla incubada se combina con una cantidad de partículas 117 equivalente a aproximadamente 10  $\mu$ l de suspensión, correspondiente a una capacidad de unión de 3 nmol de biotina, es decir, las partículas se compran como una suspensión de partículas en etanol al 20 %. La mezcla con partículas se incuba con agitación durante aproximadamente 5 min a 21 °C. Después de la incubación, el sobrenadante se retira por el sistema de activación de la plantilla 350 para hacer funcionar el cartucho 300. Las partículas se lavan con un primer tampón de lavado (por ejemplo, 3 veces con 50  $\mu$ l de volumen cada vez) y, a continuación, con un segundo tampón de lavado (por ejemplo, 3 veces con 50  $\mu$ l cada vez). Después del lavado, se retira el sobrenadante. Las partículas lavadas se combinan con un medio de amplificación y se someten a amplificación por qRT-PCR para la detección (por ejemplo, la cuantificación) de los polinucleótidos capturados 106.

40 Con referencia a la FIG. 14, se detecta la fluorescencia de los amplicones 130 (por ejemplo, usando el modo de distancia reducida de un instrumento tal como el que se muestra en la FIG. 1b y la FIG. 1c). Los amplicones 130 se pueden detectar después de cada uno de los múltiples ciclos diferentes de calentamiento y enfriamiento de la amplificación. De esta manera, la acumulación de la concentración de amplicón se puede seguir en el tiempo. Los amplicones se detectan típicamente mientras están unidos a las partículas 117.

45 Si bien se ha descrito que el procedimiento 100 incluye una etapa de liberación de polinucleótidos desde patógenos, el procedimiento 100 puede incluir otras etapas para proporcionar polinucleótidos. En algunos modos de realización, los polinucleótidos se liberan de células no patógenas (por ejemplo, plantas, humanos, animales o similares). En algunos modos de realización, los polinucleótidos son productos de un análisis de expresión génica. En algunos modos de realización, los polinucleótidos se proporcionan sin necesitar una etapa de liberación y/o como polinucleótidos ya liberados de una célula u otra muestra biológica.

50 A continuación, se analizará un modo de realización de un sistema de ensayo y un cartucho microfluídico que puede realizar la mayoría de las etapas (por ejemplo, todas) del procedimiento 100.

55 Con referencia a la FIG. 2, un cartucho microfluídico 300 incluye un primer sustrato 301, un segundo sustrato 303 y una red microfluídica 305. Los sustratos primero y segundo 301,303 pueden tener propiedades similares a las descritas para los sustratos 206,208 del cartucho 202.

60 La red microfluídica 305 está configurada para recibir una muestra y diversos materiales de reactivos, permitir que se realicen operaciones en estos materiales (por ejemplo, mezcla, transporte e incubación) y facilitar la detección de amplicones indicativos de la presencia de uno o más patógenos diana.

65 La red microfluídica 305 incluye una entrada de muestra 302 conectada por un canal 304 a una cámara de lisis 306, que está conectada por un canal 308 y un punto de unión 307 a una cámara de detección 332; una primera entrada de líquido 310 está conectada por un canal 312 a una primera cámara de reactivos 314, que está conectada por un canal 316 al punto de unión 307; una segunda entrada de líquido 318 está conectada por un canal 319 a una segunda cámara de reactivos 320, que está conectada por un canal 322 al punto de unión 307; y una tercera entrada de líquido 324 está conectada por un canal 326 a una cámara de reactivos de marcado para amplificación

328, que está conectada por un canal 330 al punto unión 307. El punto de unión 307 está conectado a una cámara de residuos 334 por medio de un canal de residuos 336. La cámara de detección 332 está conectada a la cámara de residuos 334 por medio de un canal de residuos 340, que incluye un filtro dimensionado para evitar el paso de partículas 317 pero para permitir el paso de material no capturado como se describe en la etapa de lavado 118 del procedimiento 100.

Típicamente, las cámaras de reactivos 306, 314, 320, 328 incluyen reactivos liofilizados (por ejemplo, como microesferas) usados para realizar las etapas como se describe para el procedimiento 100. En uso, se introduce un líquido (por ejemplo, agua, tampón, disolvente acuoso u otro líquido) en la entrada correspondiente a una cámara. El líquido solubiliza los reactivos liofilizados para formar un líquido. En un modo de realización ejemplar, la cámara de lisis 306 incluye reactivos liofilizados para facilitar la lisis de patógenos diana y las moléculas de captura 308i correspondientes a polinucleótidos de los patógenos. Típicamente, los reactivos liofilizados de la cámara 306 son solubilizados por la muestra (por ejemplo, una muestra de sangre completa) solos o en combinación con líquido añadido. En un modo de realización ejemplar, la cámara 314 incluye reactivos liofilizados para formar un líquido de lavado (por ejemplo, un primer líquido de lavado (tampón)) cuando se combina con un líquido introducido en la entrada 310. En un modo de realización ejemplar, la cámara 320 incluye reactivos liofilizados para formar un líquido de lavado (por ejemplo, un segundo líquido de lavado (tampón)) cuando se combina con un líquido introducido en la entrada 318. En un modo de realización ejemplar, la cámara 328 incluye reactivos liofilizados para formar una mezcla de amplificación (por ejemplo, un segundo líquido de lavado (tampón)) cuando se combina con un líquido introducido en la entrada 324.

Antes del uso del dispositivo 300, las partículas 116 se disponen típicamente dentro de la red 305 corriente abajo de la cámara 306. Por ejemplo, las partículas 116 se pueden disponer dentro de la cámara de detección 332 antes de su uso. Las partículas 116 se pueden lavar con líquidos de las cámaras 306,314,320,328 mediante el accionamiento adecuado de las plantillas como se analiza a continuación.

Con referencia a la **FIG. 3**, el cartucho microfluídico 300 se muestra en combinación con un sistema de accionador de plantilla 350 para hacer funcionar el cartucho 300. El sistema de accionador 300 incluye una base de accionador 352 y múltiples plantillas 354i. Cada plantilla 354i es accionada por un controlador de plantilla correspondiente similar al controlador de plantilla 236. En uso, el cartucho 300 se sitúa con el sustrato flexible 303 orientado hacia la base del accionador 352 y las plantillas 354i. Cada plantilla 354i corresponde espacialmente a una localización diferente de la red microfluídica 305. Por ejemplo, la plantilla 354d corresponde al canal de residuos 336. Cuando se acciona, la plantilla 354d comprime el sustrato 303 que está superpuesta al canal 336, obstruyendo de este modo el canal 336 y evitando el paso de fluido a lo largo del mismo.

Por tanto, la propiedad flexible del segundo sustrato 303 o elemento de cubierta garantiza que se pueda deformar de manera reversible cuando una plantilla 354i ejerce una fuerza mecánica sobre una parte dedicada del segundo sustrato flexible 303. En otras palabras, si se desea una acción de válvula reversible, la deformación del segundo sustrato 303 es reversible en la medida en que cuando se retira la fuerza aplicada por la plantilla 354i, el segundo sustrato 303 vuelve a su posición original de modo que el fluido puede volver a pasar a lo largo de un canal correspondiente 336.

En contraste con esto, la propiedad rígida del primer sustrato 301 se refiere al hecho de que el material del primer sustrato 301 está configurado de tal manera que, al ejercer una fuerza con una plantilla 354i sobre el primer sustrato 301, no se produce la deformación del primer sustrato 301, lo que podría influir en la función de la válvula. En consecuencia, el segundo sustrato 303 proporciona flexibilidad, mientras que el primer sustrato 301 proporciona estabilidad.

Otras plantillas corresponden de forma similar a otros canales de red 305. Las plantillas 354a, 354c corresponden, respectivamente, al canal de residuos 340 y el punto de unión 307. El accionamiento de las plantillas 354a, 354c sella la cámara de detección 332, lo que permite realizar múltiples ciclos de calentamiento y enfriamiento sin una pérdida significativa de líquido en la misma. El filtro 341 permite que el lavado de las partículas 116 dentro de la cámara 332 con líquidos de las cámaras 306,314,320,328 sin pérdida de las partículas. Todavía otras plantillas corresponden, respectivamente, a las cámaras 306, 314, 320, 328 y 332. El accionamiento repetitivo de estas plantillas se puede usar para agitar el material (por ejemplo, líquido) dentro de las cámaras para facilitar la mezcla (por ejemplo, de muestras y reactivos). El accionamiento secuencial de las plantillas a lo largo de un canal se puede usar para mover líquidos a lo largo del canal. El contenido de una cámara se puede vaciar, por ejemplo, mediante el accionamiento de las respectivas plantillas que funcionan corriente arriba, corriente abajo y sobre la cámara.

En un modo de realización, el sustrato es lo suficientemente reversible en el sentido de que, tras repetidos accionamientos y retiradas de las plantilla s(por ejemplo, al menos diez, o al menos cincuenta), el sustrato vuelve a su posición original, de modo que la parte de una red microfluídica que subyace a una plantilla particular se puede obstruir y reabrir repetidamente.

El cartucho 300 se puede hacer funcionar como sigue. Una cantidad (por ejemplo, entre aproximadamente 5-10  $\mu$ l) de muestra (por ejemplo, sangre completa) y una cantidad opcional (por ejemplo, entre aproximadamente 5 y 50  $\mu$ l)

- de líquido (por ejemplo, agua) se introduce en la red 305 de la cámara 306 por medio de la entrada 302. Una cantidad de líquido (por ejemplo, entre aproximadamente 20 y 200  $\mu$ l) se introduce en las cámaras 314,320,328 por medio de las entradas correspondientes. La muestra introducida respectivamente y los líquidos opcionales resolubilizan los reactivos liofilizados presentes en las cámaras 306,314,320,328. Las plantillas correspondientes a cada cámara se accionan para agitar la mezcla de reactivo líquido en la misma para facilitar la mezcla. Dentro de la cámara de lisis 306, el tampón de lisis libera polinucleótidos 106 de patógenos (por ejemplo, como en la etapa de lisis 102). Los polinucleótidos liberados se combinan con las moléculas de captura 108i para formar complejos 112 (por ejemplo, como en la etapa de formación de complejos 110).
- La mezcla de lisado de la cámara 306 se mueve a la cámara de detección 332 y se combina con partículas 116 y se incuban para formar los complejos de captura 119 (por ejemplo, como en la etapa de captura 114). La mezcla dentro de la cámara 332 se puede agitar, por ejemplo, usando una plantilla. Al final de la incubación de la etapa de captura 114, el líquido/sobrenadante se retira de la cámara de detección 332 a la cámara de residuos 334 con el sistema de accionador de plantilla 350 para hacer funcionar el cartucho 300.
- Después de retirar el líquido/sobrenadante de la cámara de residuos 332, el líquido de lavado de las cámaras 314,320 se mueve a través de la cámara 332 para separar los concomitantes de los complejos 119 (por ejemplo, como en la etapa de lavado 118). La cámara 332 se puede agitar por medio de la plantilla 354b durante el lavado.
- Después de separar los concomitantes de los complejos 119 dentro de la cámara 332, los reactivos de amplificación de la cámara 328 se mueven a la cámara de detección 332 y los contenidos resultantes se someten a múltiples ciclos de PCR (por ejemplo, como en la etapa de amplificación 120).
- Después de cada uno de uno o más ciclos de amplificación, la plantilla 354b se acciona para reducir la distancia entre las superficies internas opuestas de la cámara de detección 332. Los complejos 119, si están presentes, permanecen atrapados entre las superficies internas, mientras que otros contenidos se desplazan relativamente como se analiza con respecto al dispositivo 200 en la FIG. 1c. La detección se realiza típicamente usando un sistema de detección de fluorescencia (por ejemplo, como se describe para el dispositivo 200). La detección se realiza típicamente con los amplicones 130 de los complejos 112 en el estado hibridado y unidos a las partículas 117 como complejos 119 (por ejemplo, como en la etapa de detección 126). Después de cada ciclo, la población de amplicones 130 se incrementa. La intensidad de la fluorescencia resultante de los complejos de captura 119 se incrementa en consecuencia. El aumento de la intensidad de la fluorescencia con el número de ciclos se puede monitorizar para determinar el ciclo umbral en el cual los amplicones 130 se pueden cuantificar. Debido a que los polinucleótidos 106 se capturan cuantitativamente (por ejemplo, como en la etapa de captura 114), la detección cuantitativa de los amplicones 130 permite que la cantidad de polinucleótidos 106 presente en la muestra se determine cuantitativamente. Por tanto, por ejemplo, cuando el patógeno es un virus (por ejemplo, el VIH), se puede determinar la carga vírica dentro de la muestra (por ejemplo, sangre completa).
- El cartucho 300 puede incluir además una matriz que incluye múltiples polinucleótidos inmovilizados, correspondiendo cada uno a una secuencia de polinucleótidos de un subtipo de patógeno diferente. Después de la etapa de detección 126, se realiza la hibridación de los amplicones 130 para determinar el subtipo de patógeno. En un modo de realización ejemplar, la matriz incluye polinucleótidos configurados para determinar un subtipo del VIH.
- Si bien se ha descrito que el funcionamiento del cartucho 300 incluye la adición de reactivos líquidos, los reactivos líquidos se pueden almacenar en el cartucho como en envases alveolados y liberar durante el uso.
- Otros ejemplos de sistemas adecuados para determinar ópticamente la presencia de la marcador 124 se describen en el documento WO 2005/108604
- A continuación, en referencia a la FIG. 4 a la FIG. 16, se explicarán diversas etapas durante un procedimiento de análisis de acuerdo con un modo de realización ejemplar.
- La **FIG. 4** ilustra una lisis.
- La **FIG. 5** a la **FIG. 10** ilustran la captura de complejos de ARN en una matriz sólida.
- La **FIG. 11** ilustra el lavado.
- La **FIG. 12** y la **FIG. 13** ilustran la amplificación.
- La **FIG. 14** a la **FIG. 16** ilustran la detección.
- La fig. 17a. ilustra un sistema ejemplar 400 para realizar al menos las etapas de captura de dianas de una muestra, amplificación de la diana y detección de uno o más valores indicativos de la presencia de la diana en la muestra.

La fig. 17b. ilustra un sistema ejemplar 400 para realizar al menos las etapas de captura de dianas de una muestra, amplificación de la diana y detección de uno o más valores indicativos de la presencia de la diana en la muestra en estado de funcionamiento.

5 La fig. 17c ilustra un modo de realización ejemplar para la unidad de válvula 435 representada en las fig. 17a y 17b.

La fig. 17d ilustra un modo de realización ejemplar para la válvula 2 representada en la fig. 17c.

10 Con referencia a la fig. 17a y b, el sistema ejemplar 400 comprende un cartucho microfluídico 401, un sistema de detección 455, un sistema de calentamiento y/o enfriamiento de al menos una parte del cartucho 451, los elementos de accionador 441-444 y los accionadores 437-440, una unidad de válvula 435, un compresor 431, un depósito de líquido 461 y un procesador 471.

15 El cartucho 401 comprende un sustrato 402 y un primer elemento de cubierta 403 que conjuntamente definen un primer y un segundo pocillos 408 y 407. El primer elemento de cubierta 403 es al menos parcialmente flexible para permitir que el elemento de cubierta se presione de forma reversible hacia el sustrato 402. El cartucho comprende además un segundo elemento de cubierta que define conjuntamente con el sustrato 402 los canales 410, 411, 412. En algunos modos de realización, el segundo elemento de cubierta también es al menos parcialmente flexible. Los canales y los pocillos están interconectados por los orificios 413, 414, 415, 416 para formar una red microfluídica.

20 En diversos modos de realización, el sustrato 402 puede ser cualquier cuerpo físico hecho de cualquier material adecuado, tal como plásticos, vidrio, metal o un semiconductor. Puede ser cualquier superficie esencialmente plana (es decir, bidimensional) o no plana (es decir, tridimensional). Un ejemplo de dicho objeto tridimensional es un cuerpo físico que tiene una cavidad o pocillo que comprende una cámara de reacción (en la que se puede producir una reacción biológica, química o bioquímica) que comprende vías fluidicas (como canales).

25 El primer pocillo 408 que también se puede indicar como pocillo de lisis está adaptado para alojar fluidos y para liberar contenido de células, esporas o virus, incluyendo los contenidos moléculas diana que se van a analizar por el sistema 400. Por ejemplo, el primer pocillo 408 está adaptado para liberar contenido de células, esporas o virus comprendiendo los reactivos de lisis 409 como se describe anteriormente. Los reactivos de lisis 409 se pueden proporcionar en forma seca.

30 Un segundo pocillo 407 que también se puede indicar como pocillo central está adaptado para alojar fluidos y comprende partículas 406 como primeros miembros de unión, las partículas adaptadas para capturar la diana en complejo con moléculas de captura y, opcionalmente, un segundo miembro de unión 417 adaptado para capturar moléculas indicadoras. El segundo pocillo 407 comprende además elementos de filtro 405 para evitar el paso de partículas 406, pero para permitir el paso de gases, líquidos y sustancias disueltas en los líquidos.

35 Los pocillos 407 y 408 están interconectados por el canal 411 por medio de los orificios pasantes 415 y 414.

40 Más en general, el primer y segundo pocillos 408, 407 pueden ser de cualquier estructura, es decir, cualquier entidad física que pueda servir como vehículo para recibir muestras o sustancias. En particular, dichas estructuras pueden incluir rebajos tales como ranuras, pocillos o canales, o también pueden cubrir un material en el que se pueden alojar sustancias y a través de las cuales se pueden mover las sustancias, tales como geles.

45 En diversos modos de realización, los miembros de unión comprenden un componente que está configurado para unirse a moléculas que tienen una configuración específica. Dichos miembros de unión pueden o no ser moléculas inmovilizadas sobre una superficie. Una capacidad de unión también se puede derivar directamente de una configuración de superficie (por ejemplo, una estructura de superficie porosa). También es posible que los miembros de unión se proporcionen como o sobre elementos tridimensionales tales como microesferas o un soporte poroso. La superficie de dicho elemento tridimensional o moléculas adicionales unidas a la superficie del elemento tridimensional, por ejemplo, partículas, puede servir, a continuación, como miembros de unión. También se pueden disponer diferentes miembros de unión que son sensibles a diferentes moléculas (por ejemplo, de una manera similar a una matriz) sobre una superficie de una estructura. Los ejemplos de miembros de unión se describen anteriormente con respecto a los diversos procedimientos divulgados en el presente documento.

50 Los volúmenes del pocillo de lisis 408 y del pocillo central 407 pueden ser de 100  $\mu$ l.

55 En un modo de realización ejemplar, la anchura de los canales 410-412 es de 200  $\mu$ m, y la altura de los canales 410-412 es de 100  $\mu$ m.

60 En diversos modos de realización, dicha red microfluídica puede comprender uno o más canales y/o pocillos, que pueden estar interconectados entre sí. Por ejemplo, los diversos canales de dicha red microfluídica pueden estar bifurcados o ramificados para permitir de este modo el transporte de líquidos a través de la red microfluídica a lo largo de vías predefinidas (no mostradas).

65

El sistema 400 también comprende un sistema de accionador que comprende miembros de accionador 441, 442, 443, 444 accionados por accionadores neumáticos 437, 438, 439, 440, una unidad de válvula 435, un compresor 431 y un depósito para aire comprimido 433.

5 El compresor 431 puede ajustar constantemente una presión definida en el depósito para el aire comprimido 433.

Cada uno de los miembros de accionador 441, 442, 443, 444 es accionado por un accionador correspondiente. En uso, el cartucho 401 se coloca con el elemento de cubierta al menos parcialmente flexible 403 orientado hacia los accionadores y los miembros de accionador. Cada miembro de accionador se corresponde espacialmente con una localización diferente de la red microfluídica del cartucho 401. Por ejemplo, el miembro de accionador 442 corresponde al orificio 414 que conduce al pocillo 407 por medio del canal 411 y el orificio 415. Cuando se acciona, el miembro de accionador 442 comprime la tapa al menos parcialmente flexible 403 que está superpuesta al orificio 414, obstruyendo de este modo el orificio 414 y evitando el paso de fluido a lo largo del mismo. Otros miembros de accionador corresponden de forma similar a otras estructuras. Por ejemplo, los miembros de accionador 443 y 444 corresponden, respectivamente, a los orificios 415 y 416. El accionamiento de los miembros de accionamiento 415, 416 sella el segundo pocillo 407, permitiendo, por ejemplo, que se realicen múltiples ciclos de calentamiento y enfriamiento sin una pérdida significativa de líquido en el mismo.

Para un accionamiento ejemplar del miembro de accionador 442, la unidad de control envía una señal a la unidad de válvula. La unidad de válvula abre la conexión neumática 436 al accionador 438, aplicando una presión al accionador 438. Por tanto, el miembro de accionador 442 se mueve hacia fuera y comprime la cubierta al menos parcialmente flexible 403 que está superpuesta al orificio 414. Para liberar el miembro de accionador, la unidad de control envía una señal respectiva a la unidad de válvula. La unidad de válvula cierra la conexión neumática que llega al accionador 438, haciendo retroceder de este modo el miembro de accionador 442 y liberando la cubierta al menos parcialmente flexible 403 que está superpuesta al orificio 414.

El miembro de accionador se puede adaptar para deformar elásticamente la primera cubierta flexible 403 para realizar diversas tareas. Por ejemplo, como se describe anteriormente, el miembro de accionador 442 está adaptado para comprimir la tapa al menos parcialmente flexible 403 que está superpuesta al orificio 414, obstruyendo de este modo el orificio 414 y evitando el paso de fluido a lo largo del mismo mientras que el miembro de accionador 441 está adaptado para mover un líquido dentro del pocillo 408 presionando repetidamente y liberando la primera cubierta flexible que está superpuesta al pocillo 408.

En un modo de realización, un miembro de accionador puede ser un elemento que se puede mover para abrir o cerrar selectivamente las estructuras individuales de la red microfluídica por fuerzas mecánicas. Por ejemplo, dicho miembro de accionador puede ser un pasador o una plantilla que se puede presionar contra un elemento de cubierta flexible para presionar este último sobre una superficie del sustrato, abriendo o cerrando selectivamente de este modo los canales.

40 En algunos modos de realización, la punta del elemento de accionador 441, 442, 443, 444 está hecha de un material elástico tal como silicona, goma o similar. El diámetro de los miembros de accionador 442, 443 y 444 puede ser 1,5 veces el diámetro de los orificios 414, 415 y 416. Un diámetro típico para los orificios 414, 415 y 416 es 0,5 mm.

45 Como se describe anteriormente, se proporciona una unidad de válvula neumática 435 que está acoplada a los accionadores 437-440. La unidad de válvula 435 recibe señales de accionamiento desde una unidad de control 471. Por tanto, la unidad de control 471 controla el funcionamiento de los miembros de accionador 441-444.

50 La unidad de control 471, tal como un microprocesador, está provista y adaptada para controlar un análisis de una muestra fluidica de tal manera que las moléculas diana de las muestras fluidicas se capturen en los miembros de unión 406. La unidad de control 471 controla además una amplificación de las moléculas diana en el pocillo central 407. Además, la unidad de control 471 controla una detección de compuestos indicativos de la presencia y/o la cantidad de las moléculas diana y capturadas en los miembros de unión 417. Todos los procedimientos de acoplamiento en fase sólida durante un análisis de las moléculas diana se producen en los miembros de unión 406 en el pocillo central 407. En particular, no se producen procedimientos de acoplamiento en fase sólida en el pocillo de lisis 408.

55 En un modo de realización, una unidad de control puede ser un componente electrónico que puede controlar la función de otros uno o más componentes del dispositivo, y que puede coordinar en particular la función de los componentes individuales. En la unidad de control, un código o un algoritmo se puede almacenar o puede ser definido por un usuario en un programa informático, en hardware o en forma híbrida (es decir, que comprende componentes de un programa informático y hardware), de manera que pueda realizar un análisis, experimento o ensayo específico. En particular, dicha unidad de control puede incluir un procesador que tenga capacidad de procesamiento (opcionalmente que también tenga capacidad de almacenamiento) y que esté configurado para realizar un protocolo experimental específico. En particular, dicha unidad de control puede ser un microprocesador o una CPU (unidad central de procesamiento).

La temperatura de los fluidos en el pocillo central 407 se puede manipular mediante una unidad de manipulación de temperatura que comprende un enfriador neumático 453, un sensor de temperatura (no mostrado) y una placa de calentamiento y/o enfriamiento 451 dispuestos cerca de una superficie superior del sustrato 402, y una segunda placa de calentamiento y/o enfriamiento anular 451 que tiene un rebajo central 459 para permitir una detección óptica de moléculas en el pocillo central 407. En algunos modos de realización, las placas de calentamiento y/o enfriamiento comprenden un sensor de temperatura para ajustar la temperatura de las placas de calentamiento y/o del segundo pocillo. La unidad de control 471 puede controlar la distribución de la temperatura de las placas 451 para manipular de este modo la temperatura de los líquidos en la estructura central 407 (por ejemplo, de acuerdo con una secuencia de temperaturas para realizar una reacción en cadena de la polimerasa, para amplificar las moléculas diana durante el análisis). En particular, la unidad de manipulación de temperatura 451 tiene la capacidad de elevar la temperatura de los líquidos situados en el pocillo central 407 hasta 95 °C.

Los elementos o placas de calentamiento/enfriamiento 451 se pueden montar de manera flexible. El montaje flexible puede ser un montaje flexible de todo el elemento de calentamiento/enfriamiento. Un marco que soporta el elemento de calentamiento/enfriamiento 451 puede estar articulado, por ejemplo, a una estructura de vehículo, de modo que la articulación permita la posición flexible de todo el elemento de calentamiento/enfriamiento 451.

De forma alternativa o además, el montaje flexible también puede ser una flexibilidad del elemento de calentamiento/enfriamiento 451 como tal. Esto se puede lograr, por ejemplo, mediante una capa flexible, comprendiendo dicha capa la fuente de calentamiento/enfriamiento/drenaje. Se puede proporcionar cualquier tipo de accionador detrás de la capa flexible para accionar la capa del elemento de calentamiento/enfriamiento. Dicho accionador puede ser, por ejemplo, una almohada neumática inflable. Sin embargo, la capa flexible también se puede proporcionar con un miembro elástico en el lado posterior que permite una adaptación flexible cuando se presiona contra la estructura.

Por tanto, al montar de manera flexible al menos uno de los elementos de calentamiento/enfriamiento, se puede llevar a cabo una transición térmica eficiente, ya que el elemento de calentamiento/enfriamiento flexible 451 se puede adaptar de manera flexible a la estructura o al dispositivo de sonda.

El elemento de calentamiento/enfriamiento 451 puede ser un elemento de calentamiento/enfriamiento completo flexible combinado 451 y flexible como dicho elemento de calentamiento/enfriamiento 451.

De hecho, también se pueden montar de manera flexible dos elementos de calentamiento/enfriamiento 451. Los dos elementos de calentamiento/enfriamiento se pueden disponer en forma de mariposa para intercalar el dispositivo de sonda. De la misma manera, un único elemento de calentamiento/enfriamiento 451 se puede disponer con una placa de contador de presión. Esto puede evitar arañazos al insertar el dispositivo de sonda, en particular cuando los elementos de calentamiento/enfriamiento 451 se moverán hacia las superficies del dispositivo de sonda después de que el dispositivo de sonda haya alcanzado su posición final.

Entre el sustrato 402 y el elemento de cubierta 404, se proporciona una interfase de fluido 418 que permite la inserción de líquidos tales como agua o tampones o gases tales como aire en el sistema microfluídico por medio del canal 410 y el orificio 413. Se puede proporcionarse otra interfase 482 que permita insertar una muestra 481 en el sistema microfluídico.

En algunos modos de realización, el sustrato 402 es, al menos parcialmente, ópticamente transparente para permitir de este modo una detección óptica basada en radiación de los componentes en el pocillo central 407, como se explicará a continuación.

Un sistema detector 455 que comprende una fuente de luz óptica (no mostrada) tal como un diodo láser está adaptado para generar un haz de radiación electromagnética que incide a través del rebajo 459 en el segundo elemento de calentamiento 451 en la cámara central 407. En presencia de marcadores de fluorescencia en esta cámara 407, se genera un haz de luz electromagnética secundario que se puede propagar a través del rebajo 459 en el segundo elemento de calentamiento 451 y se puede detectar por un detector (no mostrado) en el sistema detector 455 tal como un fotodiodo. Se puede proporcionar a la unidad de control 471 una señal de detección del sistema detector 455 indicativa de la concentración de las moléculas diana para un procesamiento adicional por medio de la interfase de la unidad de control 456. Por tanto, como se puede tomar de la FIG. 17, la unidad de control 471 también coordina la función del sistema detector 455.

En algunos modos de realización, durante la detección, un accionador de detección 457 comprime el pocillo central para reducir la distancia entre los elementos de cubierta flexibles 403 y 404 o entre los elementos de cubierta flexibles 403 y 404 y el sustrato 402, eliminando de este modo el líquido que comprende material que no se ha unido a uno de los miembros de unión 406 o 417 de la zona de detección.

Se proporciona un suministro de líquido 461 para bombear líquidos tales como agua o tampones a través de la red microfluídica formada por los pocillos 408, 407, por los orificios pasantes 413, 414, 415, 416 y por los canales 410, 411, 412.

El transporte de líquidos a través del dispositivo 400 también se puede realizar aspirando el líquido por una presión negativa (no mostrada).

