

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 796 534**

51 Int. Cl.:

B01L 7/00 (2006.01)

B01L 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.04.2011 PCT/EP2011/055524**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.10.2011 WO11124688**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.04.2011 E 11716859 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.03.2020 EP 2555872**

54 Título: **Dispositivo para la detección de ácidos nucleicos**

30 Prioridad:

08.04.2010 DE 102010003782

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

27.11.2020

73 Titular/es:

AJ INNUSCREEN GMBH (100.0%)

Robert-Roessle-Strasse 10

13125 Berlin, DE

72 Inventor/es:

HILLEBRAND, TIMO;

KNIPPSCHILD, CLAUS y

GRASER, ELMARA

74 Agente/Representante:

ÁLVAREZ LÓPEZ, Sonia

ES 2 796 534 T3

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

DESCRIPCIÓN

Dispositivo para la detección de ácidos nucleicos

- 5 El objeto de la presente invención consiste en un dispositivo que permita detectar un ácido nucleico diana en una carga homogénea con dos formatos de detección diferentes. El dispositivo puede utilizarse en particular para el diagnóstico genético móvil bajo condiciones de campo.

Estado de la técnica

10

El estudio de muestras biológicas relevantes en cuanto al diagnóstico, como suero, plasma, sangre, muestras de torunda o frotis de órganos, para la detección de patógenos infecciosos, ha cobrado una gran importancia en los últimos años. Las infecciones virales, como VIH, VHC o VHB, avanzan en todo el mundo. Además, avanzan también

- 15 nuevamente las infecciones bacterianas, como resultado, entre otras cosas, del inicio de cambios climáticos. La aparición de nuevas enfermedades infecciosas fatales, con un potencial de infecciosidad extremadamente elevado (SARS, gripe aviar) muestra cada vez con mayor claridad que un diagnóstico rápido y que pueda realizarse en el lugar será determinante para impedir epidemias. Además, los sistemas diagnósticos que pueden manejarse de forma sencilla y relativamente económicos, ante todo para países en desarrollo, cumplen igualmente un rol significativo en la lucha contra la propagación de enfermedades infecciosas. Las pruebas utilizadas actualmente, ante todo para la

- 20 detección de enfermedades infecciosas virales (VIH, VHC, VHB, dengue, y otras más), se basan mayormente en la realización de PCRs en tiempo real. Esas pruebas están asociadas a condiciones previas extremadamente costosas en cuanto a la técnica de los aparatos, así como también a reactivos costosos. La realización de esos métodos solo puede tener lugar a través de personal especializado capacitado, en laboratorios especiales.

- 25 Otro punto clave se relaciona con la realización de pruebas diagnósticas en cuanto a la detección temprana de ataques terroristas (viruela, peste, ántrax). Precisamente en esos campos de aplicación es extremadamente importante llegar de forma exacta a un resultado, puesto que a partir de un resultado de esa clase se introduce una pluralidad de medidas de seguimiento de gran alcance, para proteger a la población. Las pruebas diagnósticas que se emplean en la actualidad (que parcialmente también pueden realizarse en el lugar), por lo tanto, necesitan siempre un estudio de

- 30 confirmación en una segunda plataforma de detección (por ejemplo, primer diagnóstico del patógeno mediante PCR en tiempo real y confirmación del resultado diagnóstico a través de la aplicación de la carga de amplificación en un gel de agarosa). En este contexto, no es completamente necesaria una detección rápida efectiva en el lugar, ya que el estudio de confirmación en una segunda plataforma de detección no forma parte de las soluciones de sistema que existen en la actualidad (por ejemplo, la detección móvil con LightCycler no ofrece la posibilidad de una segunda

- 35 detección de confirmación).

La solicitud de patente norteamericana 6,565,815 B1 pertenece al estado de la técnica. La unidad óptica descrita en ese documento (unidad de detección) prevé una introducción de luz que tiene lugar lateralmente desde abajo y que está espacialmente separada de la unidad de calentamiento. El control de la reacción, en este caso, tiene lugar solo

40 en una vía óptica. No se prevé otro control del producto, como detección inmunológica, mediante tiras de flujo lateral. La estructura del cartucho (consumible) comprende paredes que reflejan la luz, así como lentes ópticos introducidos. En este caso se utilizan varios materiales para la producción de la cámara de reacción. El recorrido óptico tiene lugar a través de dos ventanas ópticas en la cámara de reacción, que se ubican en un ángulo de 90° una con respecto a otra. No es posible aquí una medición de absorción, puesto que no es posible una definición de la longitud del recorrido

45 del haz. La presión de contacto de los bloques de muestras, en la solicitud US 6,565,815 B1, no se realiza mediante un resorte helicoidal. La unidad óptica no está ajustada directamente en el bloque de muestras.