5 Se puede proporcionar un sensor óptico 464 para controlar el nivel de fluido en la cámara 408 como se explica a continuación como ejemplo. Si el pocillo 408 se va a llenar con líquido del suministro de líquido 461, la unidad de control 471 envía una señal correspondiente a la unidad de válvula 435 por medio de la interfase 446. La unidad de válvula abre una válvula para aplicar presión sobre el suministro de líquido 461 por medio de la conexión neumática 463, presionando de este modo el líquido del suministro de líquido 461 al pocillo 408 por medio de la conexión de líquido 462, el canal 410 y el orificio 413.

10 Cuando el sensor óptico 464 detecta una señal indicativa de la presencia del líquido en el pocillo 408, el sensor envía una señal a la unidad de control 471 por medio de la interfase 465. La unidad de control 471 envía a continuación una señal a la unidad de válvula 435. La unidad de válvula cierra la válvula, deteniendo de este modo la presión sobre el suministro de líquido 461, deteniendo de este modo el movimiento del líquido fuera del pocillo 408.

15 Se pueden proporcionar otros sensores ópticos para controlar los niveles de líquido en otras estructuras, tales como canales (410, 411, 412, sensores no mostrados) o pocillos (407, sensores no mostrados).

20 La muestra 481 es sangre completa no tratada. Dicha muestra puede comprender proteínas, polipéptidos, ácidos nucleicos, lípidos, carbohidratos, virus, bacterias, etc. En modos de realización, una muestra es una composición de materia que posiblemente comprende una diana.

25 Como se puede tomar de la FIG. 17, la unidad de control 471 también controla la bomba 431 por medio de la interfase 447. Se puede proporcionar un depósito 433 para aire comprimido para armonizar el procedimiento de bombeo con el rendimiento de los accionadores 437-440, del enfriador neumático 453 y con el accionador de detección 457.

30 El sistema 400 comprende además una unidad de interfase de usuario 472 que también se puede indicar como dispositivo de entrada/salida. Por medio de la unidad de interfase de usuario 472, un usuario puede definir un experimento ejecutado por el sistema 400. En otras palabras, la interfase de usuario 472 puede permitir que un usuario programe el sistema 400 para realizar un ensayo específico. Dicha interfase de usuario 472 puede comprender una interfase gráfica de usuario (GUI) que tiene una unidad de visualización tal como una LCD, un dispositivo de plasma o un tubo de rayos catódicos. Además, los elementos de entrada se pueden proporcionar en la interfase de usuario 472, tal como un teclado, un joystick, botones, una bola de desplazamiento o incluso un micrófono de un sistema de reconocimiento de voz. La interfase de usuario 472 está conectada a la unidad de control por medio de una conexión de datos.

35 40 En referencia a las fig. 17c y d, en algunos modos de realización, la unidad de válvula 435 consiste en un número (n) de válvulas individuales (2). Cada válvula está fabricada por un rotor (2.1) que comprende canales (2.3) y un estator (2.2), ambos montados consecutivamente y fijos con 4 resortes para aplicar una presión constante. Cada válvula tiene 4 orificios (a, b, c, d), a está conectado con la ventilación, b) está conectado al compresor, c) está conectado con el accionador neumático y d) está conectado al sitio de ventilación del accionador .

45 El vehículo (3) conectado a un tornillo de bola (4) que se coloca dentro del tubo. Una ranura dentro del tubo (6) permite que el vehículo se mueva. El movimiento de rotación del eje de transmisión (5) dará como resultado un movimiento del tornillo de bola y del vehículo conectado en la dirección x. Eso permite un movimiento del vehículo a la posición de cada válvula (2). El vehículo se bloqueará en el rotor (2.1).

50 Un movimiento de 90° del tubo (6) dará como resultado un movimiento de 90° del vehículo (3) y el rotor (2.1). El rotor y las cavidades en el disco del rotor abrirán o cerrarán las conexiones de la válvula. (a, b y c, d; d, a y b, c).

55 A continuación, en referencia a la FIG. 18 y la FIG. 19, se explicará un dispositivo 500 de acuerdo con otro modo de realización ejemplar.

La FIG. 18 muestra una vista frontal y la FIG. 19 muestra una vista posterior del dispositivo 500.

60 El dispositivo 500 comprende una ranura 501, formada en un sustrato 402, para insertar una cánula (no mostrada) por medio de la cual se puede suministrar una muestra al dispositivo 500. Se proporciona una cámara de lisis 502 en la que los materiales necesarios para la lisis se pueden almacenar en una forma secada. Un pocillo central 512 sirve para realizar todos los procedimientos de acoplamiento en fase sólida requeridos para hacer funcionar el dispositivo 500. Se proporcionan pocillos adicionales 504, 506, 508 y 510 en los que se proporcionan diversas sustancias adicionales en forma secada y que pueden servir para procedimientos de lavado, un procedimiento de PCR, etc. Se proporciona una cámara de residuos 514 como un pocillo en el que se pueden transportar líquidos que ya no son necesarios para el análisis.

65

Aunque no se muestra en la FIG. 18 y la FIG. 19, se puede proporcionar un material absorbente de líquido en la cámara de residuos 514 que puede absorber fluidos que entran en la cámara de residuos 514. Al adoptar esta medida, el flujo de retorno de líquidos no deseado desde la cámara de residuos 514 a otras partes del dispositivo 500 se puede evitar de manera segura para evitar de este modo cualquier contaminación. Por ejemplo, se pueden emplear polímeros hinchables (que también se pueden usar en pañales) para dicho propósito.

Como puede tomarse en particular de la FIG. 18, una pluralidad de puertos de conexión de fluido 520, 524, 521, 525, 540, 542, 544, 545, 548, 578, 580, 558, 562, 564, 560, 561, 552, 550, 516, 554, 530, 528, 532 y 526 se proporcionan conectando diversos canales, que se explicarán a continuación.

Como se puede tomar de la FIG. 19, se muestran los puertos de conexión de fluido adicionales 541, 560, 566, 519, 512. Además, una pluralidad de canales 538, 522, 518, 527, 529, 536, 572, 574, 576, 539, 562, 570, 546, 556, 568 y 534 están previstos para conectar los diversos puertos de conexión de fluido 520, 524, 521, 525, 540, 542, 544, 545, 548, 578, 580, 558, 562, 564, 560, 561, 552, 550, 516, 554, 530, 528, 532, 526, 541, 560, 566, 519 y pocillos 502, 504, 506, 508, 510 y 512. Más allá de esto, se muestra un puerto de entrada de fluido 593 por medio del cual se pueden inyectar líquidos tales como agua en el dispositivo 500. Por medio de un puerto de salida de fluido 594, se puede retirar fluido (como el aire extraído para reducir la presión) del dispositivo 500. También se muestra otro puerto de entrada/salida de fluido 597.

Se muestran una primera parte de ventana 598 accesible por una barrera de luz y una segunda parte de ventana 599 accesible por una barrera de luz que pueden servir para detectar ópticamente cuando un menisco de una columna de fluido dentro del dispositivo 500 pasa las partes de ventana transparentes 598, 599 relacionadas con el barreras de luz. Cuando una de las barreras de luz detecta que una de las cámaras correspondientes a las partes de ventana 598, 599 está llena de líquido o se desborda, esto se puede detectar ópticamente y puede servir para generar una señal de control para controlar una unidad de control (no mostrado en la FIG. 18 y la FIG. 19) para controlar el funcionamiento del dispositivo 500 de manera correspondiente.

Cuando se inserta una primera parte de una cánula en la ranura 501, se puede insertar una segunda parte de la cánula en un paciente para tomar una muestra de sangre del paciente e inyectar directamente la muestra de sangre completa en el dispositivo 500.

Aunque no se muestra en la FIG. 18 y la FIG. 19, cualquiera de los puertos de conexión de fluido 520, 524, 521, 525, 540, 542, 544, 545, 548, 578, 580, 558, 562, 564, 560, 561, 552, 550, 516, 554, 530, 528, 532, 526, 541, 560, 566, 519 se puede cubrir con un elemento flexible que se puede comprimir con un pasador de accionador (no mostrado en la FIG. 18 y la FIG. 19), de modo que los pasadores pueden servir para abrir o cerrar selectivamente cualquiera de los puertos de conexión de fluido 520, 524, 521, 525, 540, 542, 544, 545, 548, 578, 580, 558, 562, 564, 560, 561, 552, 550, 516, 554, 530, 528, 532, 526, 541, 560, 566, 519, cumpliendo de este modo una función de válvula.

Aunque no se muestra en la FIG. 18 y la FIG. 19, cualquiera de los pocillos 502, 504, 506, 508, 510 y 512 puede estar cubierto por un elemento flexible que se puede comprimir por un pasador de accionador (no mostrado en la FIG. 18 y la FIG. 19), de modo que los pasadores pueden servir para presionar selectivamente en los pocillos 502, 504, 506, 508, 510 y 512, sirviendo de este modo como mezcladores o bombas.

Como se puede tomar de la FIG. 18, un componente 587 que forma el pocillo central 512 es un miembro de plástico moldeado que se puede insertar en las ranuras 585, 583 del sustrato 402. Este miembro de plástico 587 puede estar modelado o estructurado desde ambos lados de modo que se formen los componentes 590, 591, 578, 548, 580, 558, etc.

A continuación, se explicará un ensayo realizado en el dispositivo 500, en particular basado en el pocillo central 512, que puede permitir realizar una determinación de la carga de VIH de una manera rápida, por ejemplo, en menos de una hora.

Dentro de la cámara central 512, se pueden proporcionar microesferas. Estas microesferas se pueden configurar para capturar moléculas diana (por ejemplo, ARN del VIH) de una muestra previamente lisada. Por ejemplo, las microesferas se pueden configurar para unirse a un grupo de anclaje de una molécula de captura para unir complejos que comprenden un polinucleótido diana y la molécula de captura, en los que la molécula de captura comprende una parte de unión específica para una región del polinucleótido diana y el grupo de anclaje.

El número de referencia 541 indica una conexión a aire presurizado (véase la flecha en la FIG. 19) para que el aire presurizado pueda pasar a través de los elementos 538, 518, 516 y entre en el pocillo 502. Por tanto, es posible bombear el pocillo 502 vacío usando aire presurizado. En caso de que una muestra de sangre suministrada por medio de la ranura 501 se deba diluir con agua, dicha agua se puede suministrar por medio del puerto de entrada de fluido 593.

En un modo de realización, una muestra de sangre completa (o cualquier otra muestra) se puede transportar en el pocillo 502, por ejemplo para lisis. La sangre se puede empapar al dispositivo 500 comprimiendo en primer lugar la cámara, aplicando la sangre a un capilar, el capilar en contacto con la cámara de lisado 502, y a continuación liberar la cámara de lisado 502 empapando de este modo la sangre al dispositivo 500.

5 Para este propósito, los correspondientes agentes de lisis como se describe anteriormente se proporcionan en forma secada en el pocillo de lisis 502. El pocillo de lisis puede comprender además las moléculas de captura que comprenden cada una un grupo de anclaje y una parte de unión específica para una región del polinucleótido diana. La muestra que ahora puede comprender complejos, cada uno de los cuales comprende un polinucleótido diana y una molécula de captura, se puede transportar a continuación por medio de los componentes 554, 556 (por medio de aire presurizado) al componente 558. En este escenario, el componente 552 está cerrado por un accionador correspondiente. Por medio de los componentes 558, 580, la muestra se puede transportar al pocillo central 512. Para este propósito, las ranuras 591, 590 del pocillo central 512 pueden estar equipadas con filtros tales como fritas (no mostradas en la FIG. 18 y la FIG. 19), lo que evita que las microesferas en el pocillo central 502 se retiren de este pocillo 502 por la influencia de la fuerza de la corriente de los fluidos. Por tanto, por medio del filtro o la frita en las ranuras 591, 590, la muestra lisada se puede transportar por medio del componente 576 al pocillo central 512.

En el pocillo central 512, se puede proporcionar un primer miembro de unión, tal como microesferas o una funcionalización de la superficie, de modo que las dianas o complejos que comprenden un polinucleótido diana y una molécula de captura se puedan unir a las estructuras de captura de sólidos en la cámara central 512. Se puede realizar una incubación para que las microesferas se mezclen correctamente con el material de la muestra.

Una corriente de aire presiona el líquido (es decir, los componentes no capturados de la muestra lisada) del pocillo central 512 por medio de los componentes 558, 560, 561 al residuo 514. Por tanto, muchos de los componentes de la muestra que no han sido capturados por las microesferas en el pocillo central 512 se transportan a la cámara de residuos 514. Por tanto, solo las dianas permanecen en el pocillo central 512, y el resto de la muestra de sangre completa ahora se encuentra en el residuo 514. Por tanto, el pocillo central 512 ahora alberga las microesferas conjuntamente con complejos que comprenden sondas de captura y dianas.

30 Posteriormente, el pocillo central 512 se puede lavar, en el que los componentes para un tampón de lavado proporcionado de manera sólida en un pocillo de lavado 504 se usan para producir un tampón de lavado. Dicho procedimiento de lavado puede ser ventajoso ya que, después del procedimiento de captura, todavía pueden estar presentes algunas impurezas en la cámara 502, en particular cuando se usa una muestra de sangre completa o la muestra se suministra por medio de una cánula insertada en la ranura 501.

35 El líquido de lavado se puede bombear, por la influencia de la presión del aire, por medio de los componentes 541, 540, 542, 546, 548, 578, 591, 574, 512.

40 Como ya se ha indicado anteriormente, se prepara un tampón de lavado en el pocillo de lavado 504. En el pocillo de lavado 504, las sales para dicho tampón de lavado pueden estar presentes en forma secada. Para preparar el tampón de lavado, el agua se puede transportar desde el componente 566 por medio de los componentes 564, 562, 570, 552 (mientras que el componente 554 está cerrado), 527 (los componentes 532, 525, 530 están cerrados), de modo que se suministre agua al componente 521 (abierto). Se puede bombear agua en el pocillo de lavado 504 hasta que una ventana transparente acoplada al componente 520 se llene de agua, lo que se puede detectar al detectar un menisco que pasa la barrera de luz adyacente a la ventana transparente junto al componente 520. Al recibir una señal de detección correspondiente, se puede poner fin al suministro de agua.

50 Un accionador (no mostrado) puede, a continuación alternar hacia arriba y hacia abajo para comprimir un elemento de cubierta flexible que cubre el pocillo de lavado 504 para realizar la mezcla para disolver las sales proporcionadas en el mismo.

Los canales llenos de agua se pueden vaciar a continuación mediante un control correspondiente de las diversas válvulas y suministrando aire presurizado, de modo que el agua se pueda bombear hacia la cámara de residuos 514.

55 El tampón de lavado preparado en el pocillo de lavado 504 se puede presionar a continuación al pocillo central 512 de modo que se pueda realizar un procedimiento de lavado en el pocillo central 512. Después de este lavado, la solución de lavado se puede ser bombear en la cámara de residuos 514.

60 A continuación, se puede realizar una transcripción inversa para convertir el ARN diana en un ADN correspondiente. Dicho procedimiento es específicamente necesario en caso de detectar *Retroviridae* tal como el VIH, y puede ser prescindible en otros casos, por ejemplo, cuando se detectan virus de ADN. Para realizar dicha transcripción inversa, los componentes necesarios para la transcripción inversa, como un cebador, una enzima y un tampón, se pueden bombear desde un pocillo de transcripción inversa 508 al pocillo central 512.

Opcionalmente, los componentes en el pocillo de transcripción inversa 508 también pueden comprender otro conjunto de moléculas de captura adicionales que pueden tener la capacidad específica de capturar moléculas de ADN en el pocillo central 512 producido durante la transcripción inversa.

5 Dado que, después de la transcripción inversa, el ADN diana no permanece en las microesferas de la cámara 512, el transporte de la solución al recipiente de residuos 514 reduciría la cantidad de muestra. Para este propósito, la muestra se bombea ahora desde el pocillo central 512 al pocillo de PCR 510, y puede disolver las sales de PCR dentro de esta muestra, en la que el tampón de PCR en el pocillo de PCR 510 puede comprender polimerasas, moléculas indicadoras capaces de formar complejos con el polinucleótido diana, cebador y/o tampón. De forma  
10 alternativa, el tampón de transcripción inversa contiene moléculas de captura dirigidas a las hebras de ADN sintetizadas y la captura de estas hebras tiene lugar de la misma manera que la captura inicial de los ácidos nucleicos del VIH. Después de esto, la muestra se puede bombear nuevamente al pocillo central 512.

15 Sin embargo, la amplificación por PCR real se realiza en el pocillo central 512. Para este propósito, se realiza una PCR en el pocillo central 512 realizando un ciclo de temperatura, es decir, repitiendo, por ejemplo, 40 veces un procedimiento con 5 s a 95 °C y 10 s a 60 °C. En otro modo de realización, se puede realizar un ciclo de temperatura que comprende 3 o más temperaturas diferentes, por ejemplo, que comprende 30 ciclos de 20 s a 95 °C, 30 s a 55 °C y 30 s a 72 °C. Sin embargo, también se pueden realizar otros protocolos de ciclos de PCR en la cámara central.

20 En algunos modos de realización, para ajustar la temperatura en el pocillo central 512, se pueden proporcionar dos placas de calentamiento y/o enfriamiento por encima y por debajo del pocillo central 512. En otro modo de realización, uno de los dos pocillos o placas de calentamiento y/o enfriamiento puede ser continuo y el otro puede tener un rebajo para permitir una detección óptica posterior.

25 En algunos modos de realización, el volumen de la muestra bombeada desde el pocillo de PCR 510 al pocillo central 512 puede ser tal que se incremente la presión en el pocillo central. Este aumento de presión fuerza a los elementos de cubierta flexibles del pocillo central contra las dos placas de calentamiento y/o enfriamiento, permitiendo, entre otras cosas, una transferencia térmica eficaz entre las placas de calentamiento/enfriamiento y el pocillo central.

30 En algunos modos de realización, durante la amplificación, la detección puede tener lugar como se describe anteriormente.

35 Por ejemplo, en un primer modo de realización, se puede realizar un ensayo competitivo de moléculas de captura en el pocillo central 512. Por tanto, en este modo de realización, se usa un primer miembro de unión, tal como microesferas, para capturar los complejos, comprendiendo cada uno una molécula diana y una molécula de captura, y se usa un segundo miembro de unión que comprende una matriz de moléculas de captura específicas de indicador inmovilizadas en el pocillo central 512 para la detección. El ensayo competitivo comprende la formación de complejos de un subconjunto de la cantidad de compuesto indicador con al menos un subconjunto de la cantidad de ácido nucleico diana, inhibiendo la formación de estos complejos la captura del compuesto indicador por la matriz de moléculas de captura específicas de indicador inmovilizadas en el pocillo central 512. Las moléculas de captura específicas de indicador inmovilizadas en el pocillo central 512 pueden capturar al menos un subconjunto restante de la cantidad de compuesto indicador que no está en complejo con un polinucleótido diana. Al proporcionar una matriz de diferentes tipos de moléculas de captura específicas de indicador en el pocillo 512 para la detección, es posible distinguir entre diferentes tipos de virus de la IH, por ejemplo, el VIH de tipo 1 y el VIH de tipo 2, e incluso puede ser posible distinguir entre los diferentes subtipos del virus de la IH.

45 En un segundo modo de realización, es posible usar también para la detección el mismo miembro de unión, por ejemplo, microesferas, que ya se han usado para el procedimiento de captura. En este modo de realización, un oligonucleótido de captura que está unido a las microesferas por medio de un grupo de anclaje puede hibridar con un complejo de ADN diana amplificado, que a su vez puede comprender un marcador de fluorescencia.

50 Los compuestos indicadores capturados o las moléculas diana capturadas se pueden detectar mediante una detección óptica, por ejemplo, usando la marcador de fluorescencia como se describe anteriormente. En particular, un sistema óptico que tiene una fuente de luz (no mostrada) y un detector de luz (no mostrado) se puede hacer funcionar de una manera que mida la dependencia del tiempo de la señal durante la PCR, lo que permite derivar la carga vírica del VIH. En otras palabras, se puede adquirir y evaluar la dependencia del tiempo de la señal de fluorescencia.

60 A continuación, en referencia a la **FIG. 20**, se explicará un dispositivo 600 de acuerdo con un modo de realización ejemplar.

65 El modo de realización de la FIG. 20 es similar a los modos de realización de las FIG. 18, 19, de modo que los componentes correspondientes se indican con los mismos números de referencia. Por motivos de simplicidad y claridad, los canales y los puertos de fluido no se indican con números de referencia en la FIG. 20. Para la explicación correspondiente, se hace referencia a la FIG. 18 y la FIG. 19.

La FIG. 20 muestra una parte de ventana 602 relacionada con el pocillo 504 y una parte de ventana 604 relacionada con el pocillo 506 para permitir una detección de menisco y, por lo tanto, una detección de desbordamiento como base para determinar las señales de control para controlar los accionadores que actúan en los pocillos 504, 506 y que actúan en los distintos puertos de comunicación de fluidos.

La dirección del vector de gravedad  $g$  se indica para mostrar en qué posición se puede hacer funcionar el dispositivo 600 en algunos modos de realización. En estos modos de realización, el funcionamiento del dispositivo 600 se basa en una combinación de la fuerza gravitacional y las fuerzas de transporte de líquido proporcionadas por medio de una conexión de aire presurizado 606 y una conexión de suministro de agua 608. Además, se proporcionan una conexión de ventilación 610 y una conexión de ventilación 612 para ventilar las estructuras fluidicas correspondientes.

La FIG. 20 muestra esquemáticamente una parte 613 que se puede proporcionar, como alternativa a la solución integral de la FIG. 20, como un módulo separado que se puede combinar con otros módulos para formar un dispositivo definido por el usuario en el que los distintos módulos se ensamblan juntos.

A continuación, en referencia a la **FIG. 21**, se explicará un dispositivo 700 de acuerdo con otro modo de realización ejemplar.

El dispositivo 700 comprende un sustrato rígido 704 en el que se forman un primer orificio pasante 709 y un segundo orificio pasante 707. En una primera superficie principal del sustrato 704, se forman un primer pocillo 720 y un segundo pocillo 708. En una superficie principal opuesta del sustrato 704, se forma un canal 706. El canal 706 está en comunicación fluida con los pocillos 720, 708 por medio de los orificios pasantes 709, 707, respectivamente.

Sobre una superficie superior del sustrato rígido 704, se forma un primer elemento de cubierta flexible 708 y se adhiere al sustrato rígido 704. En una superficie inferior del sustrato 704, se forma un segundo elemento de cubierta 705 y se lamina al sustrato rígido 704.

Como se puede ver más adelante en la FIG. 21, se proporcionan un primer elemento de accionador 701 y un segundo elemento de accionador 702, estando adaptado el primer elemento de accionador 701 para presionar sobre una primera parte del elemento de cubierta 720 para cerrar selectivamente el canal de orificio pasante 709 o todo el pocillo 720. De una manera correspondiente, el segundo elemento de accionador 702 puede abrir o cerrar selectivamente el pocillo 708 y/o el orificio pasante 707. Por tanto, se puede controlar el flujo de un fluido a través del canal 706 en uno o ambos pocillos 720 o 708.

La **figura 22** representa una ilustración esquemática de un ensayo competitivo ejemplar de acuerdo con la presente invención. Una molécula indicadora de ácido nucleico marcada (que se muestra como una línea sinuosa gris) se une por medio de una molécula de captura de ácido nucleico (que se muestra como una línea sinuosa negra) en un miembro de unión (ejemplificado como una microesfera en el presente documento). El ácido nucleico diana que se va a detectar está presente en la muestra en forma de doble hebra (las dos hebras se muestran como líneas sinuosas de color gris claro/negro). Someter la muestra a un paso de desnaturalización (de una reacción de amplificación cíclica) permite que las hebras del ácido nucleico diana se disocien y la molécula indicadora se libere del miembro de unión. Durante la etapa de hibridación posterior, se permite que un subconjunto de la cantidad de molécula indicadora forme complejos con al menos un subconjunto de la cantidad del ácido nucleico diana, en la que la formación de complejos de ácido nucleico diana/molécula indicadora inhibe la capacidad de que la molécula indicadora sea capturada en el miembro de unión debido a una competencia de la molécula de captura y la diana de ácido nucleico por unirse a la molécula indicadora. Se permite que el subconjunto restante de la cantidad de compuesto indicador que no está en complejo con un ácido nucleico diana se recapture en el miembro de unión. En esta etapa, se determina un valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de compuesto indicador capturado en el miembro de unión, y en base a ello un valor indicativo de la presencia y/o la cantidad del ácido nucleico diana, detectando una señal generada por el marcador comprendido en la molécula receptora. Consecutivamente o concomitantemente a la etapa de hibridación, se realiza la etapa de extensión de la reacción de amplificación. A continuación, se puede someter la muestra a otro ciclo de amplificación.

La **figura 23** muestra los resultados de un ensayo competitivo ejemplar de acuerdo con la presente invención para determinar la cantidad de ADN del poliovirus humano 1 (designado como "EV" para "ADN de enterovirus") en una muestra en comparación con un ensayo estándar Taq-man realizado con la misma diana. Dos muestras, cada una con  $10^4$  copias de ADN, se analizaron en paralelo: la primera muestra ("sonda" de marcador en el diagrama) se sometió a amplificación por PCR usando un analizador de PCR giratorio en tiempo real Rotor-Gene 6000 (Corbett Life Sciences, Sydney, Australia) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El cebador de PCR empleado dio como resultado la amplificación de un fragmento de ADN de 150 pb. La detección del fragmento se realizó por medio de la llamada sonda Taqman® que comprende un marcador de 6-carboxi-fluoresceína (FAM) en su extremo 5' y un marcador de 6-carboxitetrametilrodamina-succinimidilester (TAMRA) en su extremo 3', respectivamente (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EE. UU.). En total, se realizaron 50 ciclos de PCR. La segunda muestra ("ensayo competitivo") incluyó adicionalmente una molécula indicadora que tenía la misma secuencia de nucleótidos que la

sonda Taqman® pero comprendía un marcador de carbocianina CY3 (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EE. UU.) en su extremo 3' en lugar de los marcadores FAM/TAMRA y se amplificó usando un dispositivo de acuerdo con un modo de realización de la presente invención. Las señales de fluorescencia obtenidas detectadas durante la amplificación se muestran en el diagrama.

5 La **figura 24** ilustra el principio y muestra los resultados de un ensayo competitivo ejemplar basado en una matriz de acuerdo con la presente invención para determinar la cantidad de un producto de PCR gag/env de VIH en una muestra. La **FIG. 24A** ilustra esquemáticamente el principio del ensayo (consúltese también la figura 22). Inicialmente, no está presente ningún producto de PCR amplificado, es decir, ácido nucleico diana. Las moléculas  
10 indicadoras fluorescentes marcadas de ácido nucleico están unidas a sondas específicas de indicador capturadas en el sustrato de una matriz. Si no se produce ningún producto de PCR, la cantidad de molécula indicadora que hibrida con las sondas específicas de indicador permanece constante después de cada ciclo de la reacción de amplificación y, por tanto, la señal de fluorescencia determinada también permanece constante. Si se sintetiza un producto de PCR, la cantidad de molécula indicadora que hibrida con las sondas específicas de indicador disminuye después de cada ciclo de PCR y, como resultado, la señal de fluorescencia determinada disminuye en consecuencia. La **FIG. 24B** muestra los resultados de un ensayo competitivo basado en matrices para determinar la cantidad de un producto de PCR gag/env del VIH1 de 151 pb. Se sometieron a 36 ciclos de amplificación por PCR diferentes cantidades de fragmentos (correspondientes a  $10^4$ - $10^6$  copias) junto con una molécula indicadora ("anti\_cdso29\_5'CY3") que comprendía en su extremo 5' un marcador de carbocianina CY3 (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EE. UU.). Se capturaron dos tipos diferentes de moléculas de sonda, una no específica ("ara\_54986\_NH2") y una específica de indicador ("cdso29\_NH2"), en un sustrato de matriz en una disposición como se muestra en la FIG. 25A y dispuesto dentro de la cámara de reacción del dispositivo de ensayo empleado. Los valores de CT ("umbral"; es decir, una medida para el inicio de la fase de amplificación exponencial, donde el aumento de la fluorescencia y, por tanto, la cantidad de ADN se produce de manera lineal) se determinaron usando el programa informático Iconoclust (Clondiag Chip Technologies GmbH, Jena, Alemania) y se representaron gráficamente frente a las respectivas concentraciones de ADN empleadas para generar una curva de calibración (**FIG. 24C**). En todas las muestras que emplean la sonda específica de receptor, se observó una disminución progresiva de la intensidad de la fluorescencia a medida que se incrementaba el número de ciclos de PCR. Por el contrario, en la muestra que usa la sonda no específica no se observó fluorescencia (FIG. 24B).

15 La **figura 25** representa la matriz empleada en el ensayo mostrado en la FIG. 24 en diferentes etapas de la amplificación por PCR. La disposición de los diferentes puntos en el sustrato de matriz se ilustra esquemáticamente en la **FIG. 25A**. Los círculos negros indican puntos (cuatro muestras paralelas), donde se usó la sonda específica (consúltese la FIG. 24) para capturar las moléculas indicadoras, mientras que los círculos blancos se refieren a puntos (cuatro muestras paralelas), donde se usó la sonda no específica para capturar las moléculas indicadoras. Los círculos grises representan controles positivos, donde el marcador fluorescente se detectó en el sustrato de matriz. La **FIG. 25B** muestra fotografías de la matriz (correspondientes a las  $10^5$  copias de ADN/muestras en la FIG. 24B) que se tomaron después de los ciclos de amplificación 1, 12, 18 y 21, respectivamente. En las muestras capturadas en la matriz por medio de las moléculas de sonda específicas, se puede observar una disminución de la intensidad de la señal de fluorescencia durante el curso de la amplificación por PCR.

20 Las **figuras 26A-D** representan una ilustración esquemática de un modo de realización ejemplar del procedimiento competitivo para la detección de polinucleótidos de acuerdo con la presente invención. Como se muestra en la **FIG. 26A**, inicialmente, no está presente ningún producto de PCR amplificado, es decir, un ácido nucleico diana. Las moléculas indicadoras de ácido nucleico marcadas (mostradas como una línea sinuosa negra y designadas como indicador específico de diana/sonda) están unidas a sondas específicas de indicador capturadas en el sustrato de una matriz. La señal corresponde a la de las moléculas de control interno marcadas (mostradas como una línea sinuosa de color gris claro) que están unidas a sondas específicas de control interno capturadas en el sustrato de una matriz. Como se muestra en la **FIG. 26B**, si la PCR entra en la fase exponencial temprana, las moléculas indicadoras no solo se unen a las sondas específicas de indicador capturadas en el sustrato, sino que también se unen a la región específica de indicador del producto de la PCR. Por tanto, si se sintetiza un producto de PCR, la cantidad de molécula indicadora que hibrida con las sondas específicas de indicador capturadas en el sustrato disminuye y, como resultado, la señal determinada disminuye en consecuencia. La señal disminuye significativamente cuando la PCR está en la fase exponencial (véase la **FIG. 26C**). La señal en las sondas específicas de indicador capturadas en el sustrato permanece baja cuando la PCR alcanza la fase de meseta (véase la **FIG 26D**).

25 La **figura 27** muestra los resultados de un modo de realización ejemplar del ensayo competitivo de acuerdo con la presente invención para determinar la cantidad de subtipo B del VIH y subtipo O2 del VIH en una muestra. En el experimento subyacente a la **FIG. 27A**, solo el subtipo B del VIH estaba presente en la muestra. Se puede ver que la señal correspondiente a una molécula indicadora de ácido nucleico marcada específica para el subtipo O2 del VIH (sub O2 de VIH) permanece constante, mientras que la señal correspondiente a una molécula indicadora de ácido nucleico marcada específica para el subtipo B del VIH (sub B de VIH) disminuye significativamente después de aproximadamente 13 ciclos de la PCR (consúltese la FIG. 26). En el experimento subyacente a la **FIG. 27B**, solo el subtipo O2 del VIH estaba presente en la muestra. Se puede ver que la señal correspondiente a una molécula indicadora de ácido nucleico marcada específica para el subtipo B del VIH (sub B de VIH) permanece constante,

mientras que la señal correspondiente a una molécula indicadora de ácido nucleico marcada específica para el subtipo O2 del VIH (sub O2 de VIH) disminuye significativamente después de aproximadamente 25 ciclos de la PCR (consúltese la FIG. 26).

5 La **figura 28** muestra los resultados de un modo de realización ejemplar del ensayo competitivo de acuerdo con la presente invención para determinar diferentes cantidades de subtipo B del VIH en una muestra. Si está presentes  $10^6$  copias del VIH en la muestra, la señal correspondiente a una molécula indicadora de ácido nucleico marcada específica para el subtipo B del VIH (sub B de VIH) disminuye significativamente después de aproximadamente 13 ciclos de la PCR (véase la **FIG. 28A**). Si está presentes solo  $10^4$  copias del VIH en la muestra, la señal correspondiente a una molécula indicadora de ácido nucleico marcada específica para el subtipo B del VIH (sub B de VIH) disminuye significativamente después de aproximadamente 19 ciclos de la PCR (véase la **FIG. 28B**). Es evidente a partir de la figura 28 que la cantidad de ciclos de PCR requeridos antes de que sea detectable una disminución en la señal permite extraer conclusiones sobre la cantidad de ácido nucleico diana presente en la muestra que se va a analizar.

15 La **figura 29** muestra los resultados de un ensayo basado en PCR (ensayo de detección del VIH COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan; Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) que determina los números de copias respectivas del ARN del VIH-1 en plasma sanguíneo y muestras de sangre completa de 52 pacientes infectados por el VIH. En resumen, se obtuvieron muestras de sangre completa de los pacientes mediante punción venosa. Se añadió EDTA a las muestras para evitar la coagulación. El plasma sanguíneo se purificó por centrifugación de las muestras de sangre completa durante 5 min a 4000 xg y la retirada de los restos celulares. Se procesaron automáticamente 1 ml de las muestras de plasma y 10  $\mu$ l de las muestras de sangre completa (mezcladas con 990  $\mu$ l de solución salina tamponada con fosfato) en los dispositivos COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan 48 (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los números de copias del virus (por ml de volumen de muestra) se calcularon automáticamente mediante el paquete de programa informático COBAS AmpliLink y se muestran como una gráfica dispersa de las muestras de sangre completa frente a las muestras de plasma. Los valores obtenidos para las muestras de sangre completa se multiplicaron por un factor de 100 para corregir los diferentes volúmenes de muestras de sangre (10  $\mu$ l de sangre completa frente a 1 ml de plasma). Para aquellas muestras de plasma sanguíneo en las que se detectaron menos de 40 copias de virus, el número de copias se calculó como se describe para la FIG. 30. Debido a la escala logarítmica, no se muestran las muestras que dan resultados negativos (es decir, 0 copias de virus por ml) en muestras de sangre o plasma.

La **figura 30** representa los resultados del ensayo mostrado en la FIG. 29 para aquellas muestras de plasma sanguíneo en las que se detectaron ninguna o menos de 40 copias de ARN del VIH-1. Los números de copias del virus (por ml de muestra) se calcularon manualmente creando una curva de calibración basada en todos los valores calculados para los respectivos números de copias/ml de muestra (es decir, el valor umbral dado en el archivo de resultados de AmpliLink obtenido).

La **figura 31** representa los resultados de otro ensayo como se muestra en la FIG. 1 que determina los números de copias respectivos del ARN del VIH-1 en muestras de plasma sanguíneo y de sangre completa de 245 pacientes infectados por el VIH (incluidos los 52 pacientes investigados en la FIG. 29).

La **figura 32** muestra la determinación de las respectivas cargas víricas en plasma y sangre completa de un paciente VIH positivo (paciente n.º 028) que recibe un tratamiento antivírico contra la infección por el VIH. Las cargas víricas se determinaron de acuerdo con el ensayo de la FIG. 29. Se recogieron muestras de sangre y plasma en diferentes días durante el tratamiento. Debido a problemas de cumplimiento (es decir, el paciente no había tomado el medicamento según lo prescrito), se observó un aumento repentino de la carga del VIH en las muestras de sangre completa (pero no en las muestras de plasma) aproximadamente 60 días después del inicio de la monitorización de la respuesta del paciente al tratamiento farmacológico.

La **figura 33** muestra la determinación de las respectivas cargas víricas en plasma y sangre completa de dos pacientes VIH positivos que reciben un tratamiento antivírico contra la infección por el VIH: el paciente n.º 003 (**FIG. 33A**) y el paciente n.º 004 (**FIG. 33B**). Las cargas víricas se determinaron de acuerdo con el ensayo de la FIG. 29. Se recogieron muestras de sangre y plasma en diferentes días durante el tratamiento. En ambos pacientes, se observaron cargas víricas bajas en plasma y cargas víricas relativamente altas en sangre completa. A partir de estos datos, se puede observar que el virus aún se está replicando activamente durante el tratamiento, pero que la mezcla de VIH replicante se asocia principalmente a las células y, por tanto, la carga vírica en las muestras de plasma sigue siendo muy baja.

La **figura 34** muestra la determinación de las respectivas cargas víricas en plasma y sangre completa de dos pacientes VIH positivos que reciben un tratamiento antivírico contra la infección por el VIH: el paciente n.º 009 (**FIG. 34A**) y el paciente n.º 066 (**FIG. 34B**). Las cargas víricas se determinaron de acuerdo con el ensayo de la FIG. 29. Se recogieron muestras de sangre y plasma en diferentes días durante el tratamiento. En el paciente n.º 009, la carga vírica en plasma estaba por debajo del límite de detección, pero en la sangre completa se pudo detectar el VIH (al parecer, principalmente asociado a células). En el paciente n.º 066, debido a problemas de cumplimiento (es decir, el paciente no había tomado el medicamento según lo prescrito) se observó un aumento de la carga del VIH

en las muestras de sangre completo hasta 35 días después del inicio de la monitorización de la respuesta del paciente al tratamiento farmacológico. Posteriormente, se inició otro tratamiento que dio como resultado una disminución de las cargas víricas. A pesar de que las respectivas evoluciones temporales observadas de las cargas víricas en sangre completa y en plasma fueron similares, en números absolutos, la carga vírica en las muestras de sangre completa fue en cualquier momento mayor que la de las muestras de plasma.

La **figura 35** muestra las evoluciones temporales típicas de los números de copias víricas observadas en muestras de sangre completa y plasma sanguíneo. La designación "ldl" denota el límite inferior de detección del análisis realizado. En cualquier momento, los números de copias víricas observados en las muestras de sangre completa son más altos que los números de copias respectivos de las muestras de plasma sanguíneo (consúltense "dc1" y "dc2" que designan "diferencias en el número de copias"). Sin embargo, en muchos casos, en las muestras de plasma los números de copias del virus disminuyen antes y se incrementan más tarde que en las muestras de sangre completa, respectivamente (consúltense "dt1" y "dt2" que designan "diferencias en el tiempo").

A continuación, en referencia a la **figura 36**, se explicará un dispositivo 800 de acuerdo con otro modo de realización ejemplar.

Se proporciona una cámara de lisis 802 en la que los materiales necesarios para la lisis se pueden almacenar en una forma secada. Un pocillo central 812 sirve para realizar todos los procedimientos de acoplamiento en fase sólida requeridos para hacer funcionar el dispositivo 800, así como la amplificación de la diana. Se proporcionan pocillos adicionales 804, 806 y 808 en los que se proporcionan diversas sustancias adicionales en forma secada y que pueden servir para procedimientos de lavado, un procedimiento de PCR, etc. Por ejemplo, en el estado original antes de comenzar el ensayo, el pocillo de lisis 802, el pocillo de tampón para PCR/RT 808, el pocillo de lavado 806 y el pocillo de lavado 804 contienen los agentes apropiados para la etapa respectiva del ensayo. Se proporciona una cámara de residuos 814 como un pocillo en el que se pueden transportar líquidos que ya no son necesarios para el análisis.

Aunque no se muestra en la FIG. 36, se puede proporcionar un material absorbente de líquido en la cámara de residuos 814 que puede absorber fluidos que entran en la cámara de residuos 814. Al adoptar esta medida, el flujo de retorno de líquidos no deseado desde la cámara de residuos 814 a otras partes del dispositivo 800 se puede evitar de manera segura para evitar de este modo cualquier contaminación. Por ejemplo, se pueden emplear polímeros hinchables (que también se pueden usar en pañales) para dicho propósito.

La cámara de residuos 814 puede incluir una abertura 815 para ventilar el dispositivo 800. La abertura puede estar tapada por un filtro que solo permite que pase el gas y que evita que líquidos, aerosoles y macromoléculas tales como ADN o ARN salgan del dispositivo.

Más allá de esto, se muestra un depósito de fluido 816 por medio del cual se pueden almacenar fluidos dentro del dispositivo y/o inyectarse en el dispositivo 800. En algunos modos de realización, el depósito de fluido 816 es un depósito que contiene agua u otro disolvente que puede ser necesario para el análisis, en el que el depósito tiene un volumen variable. Al bajar el volumen, por ejemplo, aplicando una fuerza externa por medio de un accionador 817, el contenido del depósito 816 se puede inyectar en el dispositivo 800. En algunos modos de realización, el depósito de fluido 816 es una cámara que está conectada a la red microfluídica por medio de un tabique (no mostrado). Antes de comenzar el análisis, la cámara se separa de forma fluidica de la red fluidica. Al iniciar el análisis, el tabique se abrirá, conectando de este modo el depósito de fluido con la red fluidica, permitiendo que el contenido del depósito, bajo una fuerza externa, se libere en los canales y pocillos del dispositivo 800.

Como puede tomarse en particular de la FIG. 36, se proporciona una pluralidad de puertos de conexión de fluido 820-826. Aunque no se muestra en la FIG. 36, cualquiera de los puertos de conexión de fluido 820-826 puede estar cubierto por un miembro flexible que puede estar comprimido por un pasador de accionador (no mostrado en la FIG. 36), de modo que los pasadores pueden servir para abrir o cerrar selectivamente cualquiera de los puertos de conexión de fluido 820-826, cumpliendo de este modo una función de válvula, por ejemplo, como se explica en la FIG. 17a y b o la FIG. 21.

Además, se prevé que una red microfluídica de una pluralidad de canales 830-837 conecte los diversos puertos de conexión de fluido 820-826 y los pocillos 802, 804, 806, 808 y 812.

Se muestran las partes de ventana 840 accesibles por barreras de luz que pueden servir para detectar ópticamente cuando un menisco de una columna de fluido dentro del dispositivo 800 pasa las partes de ventana transparentes 840 relacionadas con las barreras de luz. Cuando una de las barreras de luz detecta que una de las cámaras correspondientes a las partes de ventana 840 está llena de líquido o se desborda, esto se puede detectar ópticamente y puede servir para generar una señal de control para controlar una unidad de control (no mostrado en la FIG. 36) para controlar el funcionamiento del dispositivo 800 de manera correspondiente.

Aunque no se muestra en la FIG. 36, cualquiera de los pocillos 802, 804, 806, 808 y 812 puede estar cubierto por un elemento flexible que se puede comprimir por un pasador de accionador (no mostrado en la FIG. 36), de modo que

los pasadores pueden servir para presionar selectivamente en los pocillos 802, 804, 806, 808 y 812, sirviendo de este modo como mezcladores o bombas.

5 El número de referencia 818 indica una conexión a aire presurizado para que se pueda introducir aire presurizado en el dispositivo 800. Por ejemplo, cuando los puertos de conexión de fluido 821-824 y 826 están cerrados y los puertos de conexión de fluido 820 y 825 están abiertos, el aire presurizado puede fluir por medio de la conexión 818 al pocillo 802, por medio de la conexión 820, canal 830, el puerto de conexión de fluido 825 al pocillo 812. Por tanto, en caso de que el pocillo 802 se llene con un líquido, es posible bombear el contenido del pocillo 802 al pocillo 812 usando aire presurizado. Por ejemplo, el dispositivo puede comprender un tabique que se puede perforar para bombear aire o gas al dispositivo. Al bombear aire o gas al dispositivo, los líquidos pueden ser forzados o presionados desde los pocillos 802, 804, 806 y 808 al pocillo central 812 abriendo las válvulas respectivas o los puertos de conexión de fluido.

15 A continuación, se explicará un ensayo ejemplar realizado en el dispositivo 800, en particular basado en el pocillo central 812, que puede permitir realizar una determinación de la carga de VIH de una manera rápida, por ejemplo, en menos de una hora.

20 Dentro de la cámara central 812, se puede proporcionar un miembro de unión tal como microesferas 812a. El miembro de unión se puede configurar para capturar moléculas diana (por ejemplo, ARN y ADN del VIH) de una muestra previamente lisada. Por ejemplo, el miembro de unión se puede configurar para unirse a un grupo de anclaje, tal como biotina, de una molécula de captura para unir complejos que comprenden un polinucleótido diana y la molécula de captura, en los que la molécula de captura comprende una parte de unión específica para una región del polinucleótido diana y el grupo de anclaje. El pocillo central 812 puede estar equipado con filtros tales como fritas (no mostradas en la FIG. 36) que evitan que las microesferas en el pocillo central 812 se retiren de este pocillo por la influencia de la fuerza de la corriente de los fluidos.

25 En un modo de realización, una muestra de sangre completa (o cualquier otra muestra) se puede transportar en el pocillo 802, por ejemplo para lisis. La sangre se puede introducir o presionar en el dispositivo 800 aplicando primero la sangre a un capilar 801, estando el capilar 801 en contacto con la cámara de lisado 802, cerrando a continuación el capilar con un tapón (no mostrado), aumentando de este modo la presión dentro del capilar 801 y forzando o presionando la muestra de sangre a la cámara de lisado 802.

30 Para este propósito, los correspondientes agentes de lisis como se describe anteriormente se proporcionan en forma secada en el pocillo de lisis 802. El pocillo de lisis puede comprender además las moléculas de captura que comprenden cada una un grupo de anclaje y una parte de unión específica para una región del polinucleótido diana. La muestra que ahora puede comprender complejos, comprendiendo cada uno un polinucleótido diana y una molécula de captura, se puede transportar a continuación al pocillo central 812.

35 En el pocillo central 812, se puede proporcionar un primer miembro de unión, tal como microesferas 812a o una funcionalización de la superficie, de modo que las dianas o complejos que comprenden un polinucleótido diana y una molécula de captura se puedan unir a las estructuras de captura de sólidos en la cámara central 812. Se puede realizar una incubación para que las microesferas se mezclen correctamente con el material de la muestra.

40 El pocillo central 812 puede estar en comunicación fluida, por ejemplo, por medio de un canal 836 con otro pocillo 850 o cámara que funciona como un resorte neumático. El pocillo adicional 850, también denominado pocillo de resorte, se puede adaptar para recibir un contenido del pocillo central 812. El pocillo central 812, del cual se desplaza el contenido cuando el pocillo central 812 recibe líquidos, se conecta por medio de la red microfluidica. La sustancia de relleno, en casos normales aire, que se incluye en el pocillo central 812 antes de alojar el líquido, se puede almacenar a continuación en el pocillo de resorte 850. Se debe tener en cuenta que el resorte puede almacenar cualquier sustancia independientemente de la consistencia, es decir, líquidos y gases.

45 El pocillo 850 también se puede adaptar para acumular presión cuando se recibe un contenido del pocillo central 812. El pocillo 850 también se puede adaptar para liberar una presión de acumulación al pocillo central 812, liberando el contenido, por ejemplo, gas o aire, al pocillo central. Por tanto, el pocillo 850 puede servir como un resorte neumático, permitiendo el desplazamiento del líquido desde el pocillo central 812 a través de la válvula abierta 825. En este modo de realización, un desplazamiento activo, por ejemplo, por un suministro de aire presionado externo se puede volver superfluo, ya que la presión de acumulación en lugar de, por ejemplo, el aire presionado externo sirve para desplazar un líquido alojado del pocillo central 812.

50 Por ejemplo, cuando se llena el pocillo central 812, el aire o el gas incluido en el resorte neumático se comprimirán y la presión dentro del resorte neumático se incrementará. Por tanto, cuando se llena el pocillo central, el líquido se puede introducir a presión, por ejemplo, con una presión de 500 a 2000 mbar, por ejemplo, 800 mbar. Si se reduce la presión de llenado (por ejemplo, abriendo la válvula 825), la presión en el resorte neumático 850 será mayor que la presión de llenado, de modo que la solución insertada será expulsada o forzada fuera del pocillo central 812.

65

5 El resorte neumático 850 se puede dimensionar de modo que la presión acumulada en el mismo sea suficiente para vaciar completamente el contenido del pocillo central en el contenedor de residuos 814. Por ejemplo, el volumen del pocillo neumático 850 puede ser esencialmente tan grande como el del pocillo central 812. En algunos modos de realización, el volumen del resorte neumático es el doble o el triple del volumen del pocillo central 812 o la mitad del volumen del pocillo central 812. Por ejemplo, el volumen del pocillo de resorte neumático 850 puede estar entre 50 y 300 µl, como 100 µl, 150 µl, 200 µl o 250 µl.

10 El pocillo 850 se puede proporcionar con un canal 836 como una comunicación fluida, es decir, una comunicación de líquido o gas, entre el pocillo 850 y el pocillo central 812. El orificio del canal 836 en el lado del pocillo central se puede situar en una dirección opuesta a la dirección de la gravedad en una posición de funcionamiento normal. Esto significa que el orificio está en la parte superior del pocillo central 812 en condiciones normales de gravedad. Por tanto, se puede evitar que el líquido de alojamiento del pocillo central 812 se libere involuntariamente en el pocillo 850. El pocillo 850 puede estar en comunicación fluida con el pocillo central 812 por medio de una red microfluídica. Por tanto, el pocillo 850 puede servir como un depósito de presión o un resorte de gas a presión y se puede situar a 15 distancia de la segunda estructura.

De acuerdo con un modo de realización ejemplar, se proporciona un dispositivo de detección 840, por ejemplo, una barrera de luz, entre el pocillo central 812 y el pocillo 850, estando adaptado dicho dispositivo de detección 840 para 20 detectar la presencia de un líquido de alojamiento alojado en el pocillo central 812. El dispositivo 840 puede estar en cualquier lugar de la conexión de fluido entre el pocillo central 412 y el pocillo 850.

Al liberar la presión acumulada en el pocillo de resorte 850 (por ejemplo, al abrir los puertos de conexión de fluido 825 y 826), el líquido (es decir, los componentes no capturados de la muestra lisada) se empuja o presiona desde el pocillo central 812 hacia el residuo 814. Por tanto, los componentes de la muestra que no han sido capturados por 25 las microesferas en el pocillo central 812 se transportan a la cámara de residuos 814. Por tanto, solo las dianas permanecen en el pocillo central 812, y el resto de la muestra de sangre completa ahora se encuentra en el residuo 814. Por tanto, el pocillo central 812 ahora alberga las microesferas conjuntamente con complejos que comprenden sondas de captura y dianas.

30 Posteriormente, el pocillo central 812 se puede lavar, en el que los componentes para un tampón de lavado proporcionado de manera sólida en un pocillo de tampón de lavado 804 se usan para producir un tampón de lavado. Dicho procedimiento de lavado puede ser ventajoso ya que, después del procedimiento de captura, algunas impurezas pueden estar todavía presentes en la cámara 812.

35 Como ya se ha indicado anteriormente, se prepara un tampón de lavado en el pocillo de tampón de lavado 804. En el pocillo de lavado 804, las sales para dicho tampón de lavado pueden estar presentes en forma secada. Para preparar el tampón de lavado, el agua del depósito de líquido 816 se puede transportar por medio de los canales 830, 833 y el puerto de conexión de fluido 821 (mientras que los puertos de conexión de fluido 820, 822, 823, 825 y 826 están cerrados) al pocillo de lavado 804 hasta una ventana transparente 840 acoplada al componente 821 se 40 llena con agua, lo que se puede detectar al detectar un menisco que pasa la barrera de luz adyacente a la ventana transparente junto al pocillo 804. Al recibir una señal de detección correspondiente, se puede poner fin al suministro de agua.

45 En algunos modos de realización, un accionador (no mostrado) puede, a continuación alternar hacia arriba y hacia abajo para comprimir un elemento de cubierta flexible que cubre el pocillo de lavado 804 para realizar la mezcla para disolver las sales proporcionadas en el mismo.

El tampón de lavado preparado en el pocillo de lavado 804 se puede bombear al pocillo central 812 aplicando una presión por medio de los componentes 818, 831, 804, 821, 833, 830, 825 para que se pueda realizar un procedimiento de lavado en el pocillo central 812. Al bombear el contenido del pocillo 804 al pocillo 812, se 50 incrementa la presión en el pocillo 850. Después de este lavado, la solución de lavado se puede bombear a la cámara de residuos 814 liberando la presión del pocillo 850, por ejemplo, como se describe anteriormente.

55 A continuación, los tampones en los pocillos 806 y 808 se pueden preparar y transferir dentro y fuera de la cámara 812 por igual.

A continuación, se puede realizar una transcripción inversa seguida de PCR para convertir el ARN diana en un ADN correspondiente y, posteriormente, amplificar el ADN. Dicho procedimiento es específicamente necesario en caso de detectar *Retroviridae* como el VIH, y la etapa de transcripción inversa puede ser prescindible en otros casos, por 60 ejemplo, cuando se detectan virus de ADN. Para realizar dicha PCR con transcripción inversa, los componentes necesarios para la transcripción inversa, como un cebador, una enzima y un tampón, se pueden bombear desde un pocillo de RT/PCR 808 al pocillo central 812.

65 La amplificación por PCR se realiza en el pocillo central 812. Para este propósito, se realiza una PCR en el pocillo central 812 realizando un ciclo de temperatura, es decir, repitiendo, por ejemplo, 40 veces un procedimiento con 5 s a 95 °C y 10 s a 60 °C. En otro modo de realización, se puede realizar un ciclo de temperatura que comprende 3 o

más temperaturas diferentes, por ejemplo, que comprende 30 o 40 ciclos de 20 a 95 °C, 30s a 55 °C y 30 s a 72 °C. Sin embargo, también se pueden realizar otros protocolos de ciclos de PCR en la cámara central.

5 En algunos modos de realización, para ajustar la temperatura en el pocillo central 812, se pueden proporcionar dos placas de calentamiento por encima y por debajo del pocillo central 812. En otro modo de realización, uno de los dos pocillos de calentamiento puede ser continuo y el otro puede tener un rebajo para permitir una detección óptica posterior. En algunos modos de realización, las placas de calentamiento son placas de calentamiento y/o enfriamiento, tales como elementos Peltier.

10 En algunos modos de realización, durante la amplificación, la detección puede tener lugar como se describe anteriormente.

15 Por ejemplo, en un primer modo de realización, se puede realizar un ensayo competitivo de moléculas de captura en el pocillo central 812. Por tanto, en este modo de realización, se usa un primer miembro de unión, tal como microesferas, para capturar los complejos, comprendiendo cada uno una molécula diana y una molécula de captura, y se usa un segundo miembro de unión que comprende una matriz de moléculas de captura específicas de indicador inmovilizadas en el pocillo central 812 para la detección. El ensayo competitivo comprende la formación de complejos de un subconjunto de la cantidad de compuesto indicador con al menos un subconjunto de la cantidad de ácido nucleico diana, inhibiendo la formación de estos complejos la captura del compuesto indicador por la matriz de moléculas de captura específicas de indicador inmovilizadas en el pocillo central 812. Las moléculas de captura específicas de indicador inmovilizadas en el pocillo central 812 pueden capturar al menos un subconjunto restante de la cantidad de compuesto indicador que no está en complejo con un polinucleótido diana. Al proporcionar una matriz 812b de diferentes tipos de moléculas de captura específicas de indicador en el pocillo 812 para la detección, es posible distinguir entre diferentes tipos de virus de la IH, por ejemplo, el VIH de tipo 1 y el VIH de tipo 2, e incluso puede ser posible distinguir entre los diferentes subtipos del virus de la IH.

20 En otro modo de realización, es posible usar también para la detección el mismo miembro de unión, por ejemplo, microesferas, que ya se han usado para el procedimiento de captura. En este modo de realización, un oligonucleótido de captura que está unido a las microesferas por medio de un grupo de anclaje puede hibridar con un complejo de ADN diana amplificado, que a su vez puede comprender un marcador de fluorescencia.

25 Los compuestos indicadores capturados o las moléculas diana capturadas se pueden detectar mediante una detección óptica, por ejemplo, usando la marcador de fluorescencia como se describe anteriormente. En particular, un sistema óptico que tiene una fuente de luz (no mostrada) y un detector de luz (no mostrado) se puede hacer funcionar de una manera que mida la dependencia del tiempo de la señal durante la PCR, lo que permite derivar la carga vírica del VIH. En otras palabras, se puede adquirir y evaluar la dependencia del tiempo de la señal de fluorescencia.

30 De acuerdo con un modo de realización ejemplar, el pocillo central 812 se sellará irreversiblemente antes de iniciar la PCR. Este sellado se puede realizar soldando una entrada y, si es necesario, una salida. En caso de la presencia de una tercera estructura, por ejemplo, un resorte neumático o un pocillo de resorte 850, es posible sellar solo la entrada. El sellado se puede llevar a cabo, por ejemplo, usando un pasador caliente que se presiona en la válvula 825 o en el canal, lo que provoca que el plástico se derrita y, por tanto, selle la válvula o el canal. La cámara de PCR se puede sellar, por tanto, de forma segura.

35 De acuerdo con otro modo de realización ejemplar, el pocillo central para la PCR se llena de modo que una primera o segunda cara o capa de cubierta flexible lleva a cabo una flexión convexa. Por tanto, las capas se pueden forzar o presionar contra los elementos de calentamiento/enfriamiento, permitiendo, por tanto, una transición térmica eficaz entre los elementos de calentamiento/enfriamiento y el pocillo central.