- El documento DE 10 2006 036 171 A1 también corresponde al estado de la técnica. Allí se describen una disposición y un procedimiento para la PCR rápida con medición de fluorescencia de varios canales. El conjunto de aparatos está
- 50 diseñado especialmente en MTP de 96 pocillos (placa de microtitulación). El espacio de reacción, en la solicitud DE 10 2006 036 171 A1, no se define a través de los elementos de calentamiento, sino que está predeterminado por la MTP. Debido al grosor de la capa de la pared de las cavidades son imprescindibles elementos de calentamiento potentes (eficiencia térmica), obstaculizando con ello una miniaturización, así como la movilidad (suministro de

- 55 tensión). Los elementos de calentamiento se encuentran debajo de las cavidades, o sobre las mismas (calentamiento superior). El espacio de reacción no está dispuesto perpendicularmente con respecto a los bloques de muestra. La introducción de la luz tiene lugar desde arriba (no de forma lateral) y no de forma directa hacia la muestra, sino hacia la cavidad, que presenta un volumen indefinido de exceso de aire. Además, tanto el acoplamiento de la luz hacia la muestra, como también su desacoplamiento, tienen lugar mediante la misma fibra óptica. Debido a la longitud indefinida del recorrido de la luz no es posible una medición de absorción. Debido a los recorridos largos de la luz en

- 60 la muestra y a las cavidades de tamaños desiguales también se necesitan lentes ópticos. La disposición descrita (también debido a su medición de fluorescencia de varios canales y a la falta de una fuente de tensión interna) no representa un producto adecuado para la puesta en funcionamiento "en el campo".

Además, en los documentos US2004/191896A1, EP2071026A1 y WO7/27324A1 se describen otros dispositivos para la detección de ácidos nucleicos, que comprenden un cartucho de reacción, que contiene un cuerpo base y una lámina que cierra el cuerpo base, y una unidad de detección óptica.

5 Por lo tanto, el objeto de la presente invención consistió en proporcionar un sistema de detección que pueda realizarse de forma sencilla (también a través de no especialistas), que arroje rápidamente un resultado diagnóstico y que también deba poder realizarse en el lugar. El sistema de detección debe posibilitar realizar dos posibilidades de detección para verificar el primer resultado diagnóstico.

10 En los documentos DE102007062441A1 y WO2009/080817A2 se describen sistemas de aparatos que posibilitan un aislamiento móvil de ácidos nucleicos provenientes de cualquier muestra biológica compleja, así como una detección móvil de ácidos nucleicos en el lugar. Esos sistemas de aparatos se encuentran actualmente disponibles en el mercado y permiten la realización del aislamiento de ácidos nucleicos y una detección subsiguiente de ácidos nucleicos
15 específicos.

La pieza central de la unidad de detección es un cartucho de reacción que, después de la carga con reactivos de amplificación y ácidos nucleicos de muestra que deben analizarse, posibilita la realización de una reacción de amplificación extremadamente rápida. La detección del ácido nucleico objetivo específico, a continuación, tiene lugar
20 debido a que la carga de reacción amplificada se transfiere a una tira de prueba de flujo lateral aguas abajo. Sobre la tira de prueba tiene lugar la detección colorimétrica final (figura 5). El sistema en su totalidad trabaja opcionalmente con un funcionamiento a batería y, con ello, puede utilizarse también bajo condiciones de campo.

La reacción de detección que se desarrolla sobre la tira de prueba se describe igualmente en los documentos
25 DE102007062441A1 y WO2009/080817A2. Se trata de una combinación de una reacción de amplificación y de hibridación, y de la detección subsiguiente del producto sobre una tira de prueba inmunológica.

El procedimiento según la invención se basa en la utilización de los sistemas de aparatos descritos en los documentos antes mencionados, y representa una variante notablemente mejorada.