40 En algunos modos de realización, para la prueba, el capilar 801 del dispositivo se llenará de sangre. Al cubrir el capilar con una cubierta (no mostrada en la Fig. 36), la sangre se suministrará a la cámara de lisis o al pocillo de lisis. El dispositivo se insertará ahora en el detector y se iniciará el ensayo. En primer lugar, todas las cámaras o pocillos (excepto el pocillo central) se llenarán con agua. Las válvulas respectivas o los puertos de conexión de fluido se abrirán y el agua que sale del depósito 816 se bombeará a los pocillos hasta que una barrera de luz o un dispositivo de detección 840 en la sección superior del pocillo 802 señale que el pocillo 802 está lleno. El flujo de agua para el pocillo respectivo se detendrá y se llenará el siguiente pocillo. Al llenar con agua, se disolverán los agentes o reactivos secados en el pocillo respectivo. Cuando las soluciones respectivas estén listas para usar, en primer lugar, el contenido del pocillo de lisis 802 se bombeará al pocillo central 812. Para este propósito, la válvula o el puerto de conexión de fluido debajo del pocillo de lisis, así como la válvula o el puerto de conexión de fluido que conectan el pocillo central, se abrirán de modo que se establecerá una conexión de fluido entre ambos pocillos. Cuando la mezcla de lisis que contiene los ácidos nucleicos objetivo fluya al pocillo central 812, los ácidos nucleicos diana se capturarán por medio de las moléculas de captura en la matriz de unión en el pocillo central. Para incrementar la eficacia de captura de los ácidos nucleicos diana, la mezcla de lisis se bombeará al pocillo central una pluralidad de veces, moviéndose entre el pocillo central y el pocillo de lisis una pluralidad de veces. A continuación,

la solución de lisis se bombeará al recipiente de residuos usando el resorte neumático 850 como se describe anteriormente.

## **EJEMPLOS**

5

### **Ejemplo 1: Ensayo competitivo para determinar el ADN del poliovirus humano 1**

10 El principio del ensayo competitivo realizado se muestra esquemáticamente en la FIG. 22. Se usó ADN de poliovirus humano 1 aislado TCDC01-861 (número de acceso de GenBank AF538843) clonado en un vector de expresión adecuado (pCR®2.1-TOPO®, Clontech, Inc. Palo Alto, CA, EE. UU.) como molde de ADN (también designado en el presente documento como ADN de "EV" (enterovirus)).

15 Dos muestras, cada una con  $10^4$  copias de ADN, se analizaron en paralelo: la primera muestra se sometió a amplificación por PCR usando un analizador de PCR giratorio en tiempo real Rotor-Gene 6000 (Corbett Life Sciences, Sydney, Australia) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

20 La segunda muestra incluyó adicionalmente una molécula indicadora que tenía la misma secuencia de nucleótidos que la sonda Taqman® pero comprendía un marcador de carbocianina CY3 (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EE. UU.) en su extremo 3' en lugar de los marcadores FAM/TAMRA y se amplificó usando directamente en una cámara de reacción de un dispositivo de ensayo, en el que la matriz se dispuso sobre la superficie de base que se puede calentar.

Se usaron los siguientes cebadores de PCR:

25 cebador de PCR directo:

pr\_for\_EV\_02: 5'-CAAACCCAGTGATTGGCCTGTCGTAACG-3'

30 (correspondiente a las posiciones de nucleótidos 492-518 de AF538843)

cebador de PCR inverso:

pr\_rev\_EV\_01: 5'-TTCACCGGATGGCCAATCCAATTCG-3'

35 (correspondiente a las posiciones de nucleótidos 617-641 de AF538843)

Por tanto, la PCR dio como resultado la amplificación de un fragmento de ADN de 150 pb.

40 Las muestras de PCR contenían 200 nM (concentración final) cada una de los cebadores de PCR, así como el EnzymMix® y el tampón de reacción del kit de RT-PCR Ultrasense (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

45 Además, para detectar el fragmento de PCR amplificado usando el analizador giratorio de PCR ultrarrápida Rotor-Gene 6000, la muestra de PCR correspondiente contenía 100 nM (concentración final) de una sonda con doble marcado denominada Taqman® que comprende un marcador de 6-carboxi-fluoresceína (FAM) en su extremo 5' (es decir, el fluoróforo) y un marcador 6-carboxi-tetrametil-rodamina-succinimidilester (TAMRA) en su extremo 3' (es decir, el extintor), respectivamente (ambos marcadores se compraron de Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EE. UU.). La sonda tiene la siguiente secuencia:

50 HP\_EV2\_001: FAM-5'-ACCGACTACTTTGGGTGTCCGTGTTT-3'-TAMRA

(correspondiente a las posiciones de nucleótidos 536-561 de AF538843)

55 Para realizar el análisis competitivo, la muestra de PCR contenía además 20 nM (concentración final) de una molécula indicadora que tenía la misma secuencia pero un marcador diferente al de la sonda Taqman®, a saber, un marcador de carbocianina CY3 en su extremo 3' (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EE. UU.):

EV2\_02CY3: 5'-ACCGACTACTTTGGGTGTCCGTGTTT-3'-CY3

60 (correspondiente a las posiciones de nucleótidos 536-561 de AF538843)

La PCR ultrarrápida se realizó de acuerdo con el siguiente perfil de temperatura: 2 min a 94 °C y, posteriormente, 50 ciclos de 5 s a 94 °C, 30 s a 62 °C y 30 s a 72 °C.

65 Durante la PCR, las señales de fluorescencia para ambas reacciones se muestran en la fig. 23.

**Ejemplo 2: Ensayo competitivo basado en matrices para determinar el ADN de *gag/env* del VIH1**

El principio del ensayo competitivo realizado se muestra esquemáticamente en la FIG. 24A. Se usó ADN de una construcción de fusión *gag/env* del VIH1 sintética (número de acceso EMBL A06258) clonada en el sitio de restricción de endonucleasa EcoRI del vector de expresión pCR®2.1-TOPO® (Clontech, Inc. Palo Alto, CA, EE. UU.) como molde de ADN.

Además, se usaron los siguientes cebadores de PCR:

10            cebador de PCR directo:

              cdia: 5'-TGAAGGGTACTAGTAGTTCCTGCTATGTC-3'

(correspondiente a las posiciones de nucleótidos 214-232 de A06258)

15

              cebador de PCR inverso:

              cdis: 5'-ATCAAGCAGCCATGCAAATGTT-3'

20

(correspondiente a las posiciones de nucleótidos 384-405 de A06258)

Por tanto, la PCR dio como resultado la amplificación de un fragmento de ADN de 151 pb que tenía la siguiente secuencia: 5'-ATC AAG CAG CCA TGC AAA TGT TAA AAG AGA CCA TCA ATG AGG AAG CTG CAG AAT GGG ATA GAT TGC ATC CAG TCC ATG GAG GGC CTA TTG CAC CAG GCC AGA TGA GAG AAC CAA GGG GAA GTG ACA TAG CAG GAA CTA CTA GTA CCC TTC A-3'.

25

La PCR se realizó directamente en la cámara de reacción del dispositivo de ensayo, en el que la matriz se dispuso sobre la superficie de base que se podía calentar. Las muestras de PCR contenían 200 nM (concentración final) cada una de los cebadores de PCR, así como el EnzymMix® y el tampón de reacción del kit de RT-PCR Ultrasense (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EE. UU.). Para generar una curva de calibración, se usaron diferentes cantidades de molde de ADN (en 1 µl) correspondientes a 0, 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup> y 10<sup>6</sup> copias de ADN (cada una realizada por cuadruplicado).

30

Para realizar el análisis competitivo, la muestra de PCR contenía además 10 nM (concentración final) de una molécula indicadora que tenía un marcador de carbocianina CY3 en su extremo 5' (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EE. UU.):

35

anti\_cdso29\_5'CY3: CY3-5'-TCCCATTCTGCAGCTTCCTCATTGATGGT-3'

40

(complementario de la molécula de sonda cdso29\_NH2 descrita a continuación)

La PCR se realizó de acuerdo con el siguiente perfil de temperatura: 30 s a 95°C y, posteriormente, 36 ciclos de 5 s a 95°C, 30 s a 50°C y 30 s a 72 °C.

45

La interacción de la molécula indicadora con los dos tipos de sondas se determinó en cada ciclo al final de la etapa de hibridación usando un sistema de detección óptica situado opuesto a la superficie superior del dispositivo de ensayo y el paquete del programa informático Iconoclust (Clondiag Chip Technologies GmbH, Jena, Alemania). El tiempo de exposición durante la adquisición de datos fue de 2,5 s.

50

Se capturaron dos tipos diferentes de moléculas de sonda en el sustrato de matriz en una disposición como se muestra en la FIG. 25A. Los marcadores fluorescentes solos se usaron como controles positivos. Se emplearon las siguientes sondas:

              sonda no específica:

55

              ara\_54986\_NH2: 5'-ACCAGCTTTGAACCCAACAC-3'

              sonda específica de receptor:

60

              cdso29\_NH2: 5'-ACCATCAATGAGGAAGCTGCAGAAATGGGA-3'

Los valores de CT ("umbrales"), como una medida para el inicio de la fase de amplificación exponencial, donde el aumento de la fluorescencia y, por tanto, la cantidad de ADN se produce de manera lineal, se determinaron usando el programa informático Iconoclust (Clondiag Chip Technologies GmbH, Jena, Alemania) y se representaron gráficamente frente a las respectivas concentraciones de ADN empleadas para generar una curva de calibración

65

(FIG. 24C). Los valores medios de CT determinados fueron los siguientes: 22,0 en las  $10^4$  muestras de ADN/muestras; 18,5 en las  $10^5$  copias de ADN/muestras; y 15,0 en las  $10^6$  copias de ADN/muestras.

5 En todas las muestras que emplean la sonda específica de receptor, se observó una disminución progresiva de la intensidad de la fluorescencia a medida que se incrementaba el número de ciclos de PCR. Por el contrario, en la muestra que usa la sonda no específica no se observó fluorescencia (FIG. 24B).

10 La disposición de los diferentes puntos en el sustrato de matriz se ilustra esquemáticamente en la FIG. 25A. Los círculos negros indican puntos (cuatro muestras paralelas), donde se usó la sonda específica (consúltese la FIG. 24) para capturar las moléculas indicadoras, mientras que los círculos blancos se refieren a puntos (cuatro muestras paralelas), donde se usó la sonda no específica para capturar las moléculas indicadoras. Los círculos grises representan controles positivos, donde el marcador fluorescente se detectó en el sustrato de matriz.

15 La FIG. 25B muestra fotografías de la matriz (correspondientes a las  $10^5$  copias de ADN/muestras en la FIG. 24B) que se tomaron después de los ciclos de amplificación 1, 12, 18 y 21, respectivamente. En las muestras capturadas en la matriz por medio de las moléculas de sonda específicas, se puede observar una disminución progresiva de la intensidad de la señal de fluorescencia durante el curso de la amplificación por PCR que, a su vez, corresponde a un aumento concomitante de la cantidad de producto de PCR amplificado que se puede cuantificar por comparación con una curva de calibración correspondiente.

### 20 **Ejemplo 3: Determinación de la carga del VIH en muestras de sangre de pacientes VIH positivos**

25 Se obtuvieron inicialmente muestras de sangre de 52 pacientes infectados por el VIH, que fueron medicados en la ambulancia de VIH, Friedrich-Schiller-University Jena, Alemania. Los pacientes no se han agrupado de acuerdo con su sexo, edad, etiología de la infección por el VIH, síntomas clínicos, especies/subtipos del VIH presentes, enfermedades concomitantes y similares.

30 Se obtuvieron de los pacientes muestras de sangre completa de los pacientes mediante punción venosa. Se añadió EDTA en una concentración final de 5 mM a las muestras para evitar la coagulación (es decir, la formación de coágulos de sangre) de las muestras. Las muestras se almacenaron a 4 °C y se analizaron dentro de las 24 horas posteriores a la recogida de la muestra.

35 El plasma sanguíneo se purificó de las muestras de sangre completa mediante centrifugación durante 5 min a 4000 xg y la retirada de los restos celulares. 1 ml de las muestras de plasma y 10 µl de las muestras de sangre completa (mezcladas con 990 µl de solución salina tamponada con fosfato) se sometieron a un análisis adicional. Se requiere un volumen de muestra de 1 ml para realizar el ensayo del VIH COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan usado para la detección de virus (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania).

40 Las muestras de sangre completa y plasma se procesaron automáticamente en el dispositivo COBAS AmpliPrep de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, se lisaron 850 µl de las muestras en un tampón caotrópico en presencia de proteinasa K para liberar cualquier ácido nucleico. Además, se prepararon un control negativo (sin ningún ácido nucleico) y dos controles positivos, que contienen un patrón de ARN correspondiente a una carga vírica de aproximadamente 500 copias/ml y 500 000 copias/ml, respectivamente.

45 Los ácidos nucleicos presentes en las muestras se purificaron por captura no específica en partículas de sílice magnética. Después del lavado, los ácidos nucleicos se eluyeron de las partículas de sílice añadiendo 75 µl de tampón de elución. Se mezclaron 50 µl del eluido con 50 µl de la mezcla maestra COBAS TaqMan (que también comprendía cebadores de PCR específicos del VIH) y se transfirieron al dispositivo COBAS TaqMan 48 para realizar una RT-PCR cuantitativa de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

50 La carga vírica de las muestras (es decir, el número de copias de VIH/ml de muestra) normalizada con respecto a un ARN estándar añadido a cada muestra antes del inicio del procesamiento, se calculó automáticamente mediante el paquete del programa informático COBAS AmpliLink. Los valores obtenidos para las muestras de sangre completa se multiplicaron por un factor de 100 para corregir los diferentes volúmenes de muestras de sangre (10 µl de sangre completa frente a 1 ml de plasma).

55 Cabe destacar que en este análisis automático de datos solo se incluyen aquellas muestras en las que se detectaron al menos 40 copias de ARN del VIH-1, lo que representa el límite de detección del programa informático AmpliLink. Se analizó manualmente cualquier muestra que tenga menos de 40 copias de ARN del VIH-1 (es decir, de hecho, que corresponde a 40 copias de ARN del VIH-1/ml de plasma y 4000 copias de copias de ARN de VIH-1/ml de sangre completa cuando se corrigen por los diferentes volúmenes de muestra usados). Los números de copias del virus/ml de muestra se calcularon creando una curva de calibración basada en todos los valores calculados para los respectivos números de copias/ml de muestra (es decir, el valor umbral dado en el archivo de resultados de AmpliLink obtenido).

65

Los resultados obtenidos se resumen en la siguiente Tabla 1, que ilustra los números respectivos de muestras de sangre completa y plasma, en las cuales se detectaron ninguna ("negativo"), menos de 40 copias/ml (<40") y más de 40 copias/ml ("positivo") de ARN del VIH.

5 Los resultados, expresados como gráficos dispersos de los valores calculados a partir de las muestras de sangre completa frente a los calculados a partir de las muestras de plasma correspondientes, también se muestran en las FIG. 30 y 31. En particular, la FIG. 29 ilustra los resultados obtenidos por el análisis automático de datos realizado por el programa informático AmpliLink, mientras que la FIG. 30 muestra los resultados obtenidos mediante el cálculo manual para esas muestras de plasma y sangre completa, en las cuales se detectaron no menos de 40 copias de ARN del VIH.

**TABLA 1**

Número de muestras		10 µl de sangre completa		
		negativo	<40	positivo
1 ml de plasma	negativo	13	8	6
	<40	3	8	8
	positivo	0	4	18

15 A partir de los resultados obtenidos, se hace evidente que el uso de muestras de plasma para detectar el VIH puede dar lugar a resultados falsos negativos. La carga de virus en las muestras de plasma en varios de los pacientes infectados por el VIH analizados fue negativa, lo que sugiere la ausencia de cualquier partícula de infección por el VIH circulante en la circulación sanguínea, aunque en las muestras de sangre completa correspondientes se podía detectar ARN del VIH en un número considerable de copias.

20 Estos resultados se corroboraron en un análisis posterior que comprendió un colectivo de 245 pacientes infectados por el VIH (incluyendo los 52 pacientes investigados en el primer análisis). El ensayo se realizó como se describe anteriormente. Los resultados obtenidos, expresados como una gráfica dispersa, se muestran en la FIG. 31 y también se resumen en la siguiente Tabla 2.

**TABLA 2**

Muestras analizadas	número total	negativo	positivo <40
1 ml de plasma	245	109 (44 %)	42 (17%)
10 µl de sangre completa	245	50 (20%)	36 (15%)

30 Un 61 % de las 245 muestras de plasma analizadas fueron VIH negativas o contenían menos de 40 copias de ARN del VIH-1 (es decir, de hecho, correspondientes a 40 copias de ARN del VIH-1/ml de plasma y 4000 copias de copias de ARN del VIH-1/ml de sangre completa cuando se corrigen por los diferentes volúmenes de muestra usados), mientras que esta parte representa solo un 35 % de las 245 muestras de sangre completa analizadas. En otras palabras, en 65 (43 %) pacientes cuyas muestras de plasma comprendida ninguna o menos de 40 copias de ARN del VIH-1, las muestras de sangre completa correspondientes eran, de hecho, VIH positivas (es decir, se podían detectar más de 40 copias de ARN del VIH-1).

35 Es tentador especular que esta mezcla "adicional" del VIH es atribuible principalmente a las partículas de VIH que se adhieren a glóbulos sanguíneos tales como neutrófilos, linfocitos B, plaquetas y eritrocitos (consúltese el análisis en la sección de antecedentes anteriormente) que se consideran que representan un marcador importante para la replicación vírica continua en células infectadas. Por tanto, los procedimientos de ensayo que usan muestras de plasma no podrán detectar ácidos nucleicos que se originan a partir del VIH asociado a células y, por tanto, darán lugar a resultados falsos negativos que pueden ser perjudiciales para los pacientes afectados. En consecuencia, la cantidad de ácidos nucleicos del VIH total parece representar un marcador diagnóstico más exacto y fiable que la carga vírica en el plasma.

**Ejemplo 4: Uso de la carga del VIH en muestras de sangre completa como marcador diagnóstico**

45 Las respectivas cargas víricas en plasma y en sangre completa de cinco pacientes con VIH del colectivo anterior de sujetos que recibieron un tratamiento antivírico contra la infección por el VIH (a saber, los pacientes n.º 028, n.º 003, n.º 004, n.º 009 y n.º 066) se determinaron de acuerdo con el ensayo descrito en el ejemplo 1 en diferentes puntos temporales durante el tratamiento. Los respectivos resultados obtenidos se resumen en las siguientes Tablas 3 a 7, así como en las FIG. 33 a 35.

Con respecto al paciente n.º 028, se recogieron muestras de sangre y plasma en diferentes días (es decir, en los días 5, 25, 61 y 68) después del inicio de la monitorización de la respuesta del paciente al tratamiento contra la infección por el VIH. Los resultados del ensayo obtenidos se muestran en la Tabla 3, así como en la FIG. 32.

5 **TABLA 3: VIH n.º 028**

Día de recogida de muestras.	Carga vírica en plasma (copias/ml)	Carga vírica en sangre completa (copias/ml)
5	0	280
25	7	100
61	0	410
68	0	16384

10 Sorprendentemente, se observó un aumento espectacular y repentino de la carga del VIH en la sangre completa en la muestra recogida el día 68 después del inicio de la monitorización de la respuesta del paciente al tratamiento farmacológico, mientras que la carga del VIH en el plasma sigue siendo indetectable. Después de informar de esta observación a la ambulancia del VIH en el Hospital Universitario de Jena, resultó que el paciente había dejado de tomar el medicamento según lo prescrito durante el tratamiento. Aparentemente, este problema de cumplimiento ha dado lugar a un aumento de la replicación del VIH que solo se puede detectar en la sangre completa.

15 Aunque la causa de este fenómeno no está clara, parece que el aumento general del número de copias del VIH se debe principalmente a un número creciente de partículas del VIH que permanecen unidas a los glóbulos sanguíneos, es decir, una mezcla del VIH que no se puede detectar en muestras de plasma.

20 Con respecto a los pacientes n.º 003 y n.º 004, se recogieron muestras de sangre completa y plasma en diferentes días (es decir, en los días 0, 60, 98 y 172 para el n.º 003; y en los días 0, 42, 98 y 158 para el n.º 004) después del inicio de la monitorización de la respuesta del paciente al tratamiento contra la infección por el VIH. Los resultados del ensayo obtenidos se muestran en las Tablas 4 y 5, así como en las FIG. 34A y 34B, respectivamente.

25 **TABLA 4: VIH n.º 003**

Día de recogida de muestras.	Carga vírica en plasma (copias/10 µl)	Carga vírica en sangre completa (copias/10 µl)
0	0,26	260,5
60	5,65	2565
98	2,04	2460
172	2,31	2470

**TABLA 5: VIH n.º 004**

Día de recogida de muestras.	Carga vírica en plasma (copias/10 µl)	Carga vírica en sangre completa (copias/10 µl)
0	0,24	21,1
42	0,20	112
98	2,19	259
158	0,97	249

30 En ambos pacientes, se observaron sistemáticamente cargas víricas bajas en plasma y cargas víricas relativamente altas en sangre completa. A partir de estos datos, se puede ver que el virus todavía se está replicando activamente durante el tratamiento, pero que la mezcla del VIH que se está replicando está nuevamente asociada principalmente a células y, por tanto, no es detectable en muestras de plasma.

35 Con respecto a los pacientes n.º 009 y n.º 066, se recogieron muestras de sangre completa y plasma en diferentes días (es decir, en los días 0, 66 y 136 para el n.º 009; y en los días 0, 11, 35 y 42 para el n.º 066) después del inicio de la monitorización de la respuesta del paciente al tratamiento contra la infección por el VIH. Los resultados del ensayo obtenidos se muestran en las Tablas 6 y 7, así como en las FIG. 35A y 35B, respectivamente.

**TABLA 6: VIH n.º 009**

Día de recogida de muestras.	Carga vírica en plasma (copias/10 µl)	Carga vírica en sangre completa (copias/10 µl)
0	0	43,5
66	0	15,7
136	0	3,6

**TABLA 7: VIH n.º 066**

5

Día de recogida de muestras.	Carga vírica en plasma (copias/10 µl)	Carga vírica en sangre completa (copias/10 µl)
0	2,3	61,4
11	1400	5410
35	4650	6675
42	75,8	292

En el paciente n.º 009, la carga vírica en plasma estaba por debajo del límite de detección, pero en la sangre completa se pudo detectar el VIH. De nuevo, esta mezcla de VIH que se replica activamente parece estar asociada principalmente a células.

10

En el paciente n.º 066, debido a problemas de cumplimiento (es decir, el paciente no había tomado el medicamento según lo prescrito) se observó un aumento de la carga del VIH en las muestras de sangre completo hasta 35 días después del inicio de la monitorización de la respuesta del paciente al tratamiento farmacológico. Posteriormente, se inició otro tratamiento que dio como resultado una disminución de las cargas víricas. A pesar de que las respectivas evoluciones temporales observadas de las cargas víricas en sangre completa y en plasma fueron similares, en números absolutos, la carga vírica en las muestras de sangre completa fue en cualquier momento mayor que la de las muestras de plasma.

15

Por tanto, en base a estos resultados, la carga del VIH en sangre completa parece representar un marcador diagnóstico más significativo y trascendente que la carga del VIH en plasma, no solo para monitorizar la progresión de la enfermedad en un paciente infectado por el VIH sino también para monitorizar la eficacia del tratamiento antivírico.

20

Cabe señalar que el término "que comprende" no excluye otros elementos o características y que el "uno" o "una" no excluye una pluralidad. También se pueden combinar elementos descritos en asociación con diferentes modos de realización.

25

También se debe tener en cuenta que los signos de referencia en las reivindicaciones no se deben interpretar como limitantes del alcance de las reivindicaciones.

30

## REIVINDICACIONES

## 1. Procedimiento, que comprende:

5 proporcionar una muestra de sangre completa no tratada

introducir la muestra de sangre completa no tratada en un dispositivo adaptado para alojar una muestra en un estado fluido que comprende una cámara de reacción en la que la cámara de reacción comprende una primera superficie y una segunda superficie y comprende además una micromatriz dispuesta sobre la primera superficie o la segunda superficie; y

10 determinar el valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de ácidos nucleicos asociados con una infección vírica en la muestra de sangre completa realizando un análisis basado en micromatrices en el dispositivo.

15 2. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además:

determinar un valor indicativo de la carga vírica en un paciente infectado basado en el valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de ácidos nucleicos asociados con una infección vírica.

20 3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que el volumen de la muestra es de 1  $\mu$ l a 45  $\mu$ l.

4. El procedimiento de la reivindicación 1 a 3, en el que la infección vírica es una infección por el VIH.

25 5. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en el que el dispositivo adaptado para alojar una muestra en un estado fluido es un dispositivo microfluídico.

30 6. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el análisis realizado en el dispositivo comprende además liberar ácidos nucleicos de la muestra, en el que la etapa de liberar opcionalmente comprende poner en contacto la muestra de fluido con un reactivo de lisis.

35 7. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el análisis realizado en el dispositivo comprende además formar complejos, comprendiendo cada complejo un ácido nucleico asociado con una infección vírica y una molécula de captura, en el que cada molécula de captura comprende un grupo de anclaje y una parte de unión. específica para una región del ácido nucleico asociada con una infección vírica, en el que el análisis realizado en el dispositivo opcionalmente comprende además poner en contacto los complejos con un primer miembro de unión del dispositivo, estando configurado el primer miembro de unión para unirse al grupo de anclaje de la molécula de captura para unir los complejos al primer miembro de unión.

40 8. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la etapa de formar complejos de moléculas de captura con ácidos nucleicos asociados con una infección vírica se realiza espacialmente separada de la etapa de poner en contacto los complejos con el primer miembro de unión.

45 9. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el análisis realizado en el dispositivo comprende además amplificar ácidos nucleicos asociados con una infección vírica, en el que los ácidos nucleicos se amplifican opcionalmente mediante PCR.

50 10. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el análisis realizado en el dispositivo comprende además proporcionar una cantidad de un compuesto indicador que puede formar un complejo con un ácido nucleico asociado con una infección vírica, y un segundo miembro de unión que puede capturar el compuesto indicador, inhibiendo la formación de complejos del compuesto indicador con el ácido nucleico la captura del compuesto indicador por el segundo miembro de unión.

55 11. El procedimiento de la reivindicación 10, que comprende además:

formar complejos de un subconjunto de la cantidad de compuesto indicador con al menos un subconjunto de la cantidad de ácido nucleico asociado con una infección vírica;

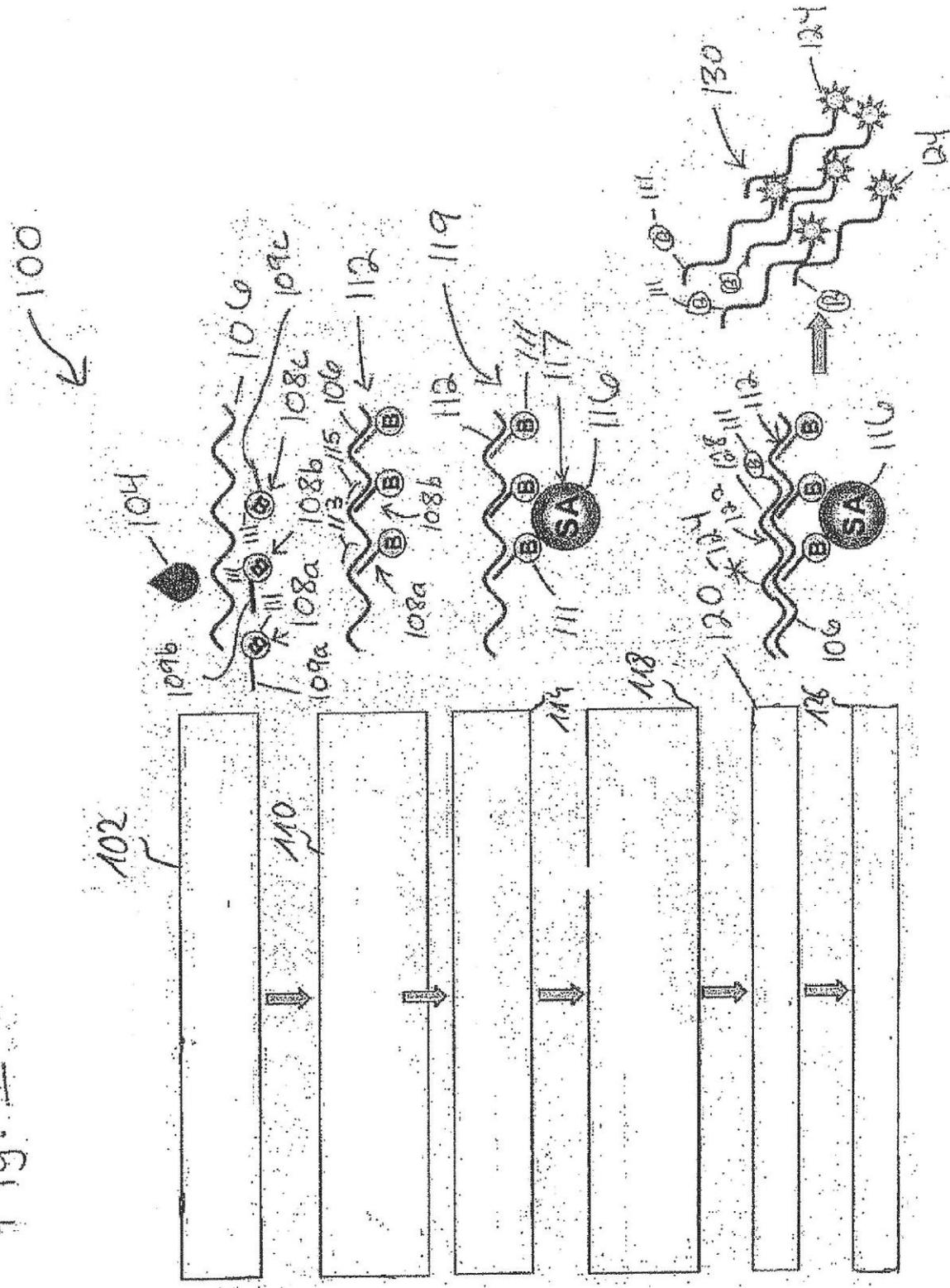
60 capturar un subconjunto restante de la cantidad de compuesto indicador que no está en complejo con un ácido nucleico asociado con una infección vírica en el segundo miembro de unión; y

determinar un valor indicativo de la presencia y/o la cantidad de compuesto indicador capturado en el segundo miembro de unión; y, opcionalmente

65 determinar uno o más valores indicativos de la cantidad de ácidos nucleicos asociados con una infección vírica en base a los valores indicativos de la cantidad de compuesto indicador.