30 De manera sorprendente se demostró que es posible realizar una detección dual de un ácido nucleico diana en un cartucho de reacción mejorado, y utilizar un sistema de prueba de esa clase, de este modo, también con un funcionamiento a batería, bajo condiciones de campo. Con el sistema de prueba dual según la invención, por primera vez es posible verificar un resultado diagnóstico mediante un segundo formato de prueba, también bajo condiciones
35 de campo. Otra ventaja esencial de la invención se presenta debido a que ambas pruebas pueden desarrollarse en un cartucho de reacción novedoso y en que el cartucho de reacción posibilita una realización de la prueba homogénea de ambas reacciones de detección, es decir, que ambas reacciones de detección se desarrollan de manera que en ningún momento se necesita una apertura del cartucho de reacción. Esto significa una enorme ventaja, ya que los productos de la amplificación, de este modo, nunca entran en contacto con el ambiente y, con ello, no se presentan
40 riesgos de contaminación. (A diferencia de ello, son posibles contaminaciones después de la detección LightCycler, cuando a continuación el producto de amplificación se aplica sobre un gel de agarosa y se separa).

El cartucho de reacción según la invención, de manera preferente, se compone de un cuerpo base y de al menos una lámina que cierra el cuerpo base, que presenta al menos una superficie no conectada al cuerpo base (figura 1 y figura
45 6: sector espacio de reacción con láminas). La superficie de la lámina no conectada, con respecto al soporte base, puede conformar en este caso una cámara de reacción (figura 1). Además, una superficie no conectada, en el soporte base, puede servir para el transporte de volumen (figura 6). Las superficies no conectadas, de este modo, pueden formar varios volúmenes con el cuerpo base que, por ejemplo, forman dos cámaras de reacción y sirven para el transporte de volumen. De este modo, una primera cámara de reacción sirve para la detección óptica según la
50 invención y la segunda cámara de reacción posibilita una detección inmunológica.

Para ello, la segunda cámara de reacción contiene una tira de prueba de flujo lateral. El cartucho de reacción según la invención, con ello, por primera vez, posibilita una detección dual en dos principios de detección diferentes, y permite debido a ello una segunda reacción de verificación independiente.

55 La combinación de los dos formatos de detección se realiza, según la invención, del siguiente modo.

El procedimiento de detección dual según la invención se basa en una nueva síntesis de ADN, dependiente de la matriz, con una etapa de hibridación. La selección según la invención, de los marcadores de los oligonucleótidos involucrados en las reacciones, permite tanto una medición de fluorescencia que depende de la reacción y una
60 evaluación numérica y eventualmente cuantitativa asociada con ello (detección óptica), como también una detección inmunológica subsiguiente en forma de la visualización de la reacción, por ejemplo, en una tira de flujo lateral.

Según la invención, los bloques de muestras se sitúan unos sobre otros al no estar introducido el cartucho. La presión de contacto de los bloques de muestras se realiza mediante un resorte helicoidal. La unidad óptica no está ajustada directamente en el bloque de muestras. La colocación directa de la fibra óptica en el bloque de muestras garantiza un recorrido mínimo de la luz después de la salida desde la fibra y el pasaje hacia la muestra (reducción al mínimo de efectos de dispersión y de refracción. Por lo tanto, no es posible transportar/operar el consumible según la invención en el dispositivo descrito en el documento US 6,565,815 B1, y de forma inversa. Para una transferencia térmica óptima hacia la muestra se necesita una cierta presión de contacto de las láminas de la cámara de reacción contra el bloque de muestras. Según la invención, esto se realiza a través de la fuerza de contacto y el enganche positivo de los bloques de muestras hacia la cámara de reacción y hacia la cámara de muestras hermetizada, conectada a la misma (asegurado del canal de inyección). En este caso se demuestran también las ventajas de los bloques de muestras conformados de modo convexo, según la invención.

El dispositivo según la invención se diferencia claramente también de aquél que se ha descrito en la solicitud DE 10 2006 036 171 A1. La diferencia principal consiste aquí en la distancia de las fibras con respecto a la muestra. En la solicitud DE 10 2006 036 171 A1, la luz debe atravesar primero la lámina de sellado de las muestras y después el espacio superior, sobre la muestra, hasta alcanzar la muestra. Por otra parte, esto conduce a efectos de dispersión y de refracción considerables, que no se producen en la disposición según la invención.

El procedimiento según la invención, de la detección dual, se desarrolla según las siguientes etapas:

A. Puesta a disposición de una carga de reacción, compuesta por:

- ♦ una muestra que contiene un ácido nucleico, en la cual debe detectarse el ácido nucleico objetivo
- ♦ al menos un oligonucleótido provisto de un marcador 1, que es completamente o parcialmente complementario con respecto a la secuencia objetivo, y que actúa como un iniciador en una nueva síntesis, dependiente de la matriz, del ácido nucleico objetivo (oligo tipo 1)
- ♦ al menos un oligonucleótido marcado por un marcador 2, que, debido a la temperatura de fusión más reducida, como oligonucleótido 1, no participa en el proceso de nueva síntesis de ADN, pero puede hibridar, de forma parcial o completa, con el producto de la nueva síntesis de ADN de oligo tipo 1, (oligo tipo 2)
- ♦ una mezcla de productos químicos / enzima, eventualmente también con otros oligonucleótidos no marcados, que posibilita una nueva síntesis, dependiente de la matriz, del ácido nucleico objetivo.

Según la invención, los marcadores de los dos oligonucleótidos (oligo tipo 1 y oligo tipo 2) se seleccionan de manera que los mismos forman juntos un par FRET (por ejemplo, FITC/TAMRA, FAM/TAMRA, FAM/BHQ1, y similares), y con respecto a la detección doble según la invención pueden tener también ligandos complementarios en una tira de flujo lateral.

B. Realización de una nueva síntesis de ADN, dependiente de la matriz, con hibridación de sondas integrada

En función de la clase del ácido nucleico objetivo se realiza una reacción de transcriptasa reversa (en el caso de ARN que se presenta en un número de copias muy elevado, por ejemplo, ARN ribosomal, ARN mensajero de transferencia) o una amplificación (en el caso de ADN), o también las dos reacciones de forma consecutiva (en el caso de un ARN poco común, por ejemplo, ARN mensajero, muestras con un número de partículas reducido).

En esa primera reacción, debido al procedimiento según la invención, solo participa el oligo tipo 1. El oligo tipo 1 actúa como un iniciador, en una transcripción reversa dependiente del ARN (debido a ello se produce una cadena de ADN complementario marcada) o en una amplificación del ADN objetivo, así como ADN complementario (debido a ello se produce un producto PCR marcado). Puede realizarse igualmente una PCR en tiempo real de un paso. De este modo, un segundo oligonucleótido iniciador, no marcado, aumenta el rendimiento de la reacción PCR.

El oligo tipo 2, debido a su temperatura de renaturalización, según el procedimiento según la invención, no participa en la nueva síntesis de ADN. A continuación, la carga de reacción se calienta a una temperatura > 90 °C. Esa etapa conduce a la separación de cadenas térmica. Después del desarrollo de esa reacción de desnaturalización, la carga de reacción se enfría a la temperatura de hibridación del oligo tipo 2. Durante esa etapa, el oligo tipo 2 se une específicamente a la cadena de ADN complementaria. Esa cadena porta el marcador 1, que fue incorporado en el producto de reacción a través del oligo tipo 1.

C. Detección dual del suceso de hibridación

La reacción de detección tiene lugar en el mismo cartucho de reacción, de forma sucesiva.

1. Detección de la reacción de hibridación mediante una medición de fluorescencia. Los marcadores incorporados a través de los dos oligos tipo 1 y tipo 2 forman un par FRET. La hibridación del oligo tipo 2 en el producto de síntesis del oligo tipo 1, que tiene lugar en el procedimiento según la invención, conduce a un efecto FRET entre el marcador 1 y 2. Ese efecto conduce ahora a una reducción mensurable de la fluorescencia. Esa reducción de la fluorescencia se evalúa numéricamente, posibilitando así la detección unívoca de la reacción. Después de la detección óptica que ha tenido lugar, a través de la adición de un tampón de migración que fue inyectado en el cartucho de reacción, la carga de reacción se transfiere a la segunda cámara de reacción del cartucho (allí se encuentra una tira de flujo lateral). La transferencia de la carga de reacción/del tampón de migración se realiza mediante la superficie que fue generada a través de la lámina que cierra el cuerpo base del cartucho de reacción.

2. Detección de la reacción de hibridación en la tira de flujo lateral en la segunda cámara de reacción del cartucho de reacción según la invención.

La tira de flujo lateral contiene un punto de unión para uno de los marcadores de los oligos tipo 1 y tipo 2 y/o anticuerpos u otras moléculas de unión contra las moléculas del marcador de los oligos tipo 1 y tipo 2 que pueden unirse a la molécula del marcador tipo 1 o tipo 2 (por ejemplo, enlaces covalentes o enlace de puente de hidrógeno o mediante moléculas de puente). Además, sobre la fase sólida se encuentra una molécula de detección para una visualización o medición del suceso de hibridación, o a la reacción de detección se suministra una molécula de detección de esa clase. La molécula de detección, sin embargo, también ya puede haber sido incorporada al producto de hibridación que debe detectarse durante la reacción de amplificación /reacción de hibridación.