- 5 **12.** El procedimiento de la reivindicación 11, que comprende además someter los ácidos nucleicos asociados con una infección vírica a amplificación, en el que la amplificación de los ácidos nucleicos se inicia antes de la etapa de formar complejos de un subconjunto de la cantidad de compuesto indicador con al menos un subconjunto de la cantidad de ácido nucleico.

Fig. 1a



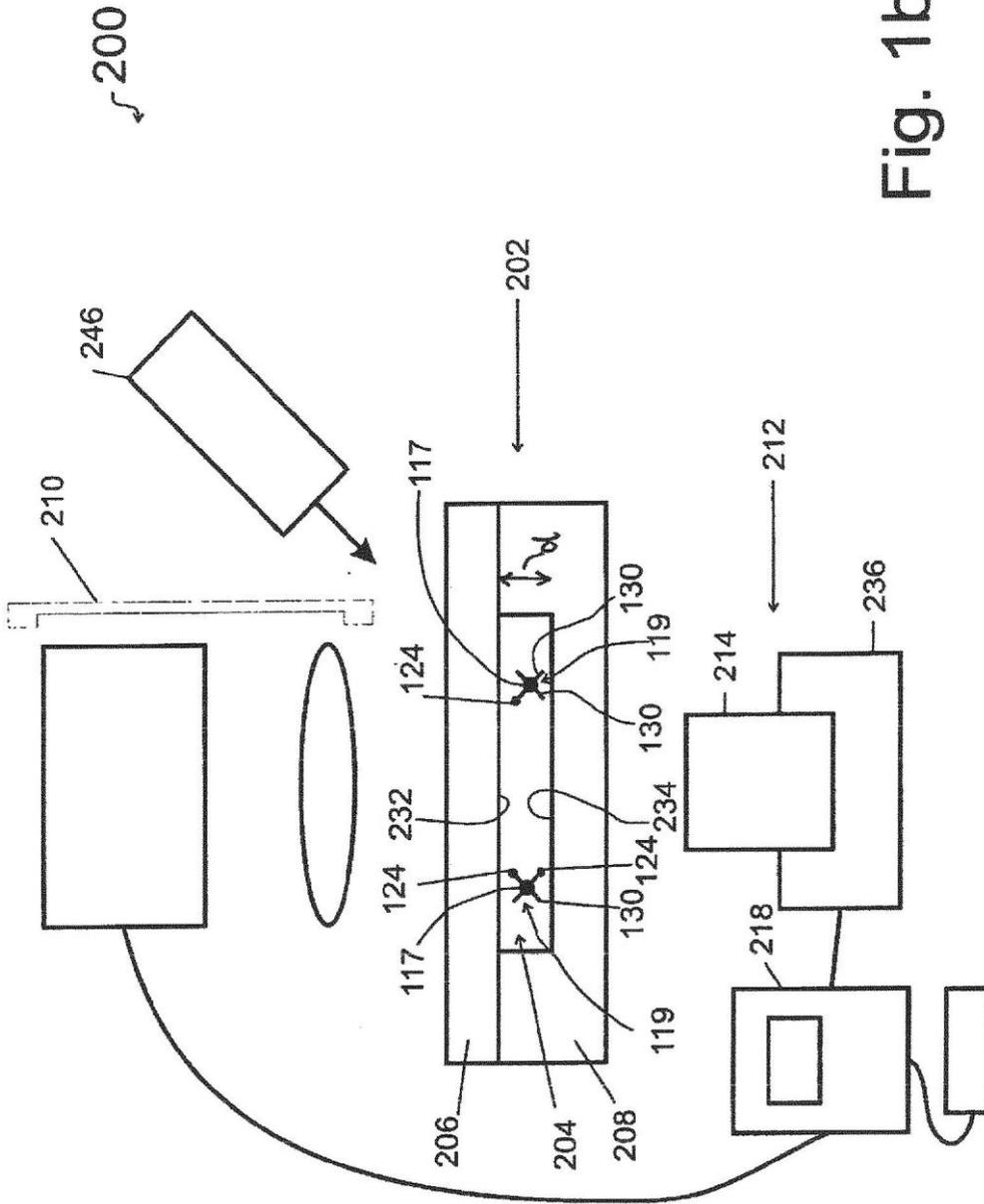


Fig. 1b

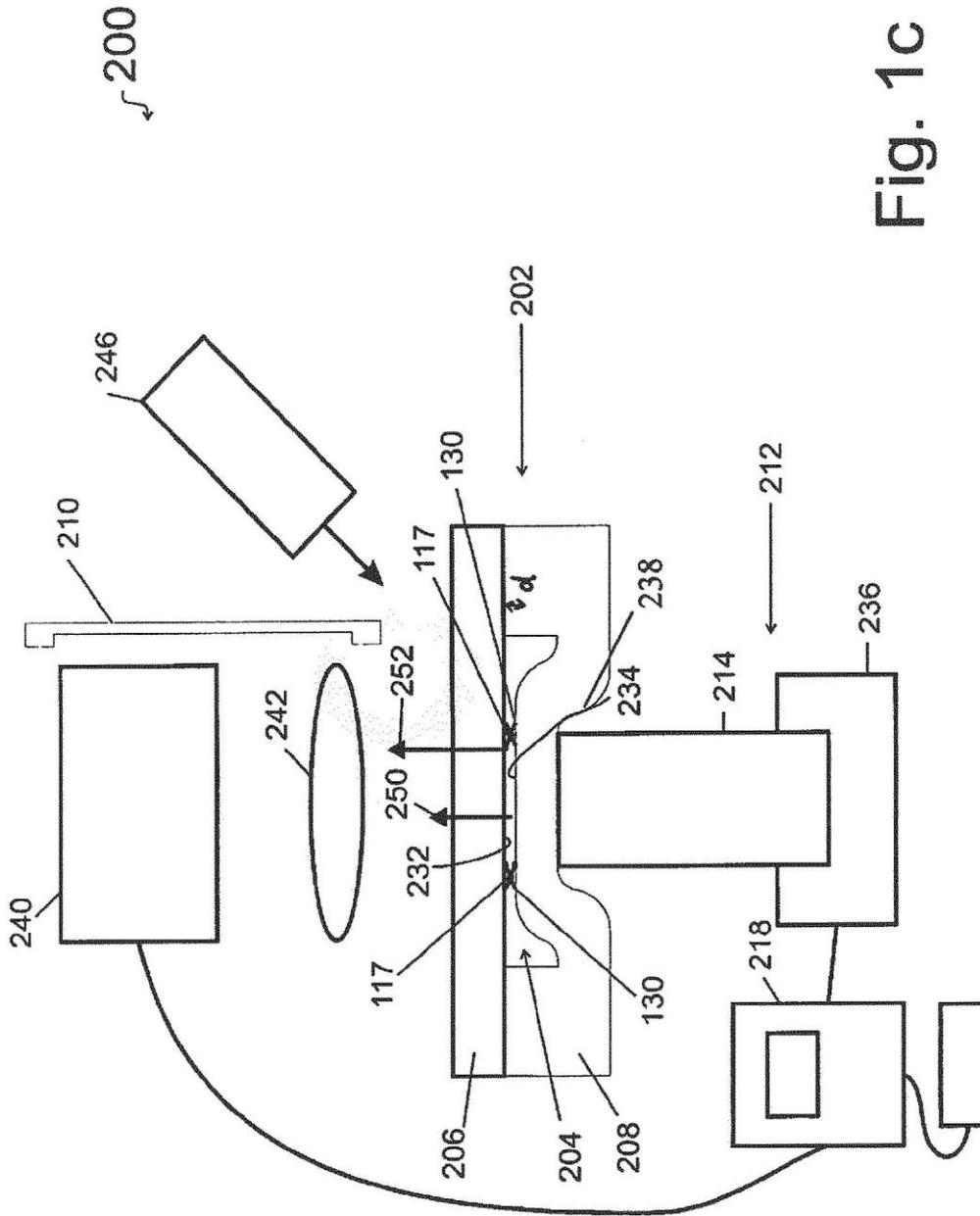
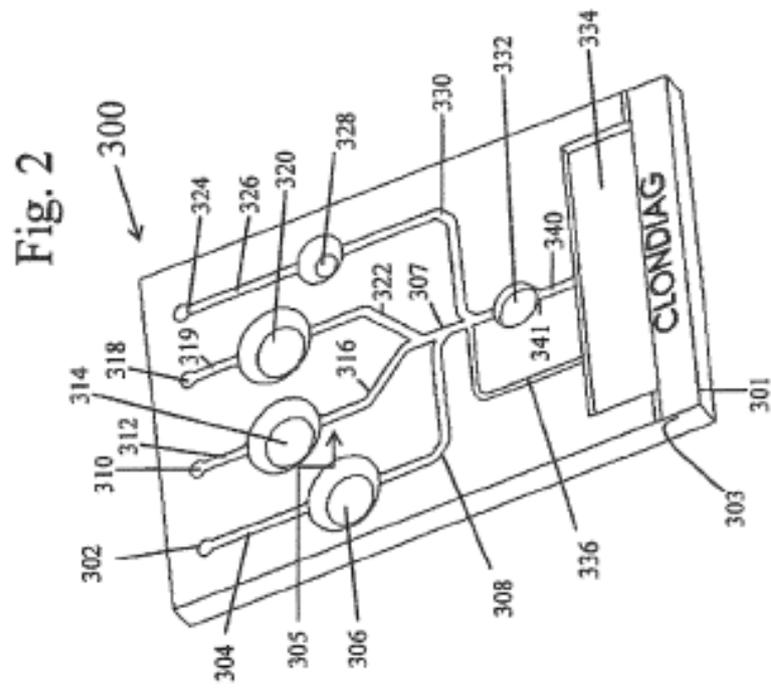
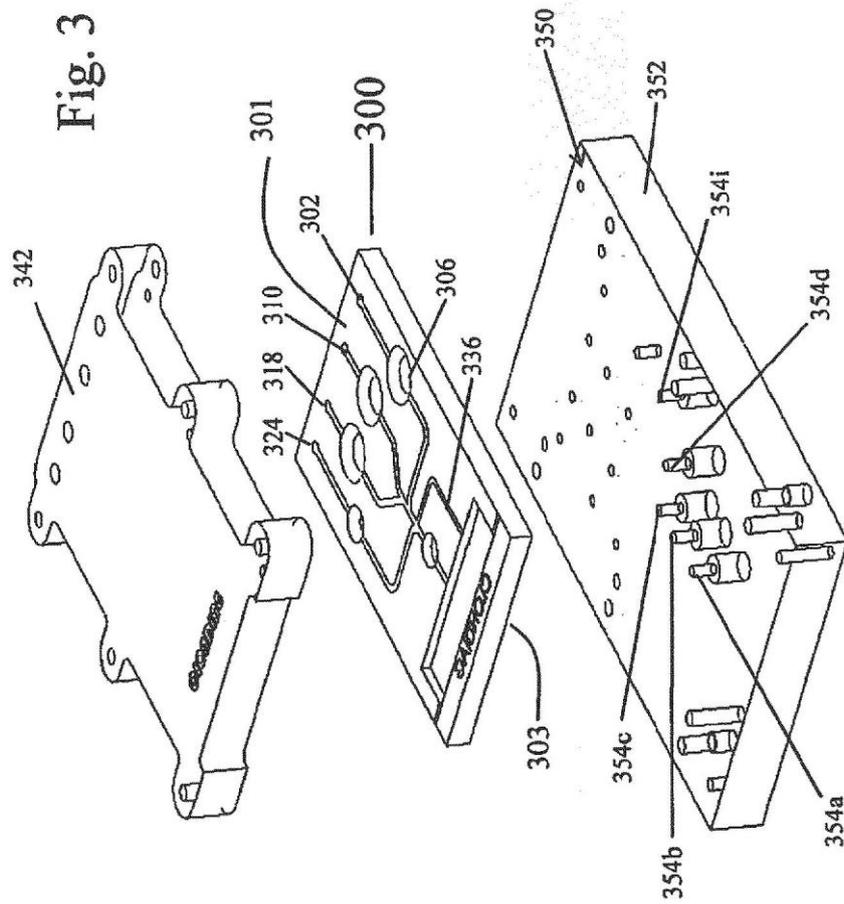


Fig. 1c





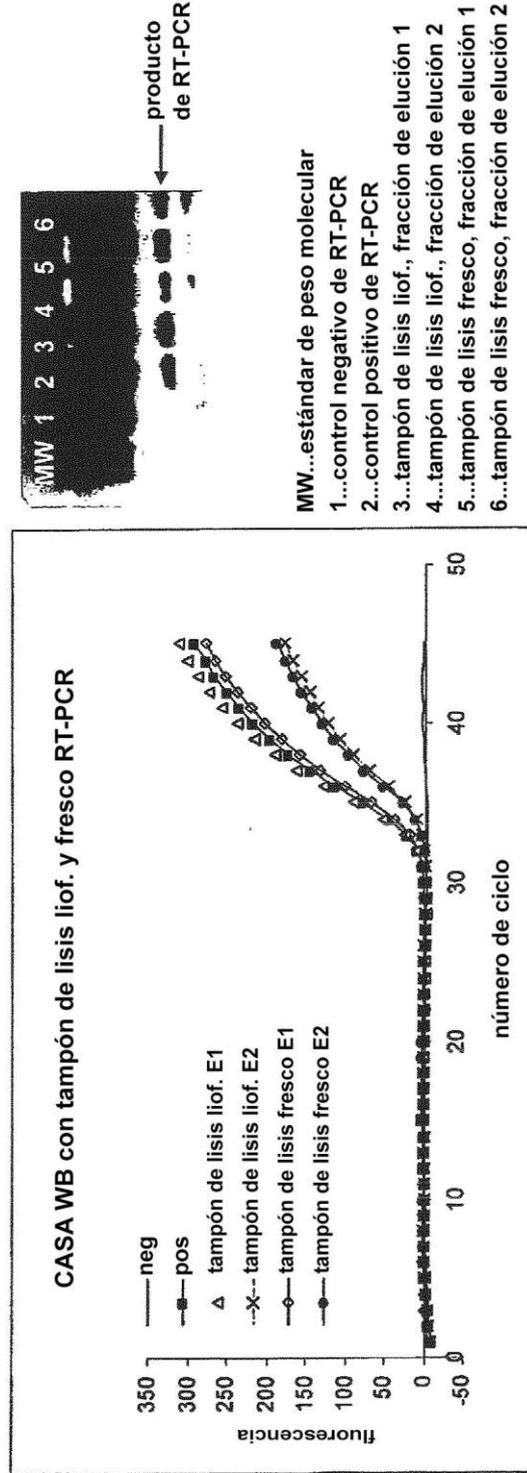




1. Etapa - Lisis

Ensayo de captura con estreptavidina sefarosa, ARN y 10 µl de sangre completa  
 Prueba: tampón de lisis liofilizado frente a fresco

Fig. 4

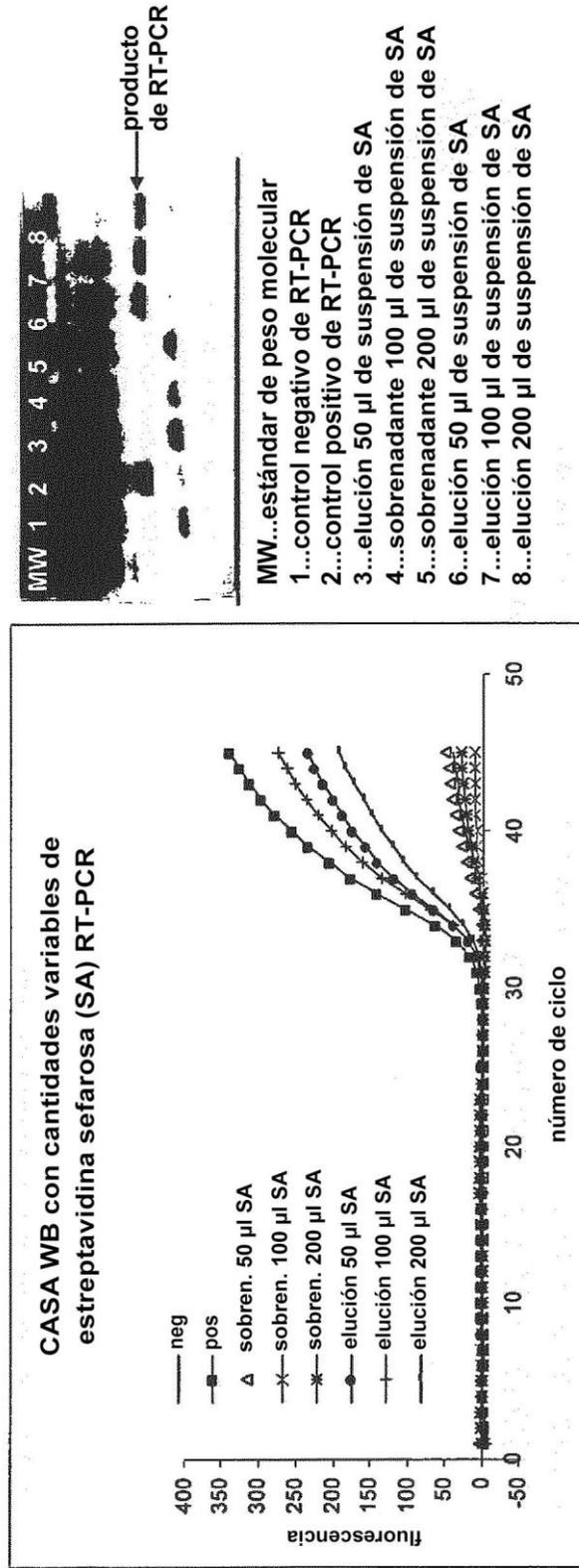


→ El tampón de lisis puede ser liofilizado y se puede resuspender sin pérdida de eficacia

Fig. 5

2. Etapa - Captura de complejos de ARN en matriz sólida (I)

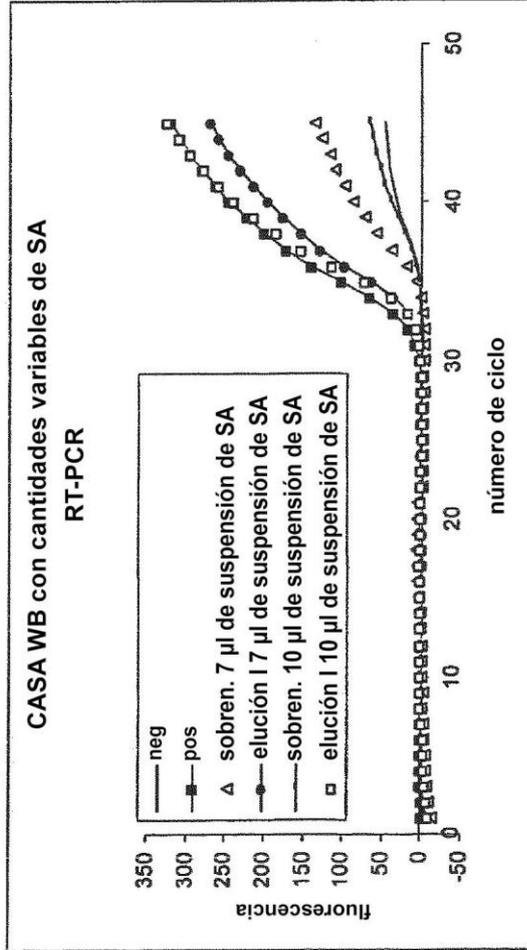
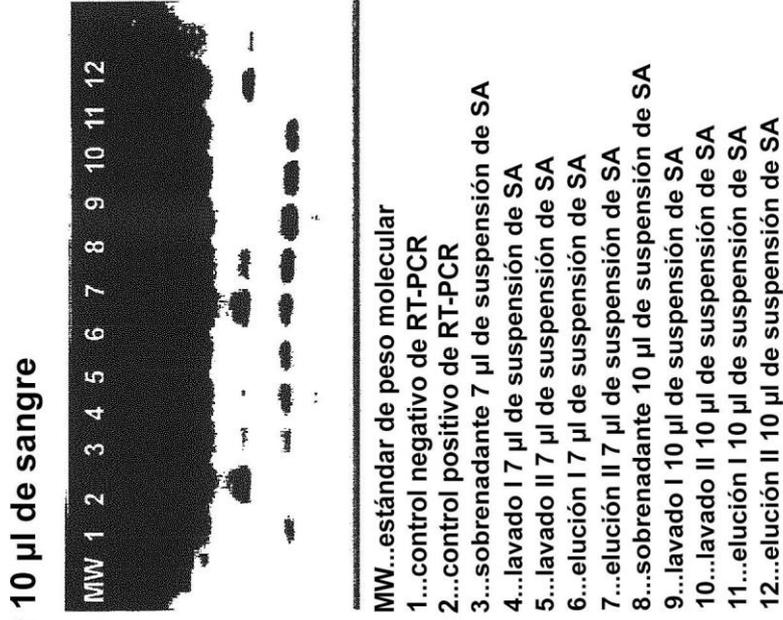
Ensayo de captura con estreptavidina sefarosa, ARN y 10 µl de sangre completa en una prueba de estreptavidina sefarosa



→ no se detecta ARN en el sobrenadante cuando se utilizan 50 a 200 µl de suspensión de SA

**2. Etapa - Captura de complejos de ARN en matriz sólida (II)**  
**Ensayo de captura con estreptavidina sefarosa, ARN y 10 µl de sangre completa en una prueba de estreptavidina sefarosa**

**Fig. 6**

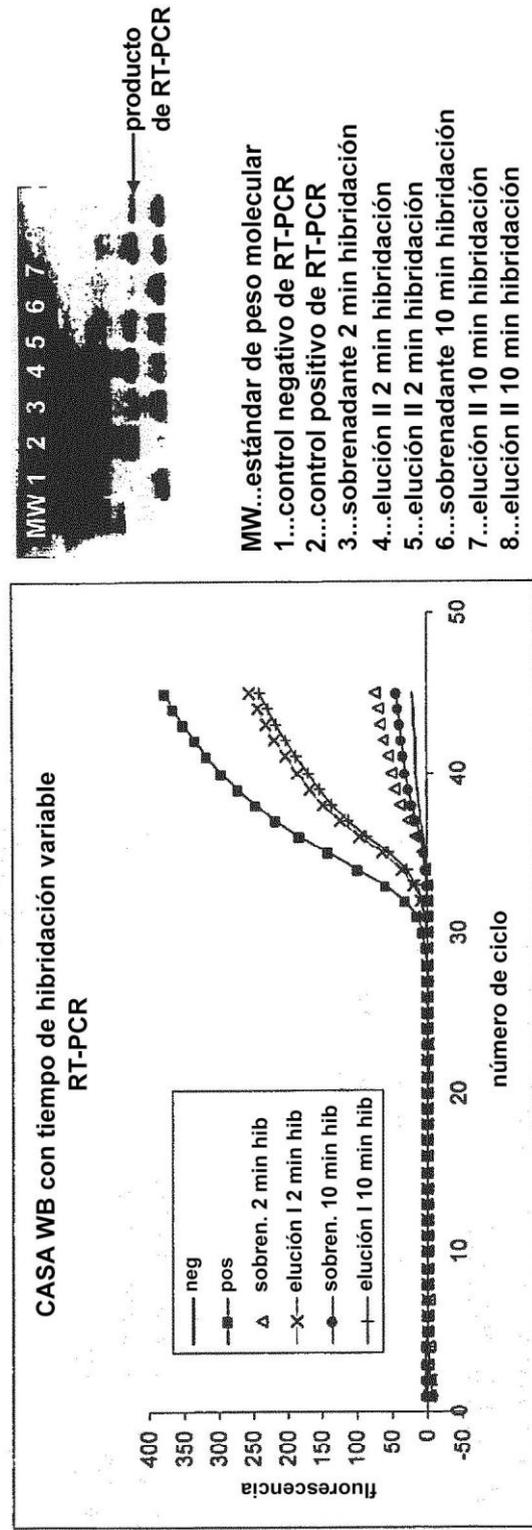


→ con 7 µl de suspensión de SA, el ARN se detecta en el sobrenadante, pero 10 µl de suspensión de SA son suficientes para capturar el ARN completamente

Fig. 7

2. Etapa - Captura de complejos de ARN en matriz sólida (III)

Ensayo de captura con 10 µl de estreptavidina sefarosa, ARN y 10 µl de sobre completa tiempo de hibridación de la prueba

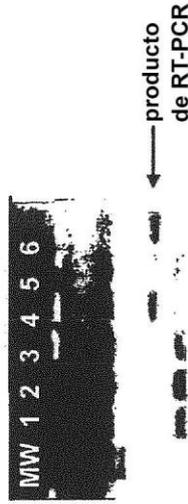
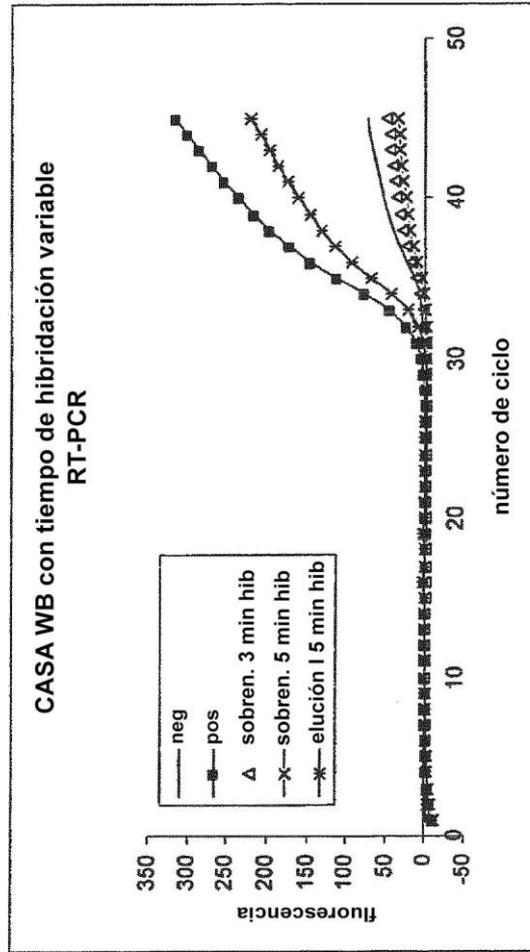


→ después de 2 min de tiempo de hibridación, se detecta más ARN en el sobrenadante que después de 10 min de hibridación

2. Etapa - Captura de complejos de ARN en matriz sólida

Fig. 8

Ensayo de captura con 10 µl de estreptavidina seftarosa, ARN y 10 µl de sobre completa  
tiempo de hibridación de la prueba



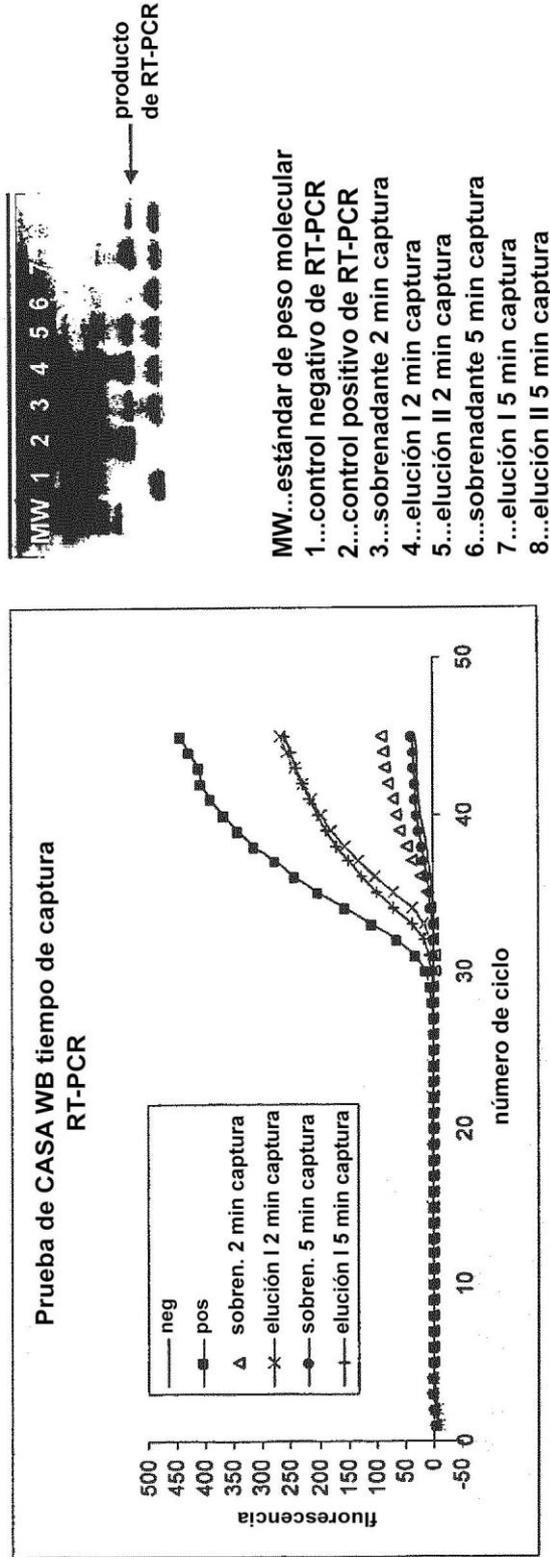
- MW...estándar de peso molecular  
 1...control negativo de RT-PCR  
 2...sobrenadante 3 min hibridación  
 3...sobrenadante 5 min hibridación  
 4...elución I 5 min hibridación  
 5...elución II 5 min hibridación  
 6...control positivo de RT-PCR

→ 5 min de tiempo de hibridación son suficientes para capturar el ARN completamente

Fig. 9

2. Etapa - Captura de complejos de ARN en matriz sólida

Ensayo de captura con 10 µl de estreptavidina sefarosa, ARN y 10 µl de sabre completa  
tiempo de captura de la prueba

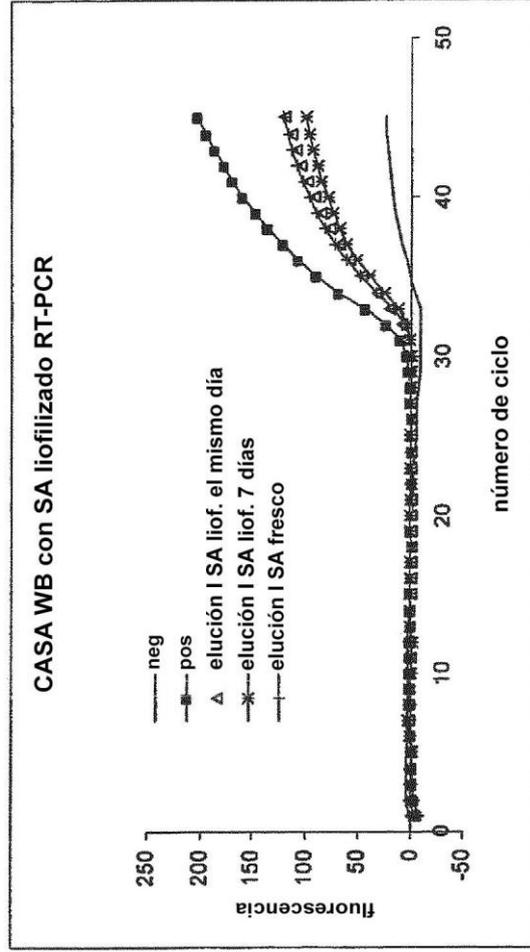


→ 5 min de tiempo de captura son suficientes para capturar el ARN completamente

Fig. 10

2. Etapa - Captura de complejos de ARN en matriz sólida

Ensayo de captura con 10 µl de estreptavidina sefarosa, ARN y 10 µl de sangre completa prueba de estabilidad de estreptavidina sefarosa liofilizada

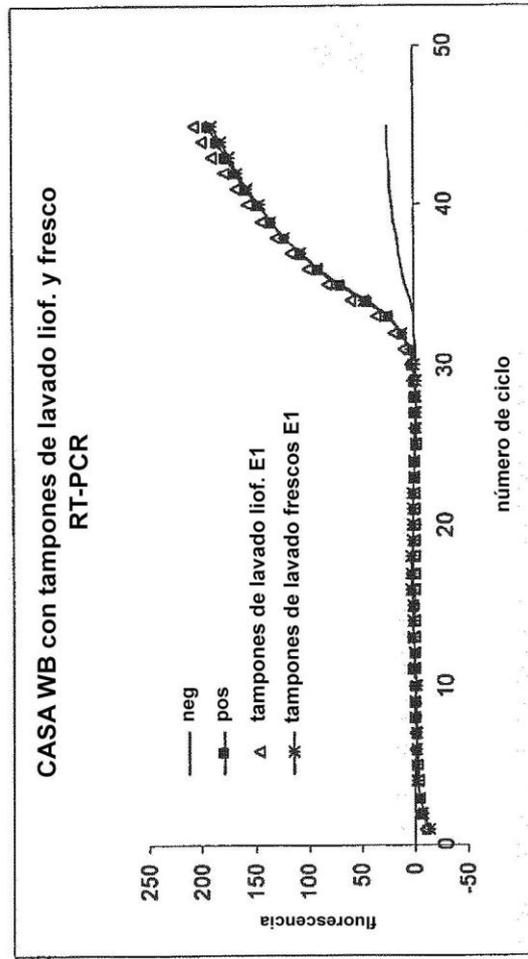


→ La estreptavidina sefarosa puede estar liofilizada sin una pérdida significativa de la función, se deberán realizar pruebas de estabilidad a largo plazo

Fig. 11

3. Paso - Lavado

Ensayo de captura con 10 µl de estreptavidina sefarosa, ARN y 10 µl de sangre completa prueba de estabilidad de estreptavidina sefarosa liofilizada

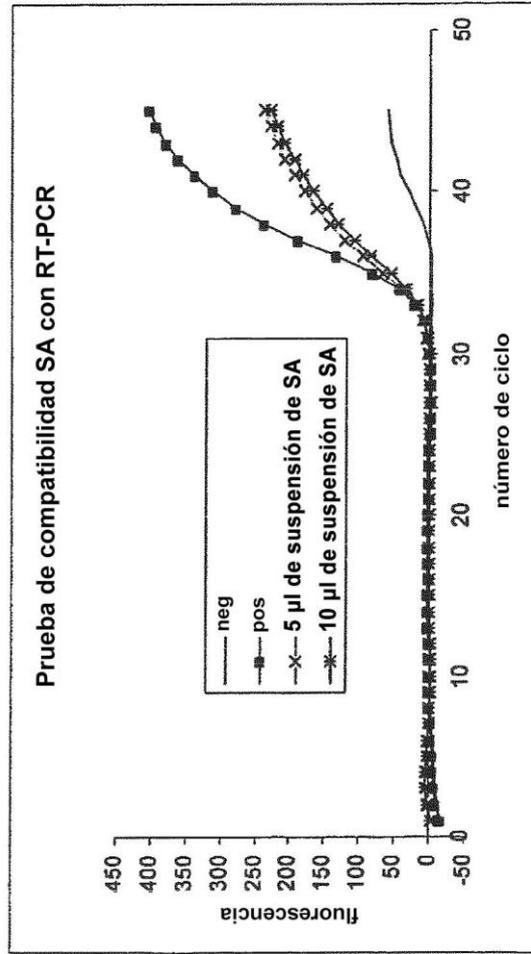


→ los tampones de lavado pueden estar liofilizados sin pérdida de eficacia

Fig. 12

4. Etapa- Amplificación

Prueba de compatibilidad de estreptavidina sefarosa con RT-PCR



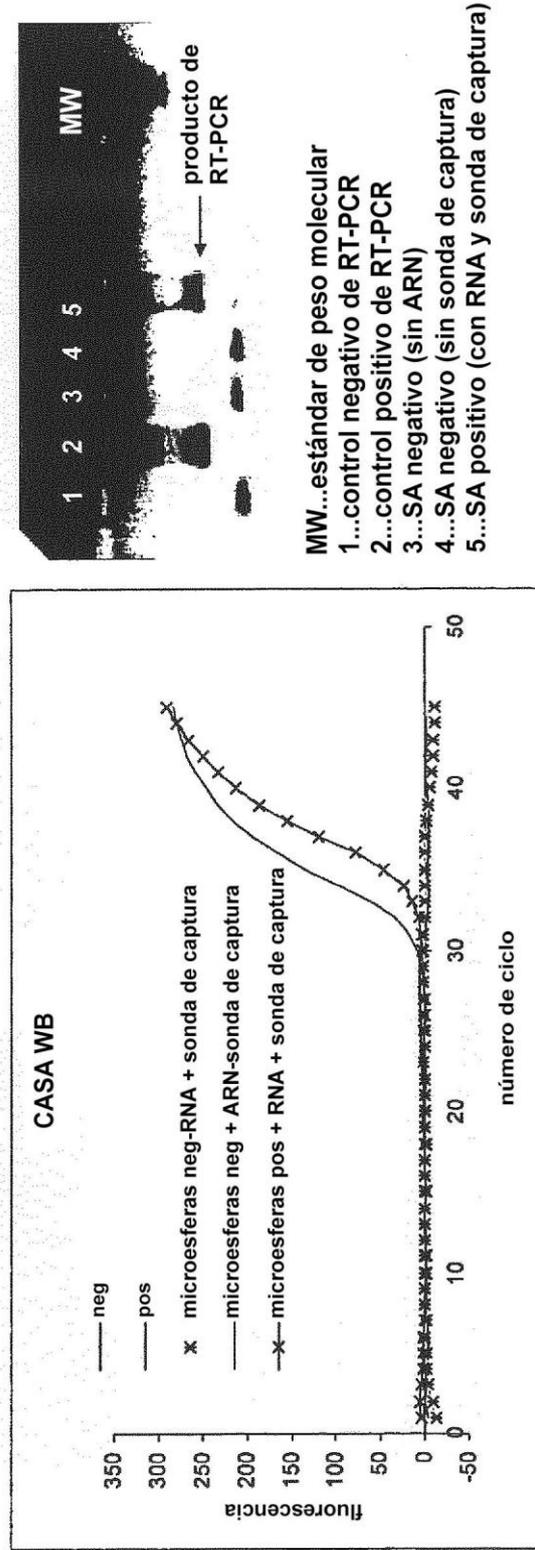
- MW...estándar de peso molecular  
 1...control negativo de RT-PCR  
 2...control positivo de RT-PCR  
 3...5 µl de suspensión de SA  
 4...10 µl de suspensión de SA

→ 10 µl de SA liofilizada (la cantidad de suspensión necesaria para capturar el ARN por completo) no inhiben la RT-PCR (el mismo valor de ct, aunque la fluorescencia final es menor que con el control (sin suspensión de SA))

Fig. 13

**4. Etapa - Amplificación**

- RT-PCR con SA después del ensayo de captura con sangre completa
- el ARN del VIH en presencia de 10 µl de sangre se capturó en estreptavidina sefarosa
- se usó estreptavidina sefarosa con ARN purificado como molde para RT-PCR (sin elución)
- control negativo: con sangre y sonda de captura, pero sin ARN con sangre y ARN pero sin sonda de captura



→ el ensayo es específico: el ARN/ADN humano no se captura/amplifica y el ARN no se une no específicamente a la estreptavidina sefarosa  
→ no se requiere la elución del ARN y la separación de estreptavidina sefarosa antes de la amplificación

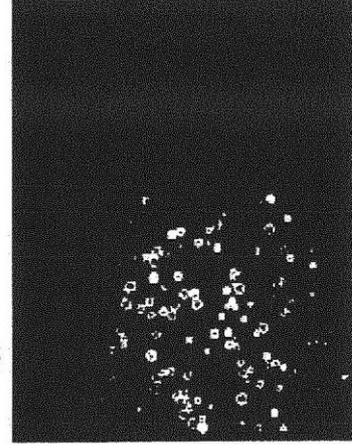
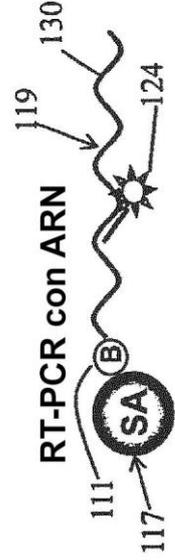
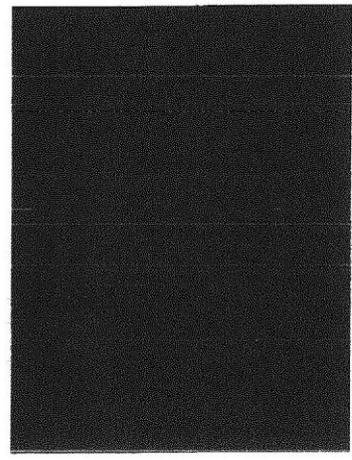
Fig. 14

5. Etapa - Detección

RT-PCR, seguido de la detección del producto de RT-PCR en estreptavidina sefarosa  
 una hebra biotinilada en el producto de RT-PCR<sup>®</sup>

sonda marcada 

RT-PCR sin ARN 



Imágenes fluorescentes de SA después de la incubación con/sin producto de RT-PCR y sonda marcada con Cy5 (diámetro promedio de microsferas de 34 µm, tiempo de exposición de 10 s)

→ el producto amplificado puede concentrarse y visualizarse en estreptavidina sefarosa  
 → la autofluorescencia de estreptavidina sefarosa es baja

Fig. 15

**5. Etapa - Detección**

RT-PCR con estreptavidina sefarosa después del ensayo de captura con sangre completa (control negativo: con sangre y sonda de captura, pero sin ARN)

- el ARN del VIH en presencia de 10 µl de sangre se capturó en estreptavidina sefarosa
- se usó una alícuota de estreptavidina sefarosa (SA) con ARN purificado como molde para RT-PCR
- se seleccionó otra alícuota de estreptavidina sefarosa con ARN purificado y se usó como molde para RT-PCR
- después de la RT-PCR, las muestras con SA se incubaron con la sonda Cy3



imágenes fluorescentes de SA en la página siguiente.....

Fig. 16

5. Etapa - Detección (cont.)

control negativo (n.º 7 en gel, para descripción, véase la página anterior)



control positivo (n.º 8 en gel, para descripción, véase la página anterior)



→ más microesferas fluorescentes son visibles en el control positivo, pero la detección necesita ser optimizada (unión no específica de la sonda fluorescente a SA)



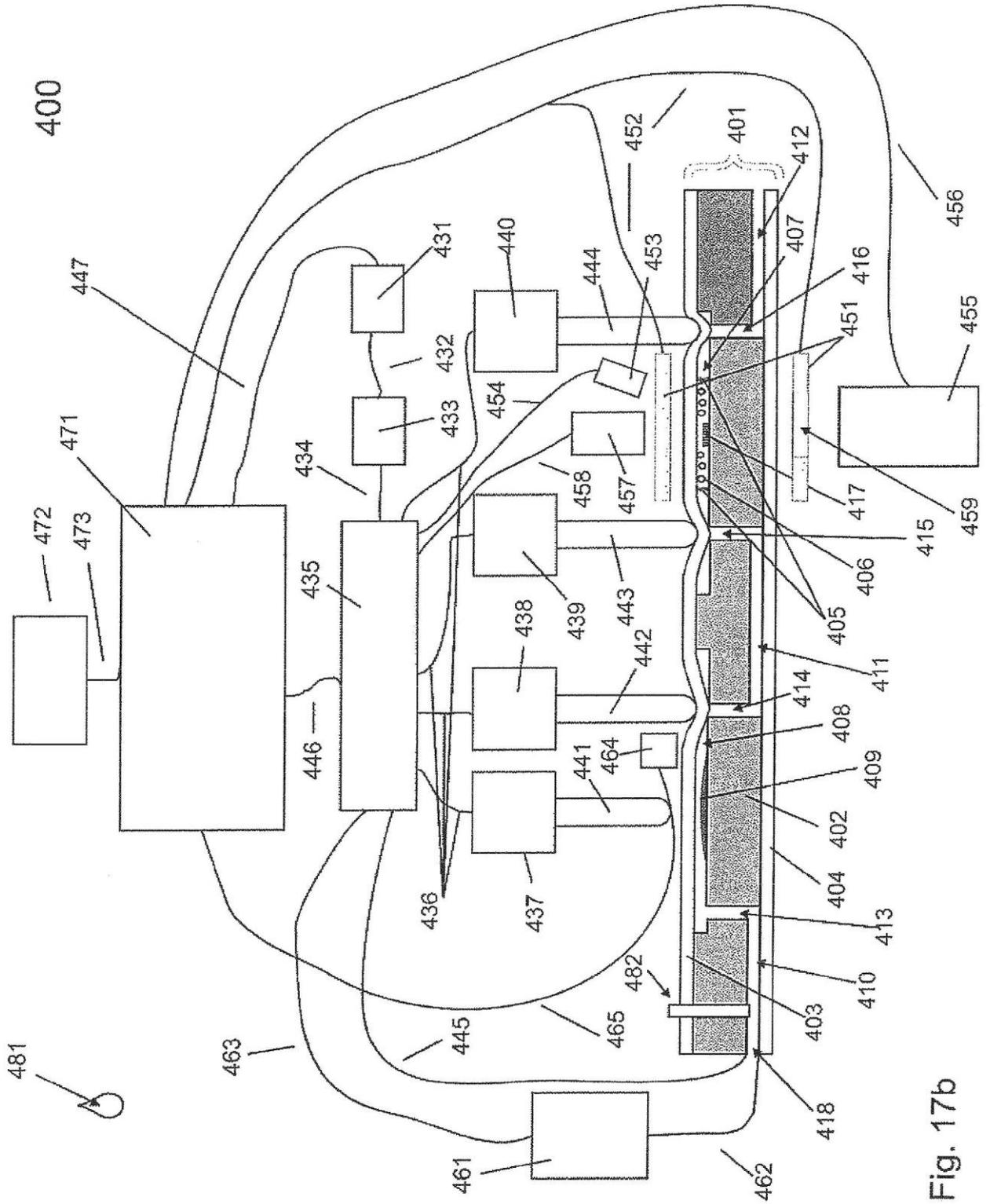


Fig. 17b

Unidad de valor 435

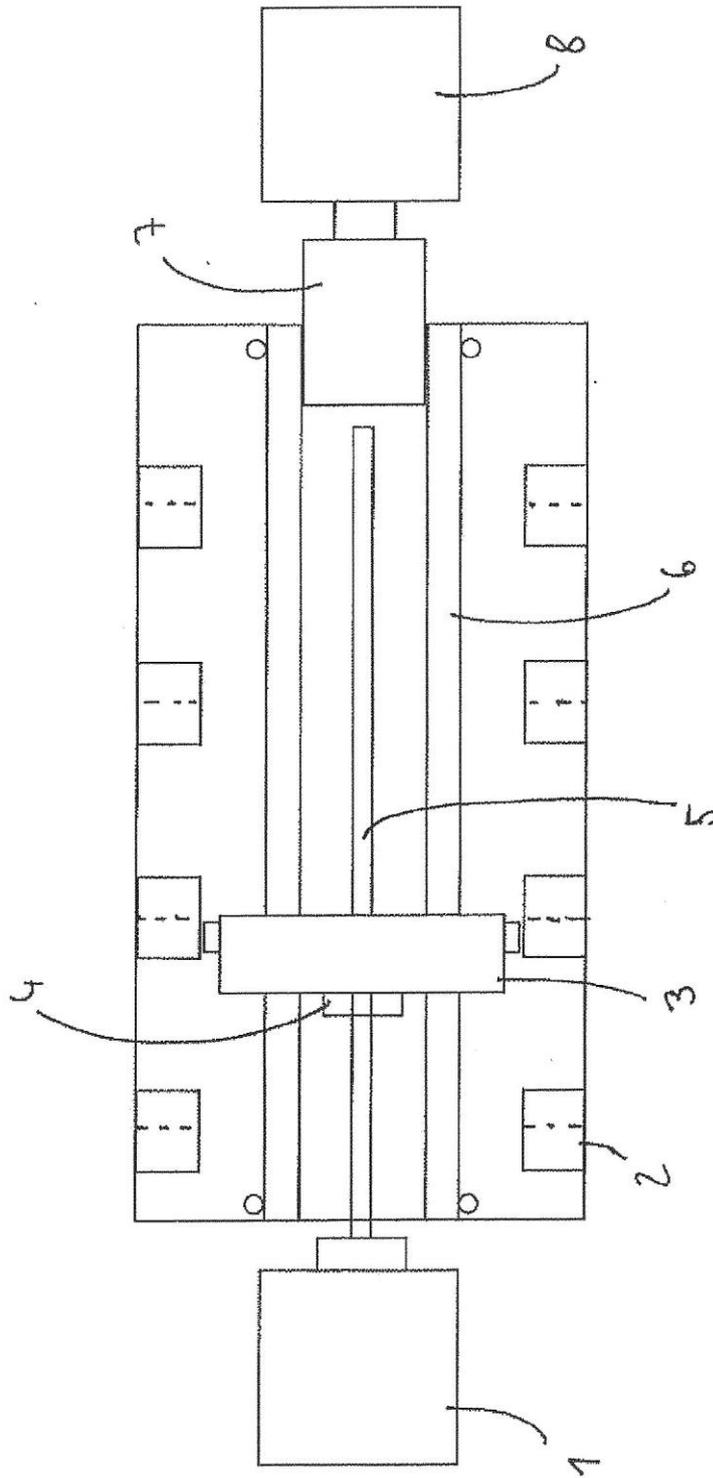


Fig. 17c

Rotor/estator

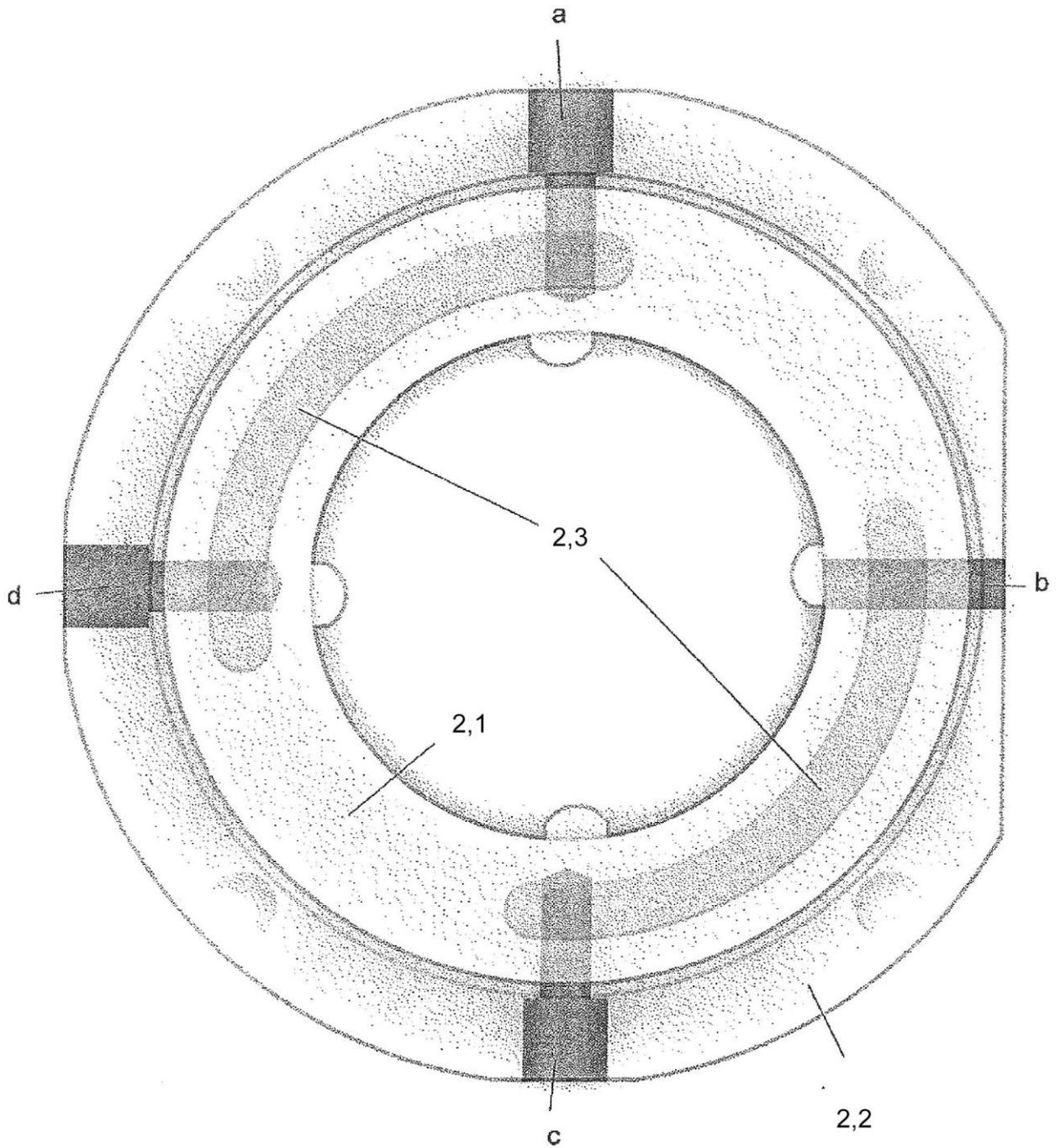


Fig. 17d

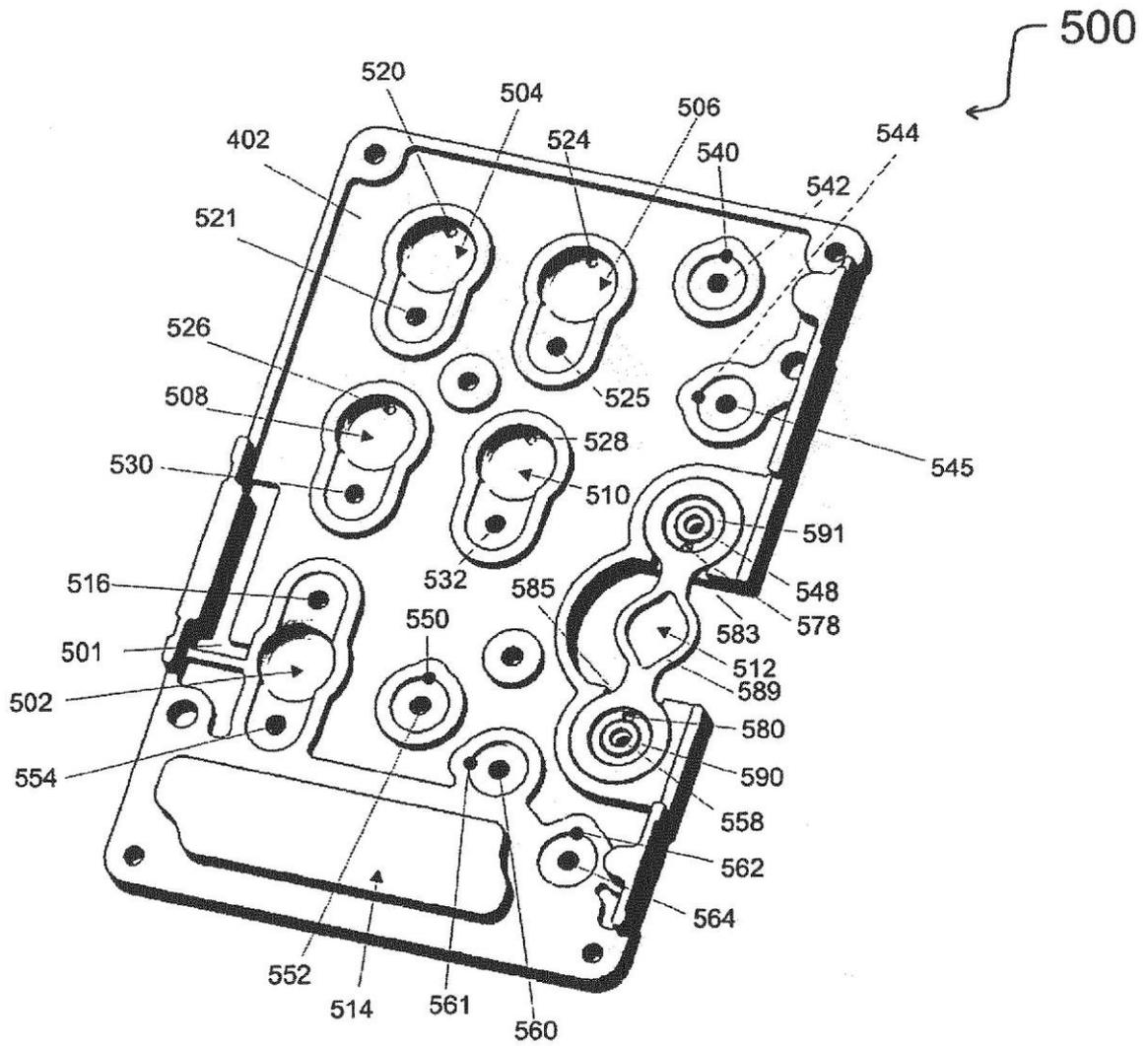


Fig. 18

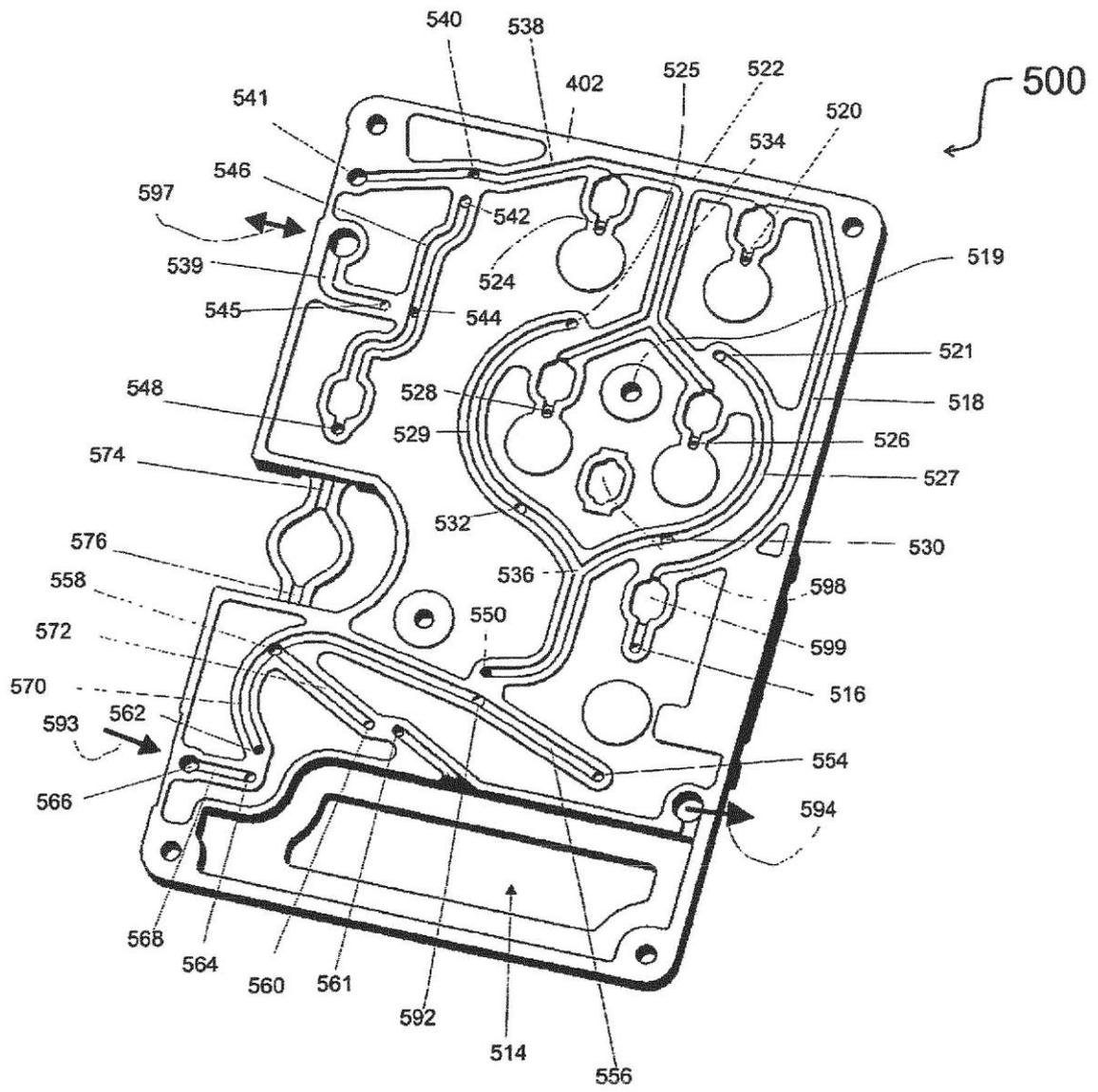


Fig. 19

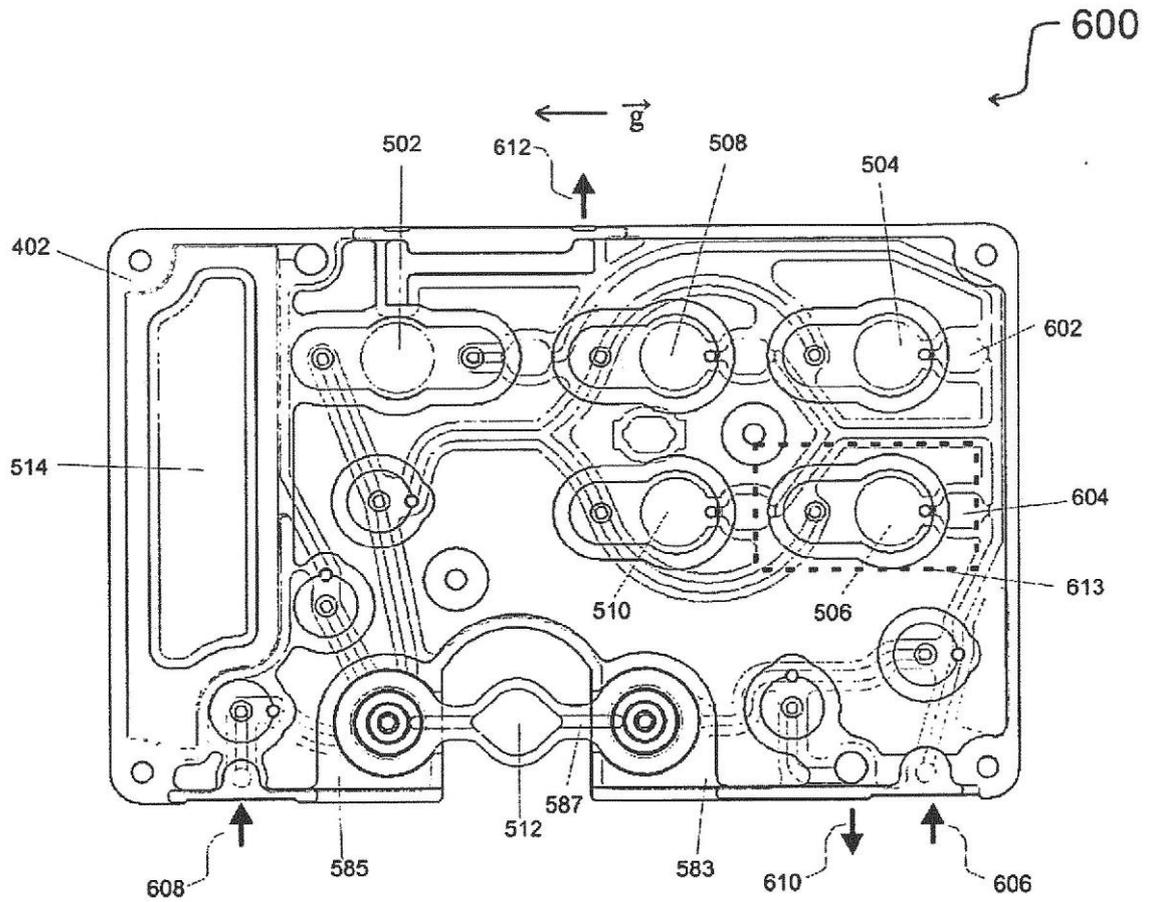
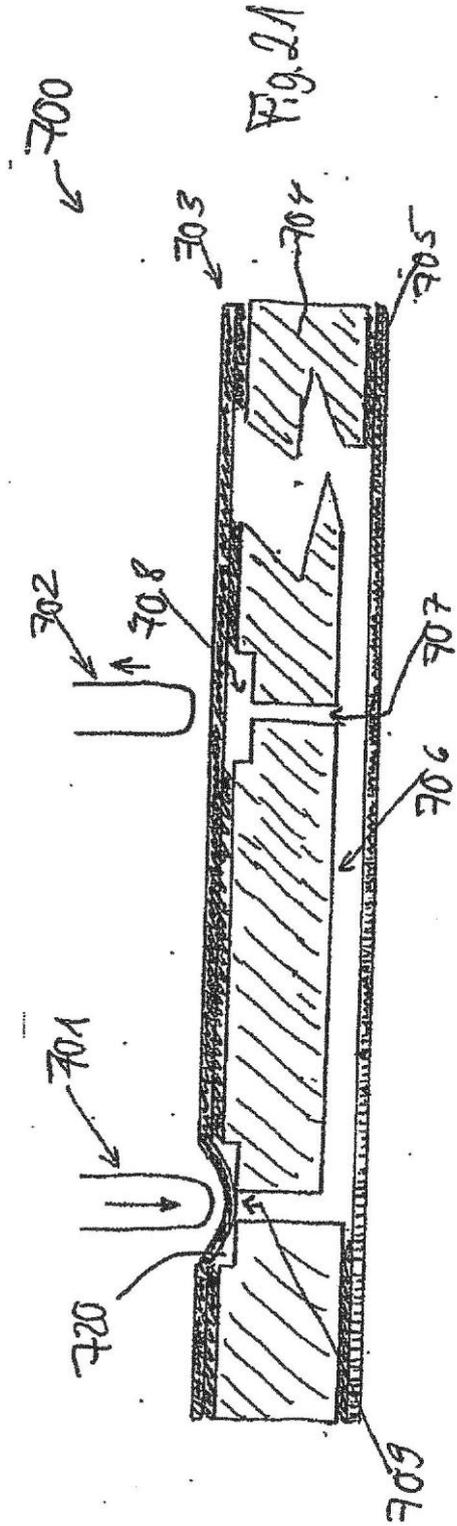
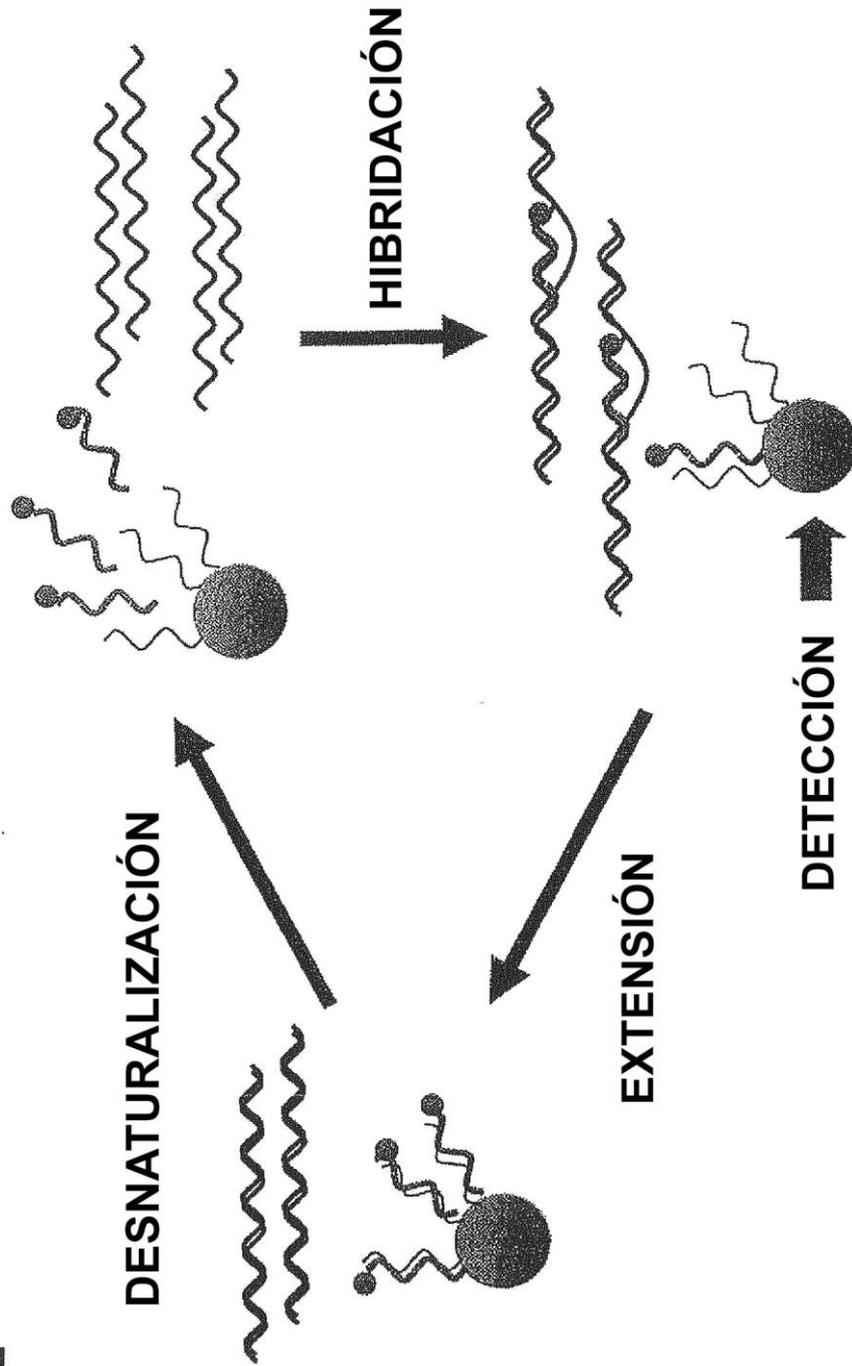


Fig. 20



**FIG. 22**



**FIG. 23**

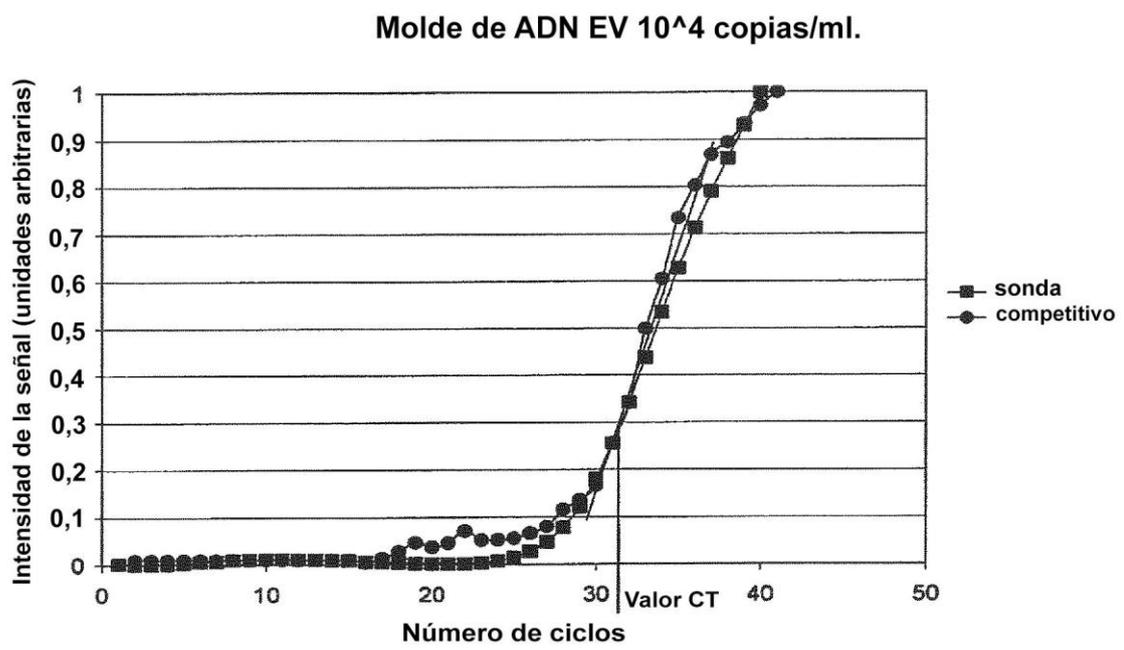
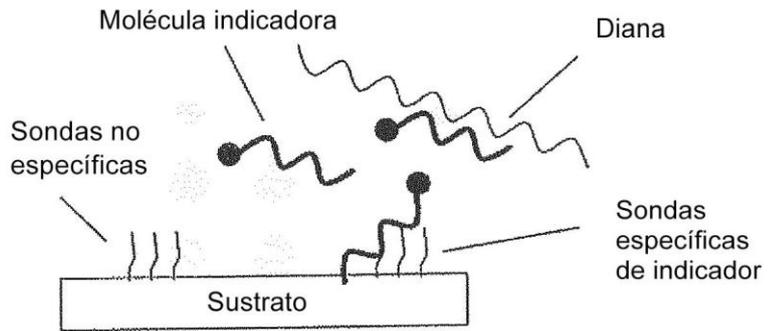
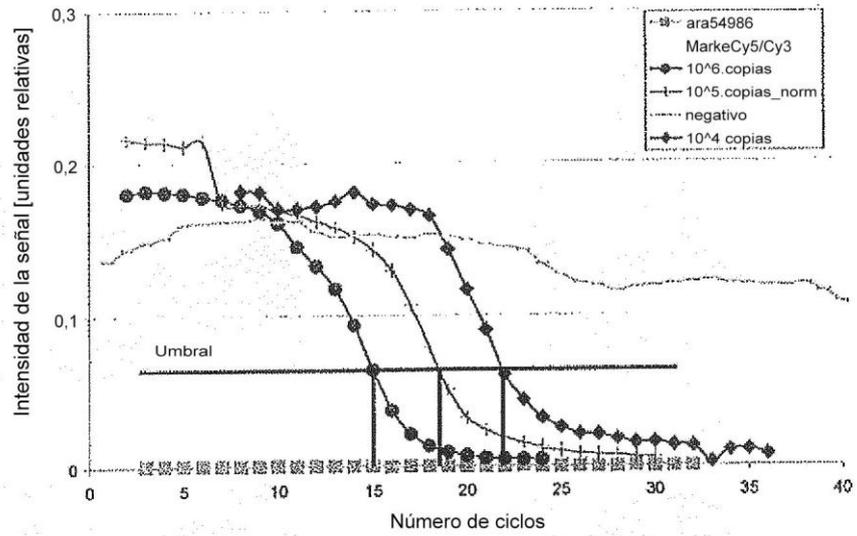


FIG. 24

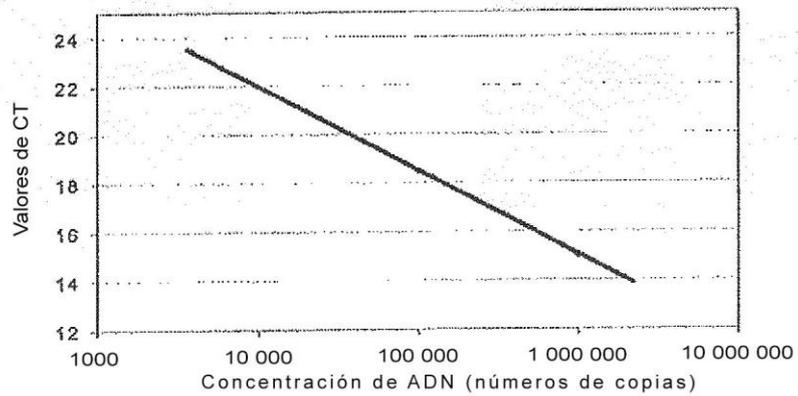
A



B

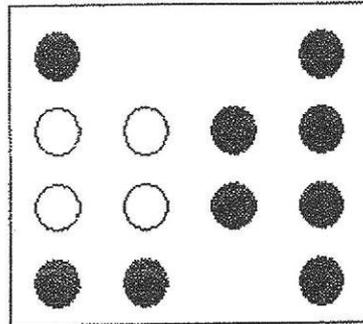


C

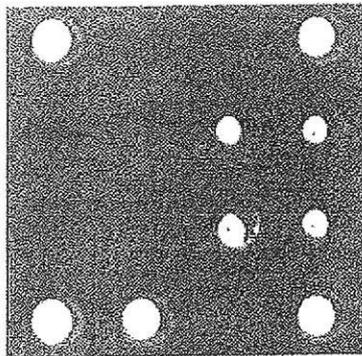


**FIG. 25**

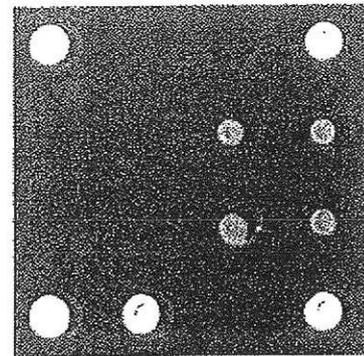
**A**



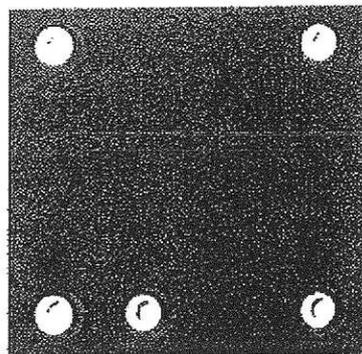
**B**



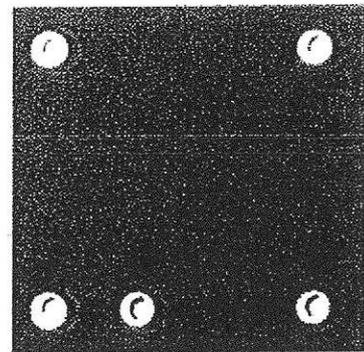
**CICLO 1**



**CICLO 12**

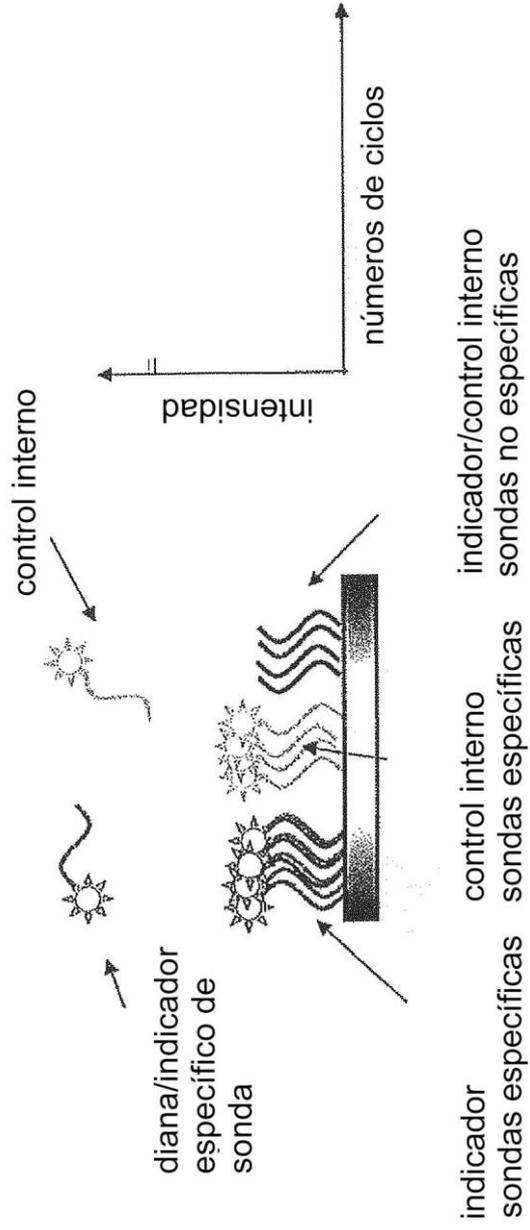


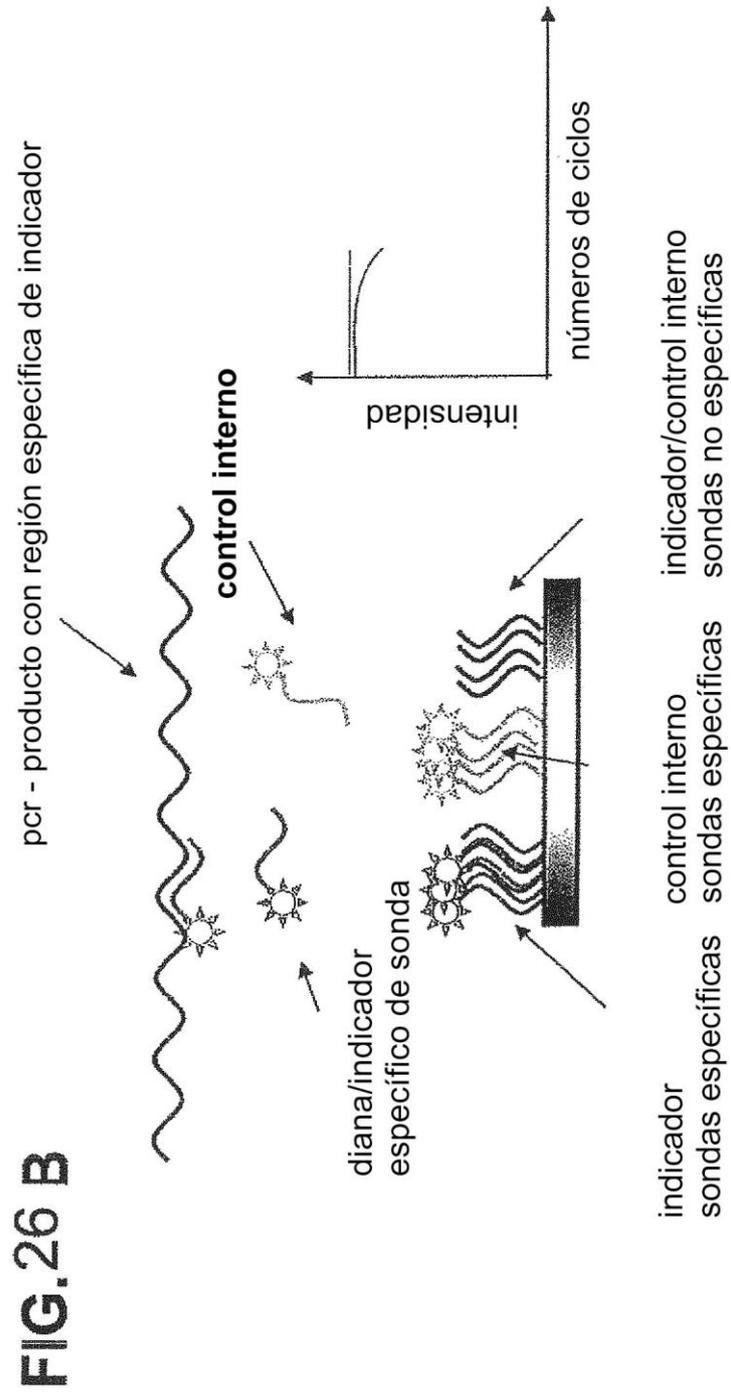
**CICLO 18**

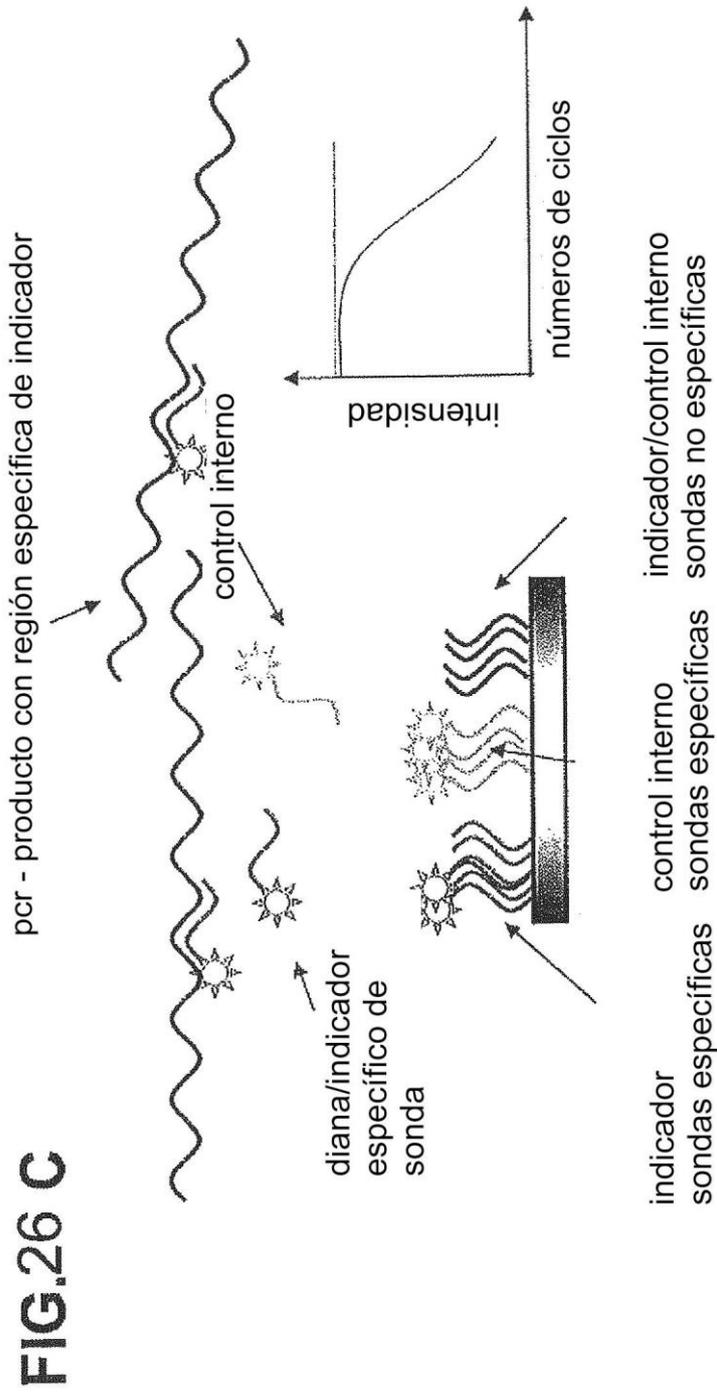


**CICLO 21**

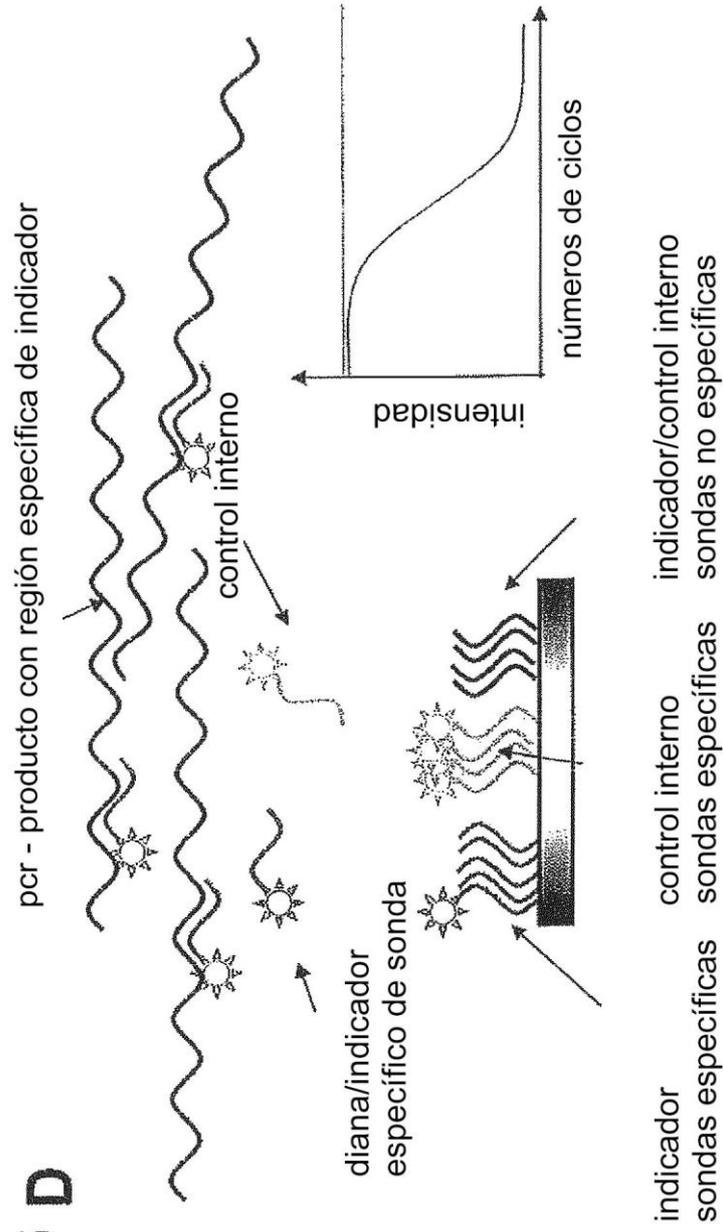
FIG. 26A





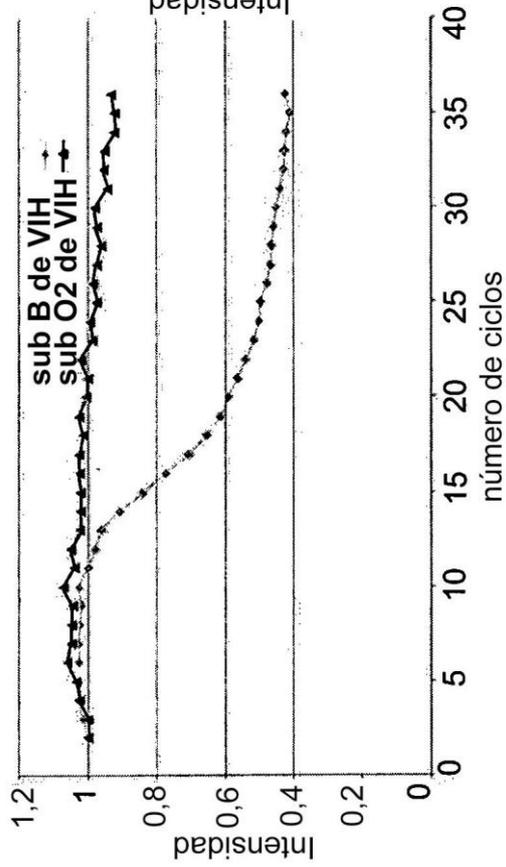


**FIG.26 D**



**FIG.27 A**

amplificación y detección del subtipo B del VIH



**FIG.27 B**

amplificación y detección del subtipo O2 del VIH

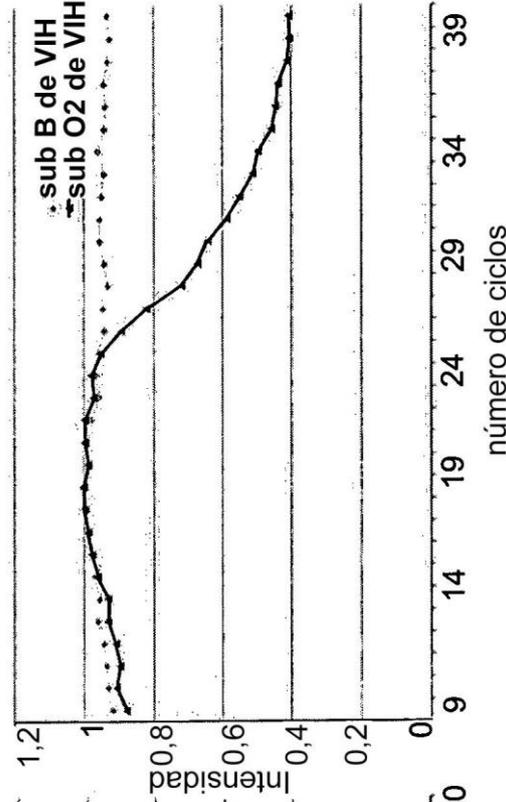


FIG. 28A

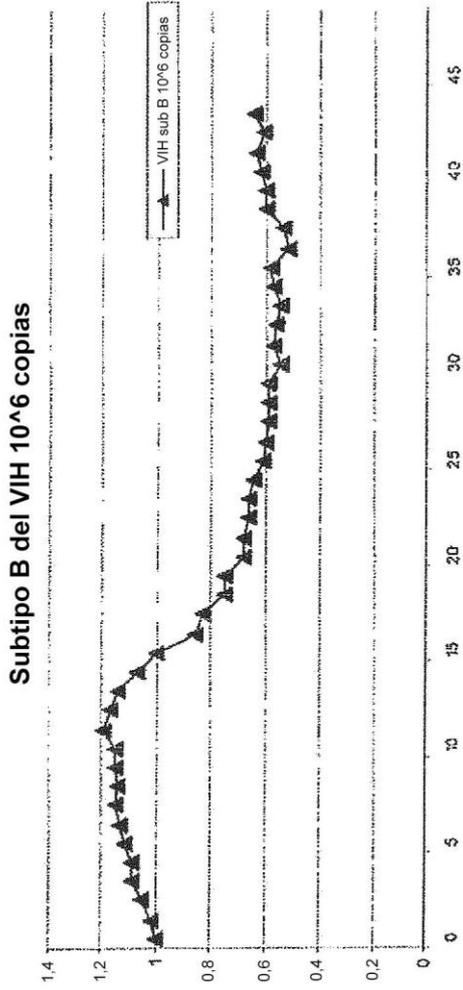


FIG. 28B

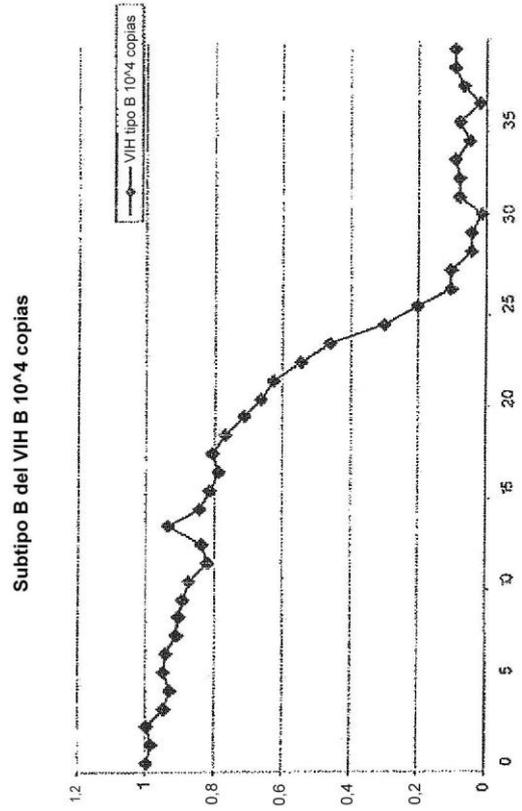
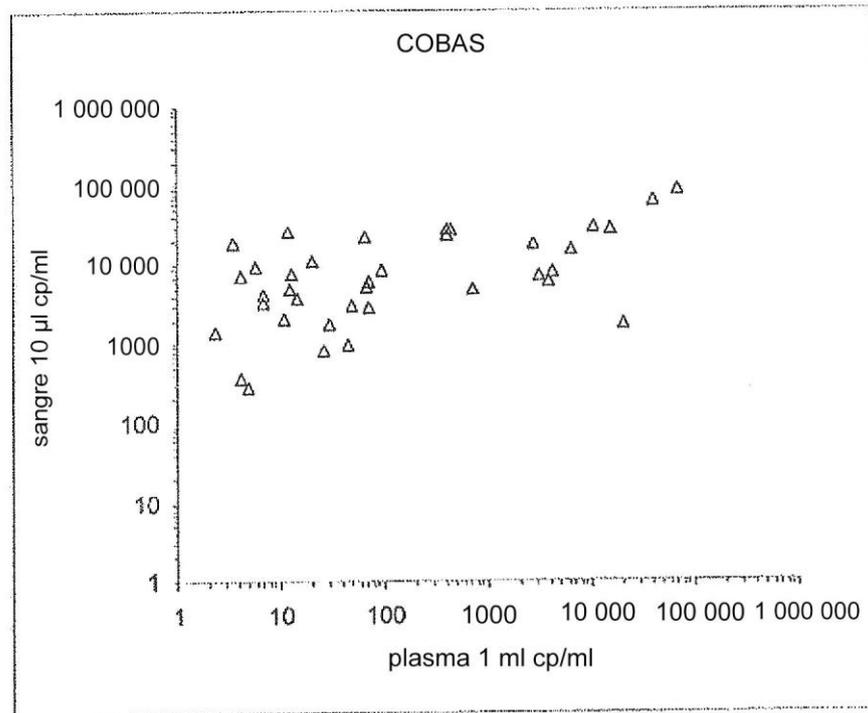


FIG. 29



**FIG. 30**

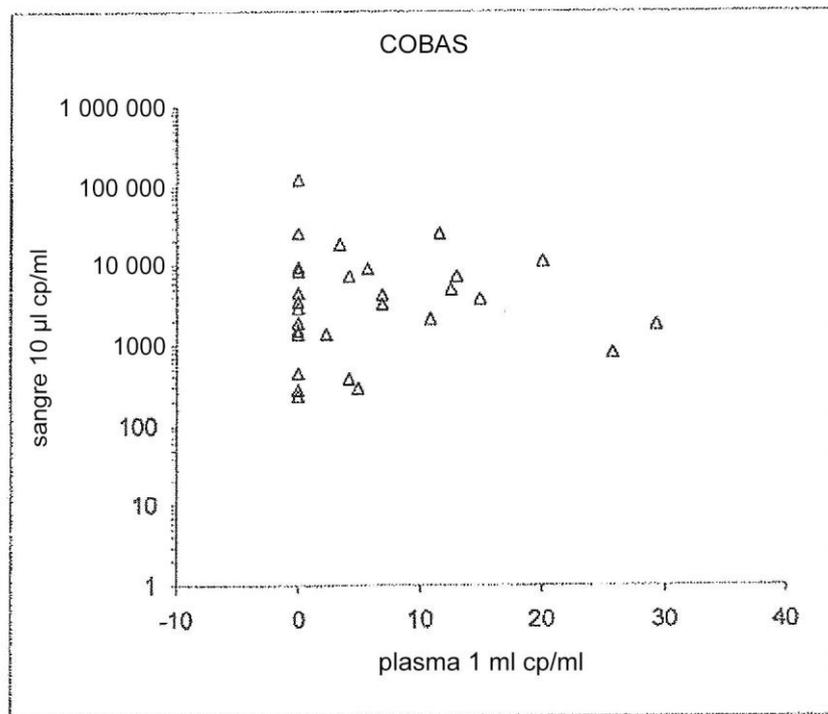
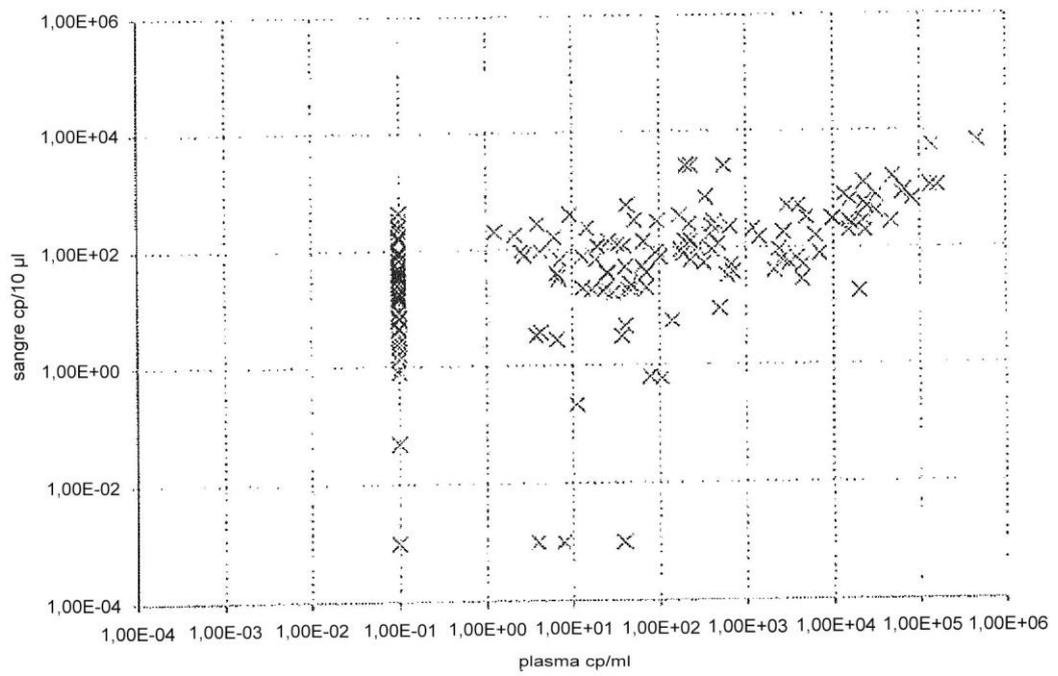


FIG. 31



**FIG. 32**

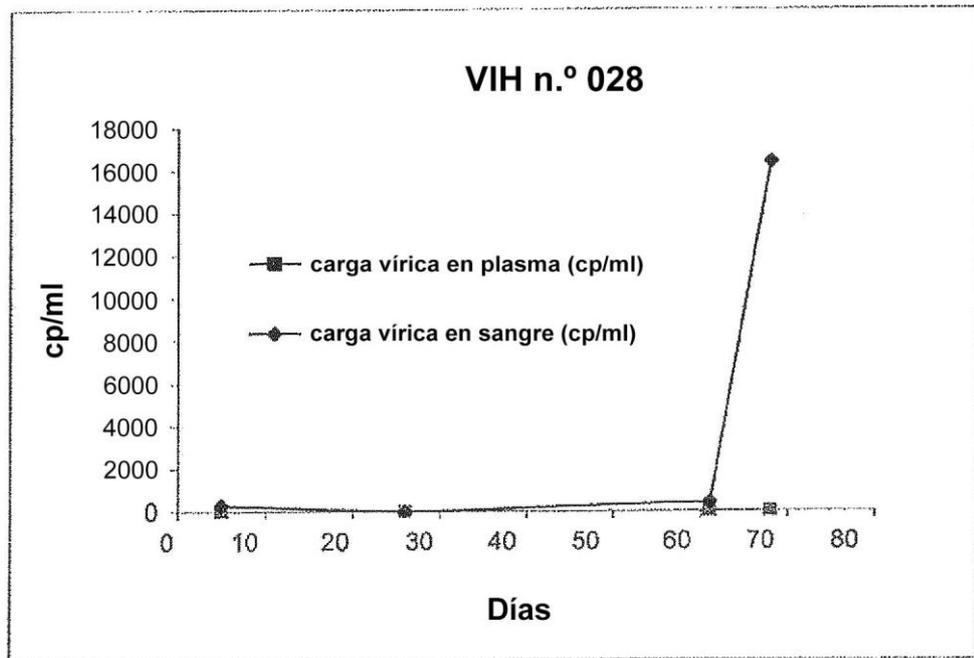
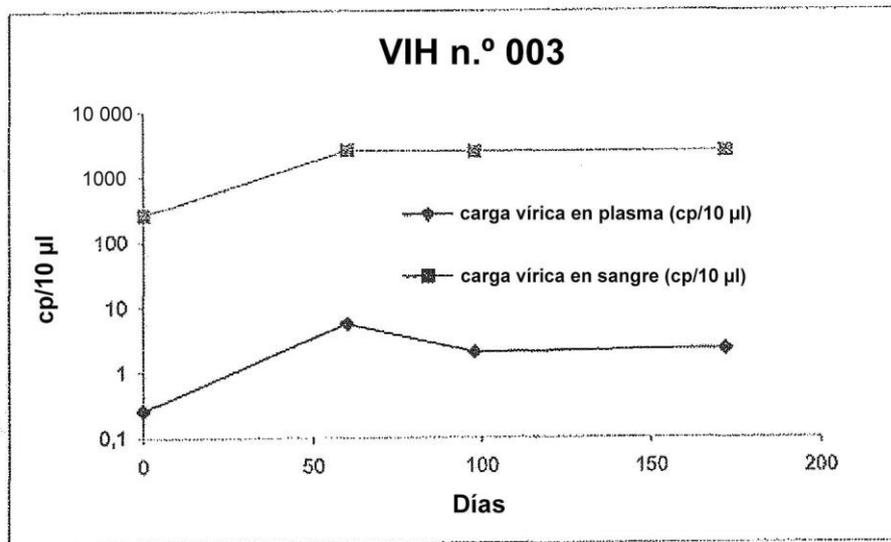


FIG. 33

A



B

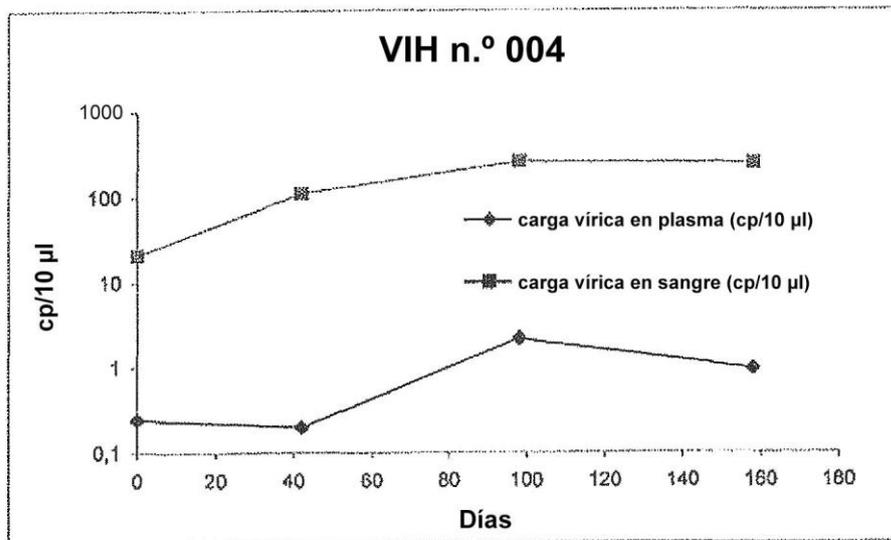
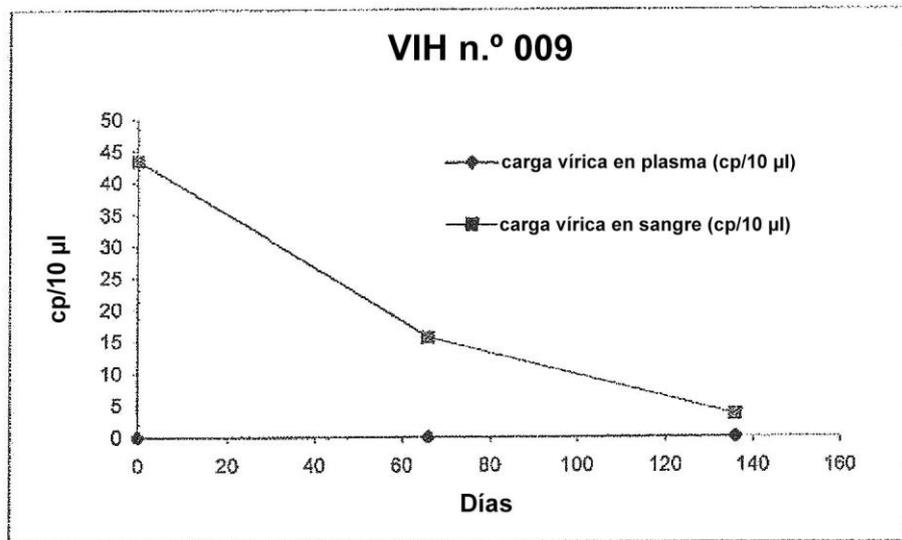


FIG. 34

A



B

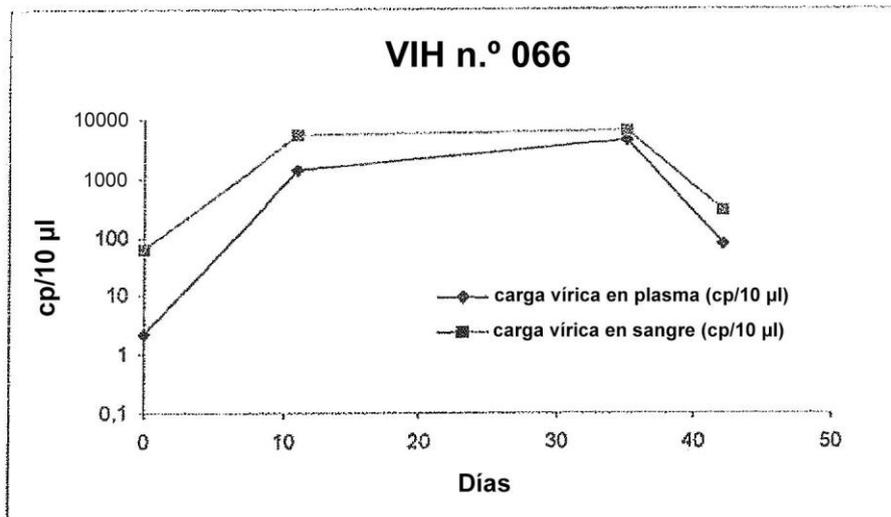
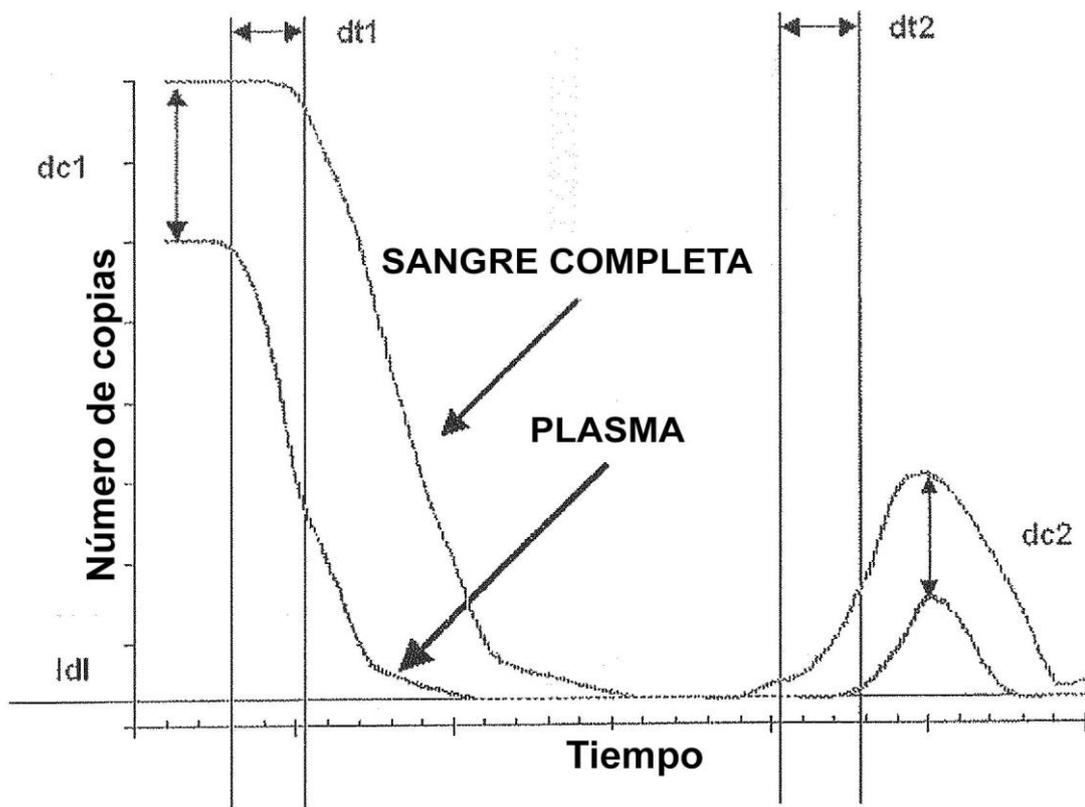


FIG.35



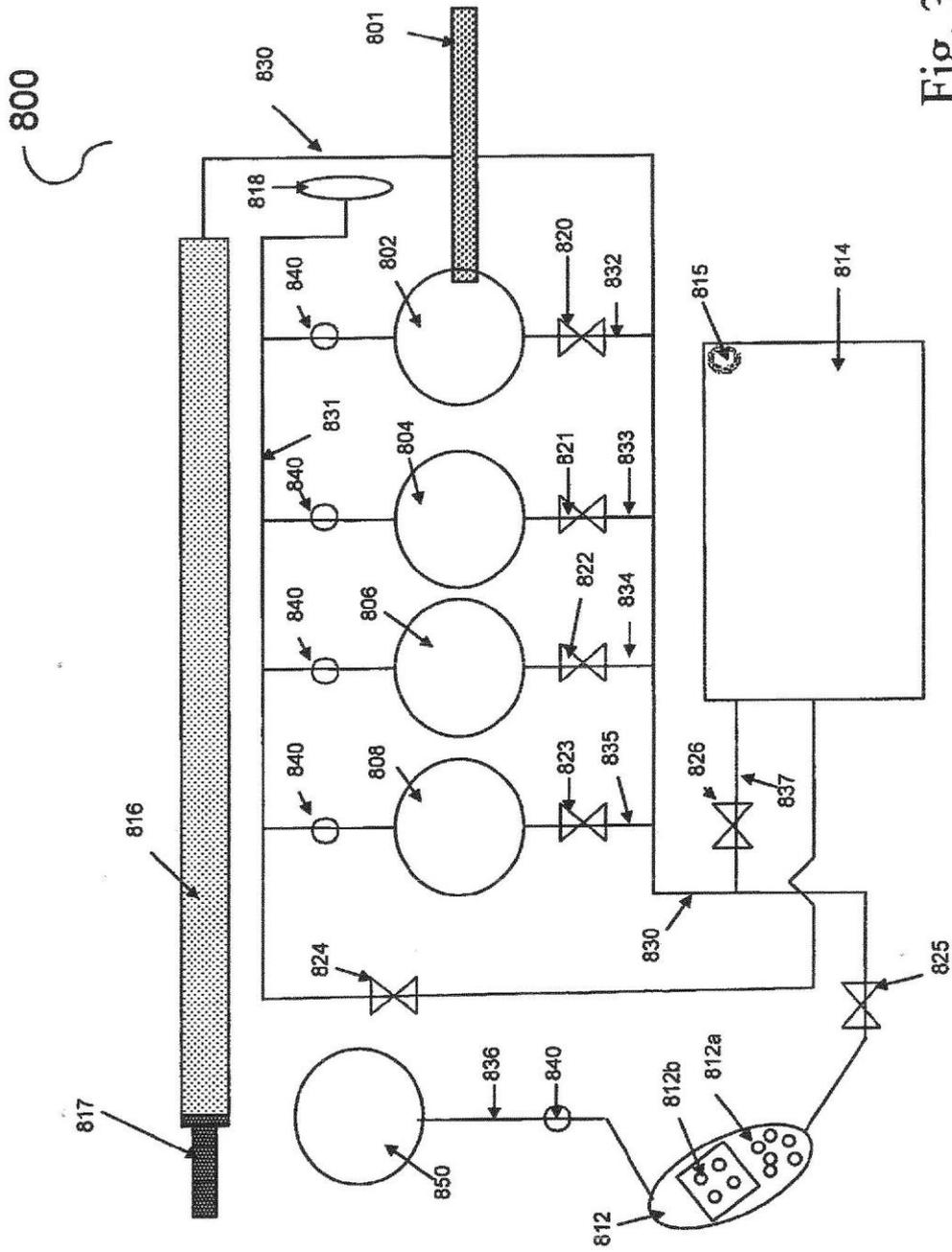


Fig. 36