La detección de la reacción inmunológica en la tira de prueba tiene lugar entonces de forma sencilla, por ejemplo, por vías visuales.

Después del hallazgo, el cartucho de reacción se desecha.

A modo de resumen, con el procedimiento según la invención se pone a disposición un procedimiento de detección de diagnóstico genético extremadamente sencillo y que puede utilizarse de forma universal.

La detección dual de un ácido nucleico objetivo que debe detectarse, relevante en cuanto al diagnóstico, tiene lugar en forma de un ensayo homogéneo, mediante la medición de fluorescencia de punto final de una desactivación fluorescente y a continuación mediante la detección inmunológica sobre una tira de flujo lateral. El resultado puede registrarse de forma numérica y permite también una detección y una cuantificación del ácido nucleico objetivo que debe detectarse (utilizando un estándar interno). El procedimiento según la invención de la detección dual, de un modo sofisticado y extremadamente sencillo, realiza de esta manera una primera detección diagnóstica de un ácido nucleico diana mediante detección de fluorescencia, y a continuación, en el mismo cartucho de reacción, una verificación del resultado en una tira de flujo lateral.

Una verificación de esa clase, de este modo, es mucho más exacta en cuanto al diagnóstico que una detección, posible hasta el momento, de productos PCR en tiempo real en un gel de agarosa. El procedimiento también puede utilizarse bajo condiciones de campo.

Esa novedosa y sofisticada realización de la prueba, en particular también la realización de la prueba combinada (detección de fluorescencia y verificación subsiguiente de la primera reacción de prueba en una fase sólida), según la invención, se posibilitan debido a que durante la amplificación y la hibridación la sonda hibridada (oligo tipo 2) no se degrada a través de la Taq-polimerasa, sino que también después del desarrollo de la reacción permanece en el estado hibridado, a diferencia del ensayo homogéneo de exonucleasa TaqMan.

La integración según la invención de una sonda de hibridación en la reacción ofrece la seguridad de que el fragmento amplificado contiene realmente la secuencia diana. Debido a esto se excluyen los resultados falsos positivos que se producen a través de mispriming (apareamiento incorrecto). La utilización de la sonda modificada de forma química (preferentemente fosforilación del último nucleótido de la sonda) impide la prolongación de la sonda a través de la actividad 5'-->3'- polimerasa, impidiendo con ello que la sonda actúe como iniciador y genere artefactos PCR no específicos (dímeros del iniciador), que se detectarían como señales falsamente positivas.

A diferencia del procedimiento de PCR en tiempo real, la detección de la señal de detección específica no tiene lugar durante la amplificación, donde la fluorescencia se libera a través de la hidrólisis de sondas realizada por la Taq-polimerasa (solicitud EP 0972 848 A2) o se reduce a través del efecto FRET (solicitud EP1384789 B1), sino solo después de finalizada la reacción de amplificación-hibridación. Un procedimiento de esa clase tampoco permitiría una detección inmunológica subsiguiente en una tira de prueba de flujo lateral.

El procedimiento según la invención también se diferencia del documento de patente (EP 0 826 066 B1) que

igualmente representa una combinación de PCR e hibridación. También en ese procedimiento, por otra parte, se detecta una señal de fluorescencia proporcionada a través del efecto FRET. La misma se produce durante el proceso de amplificación, a través de la hibridación de una sonda doblemente marcada, que posee una temperatura de renaturalización más reducida que el iniciador. La liberación de la fluorescencia, de este modo, no tiene lugar a través
 5 de hidrólisis de la sonda a causa de la actividad exonucleasa de la polimerasa, sino debido a que en la hibridación se disuelve la estructura secundaria de la sonda, y a través de la eliminación del reportero, desde el desactivador de fluorescencia, se libera la fluorescencia. En este caso, para la amplificación solo pueden utilizarse enzimas que no posean una actividad exonucleasa (por ejemplo, fragmento Klenow o polimerasas T4 o T7).

10 Tal como ya se ha explicado, el procedimiento según la invención puede realizarse también bajo condiciones de campo. La base en cuanto a la técnica de los aparatos ya se ha descrito en los documentos E102007062441A1 y WO2009/080817A2. El novedoso procedimiento de la detección dual según la invención y el cartucho de reacción mejorado según la invención se caracterizan además porque los mismos posibilitan realizar dentro de los recipientes de reacción una PCR rápida, la así llamada rapid PCR. En esa forma de la PCR, a un recipiente de reacción o espacio
 15 de reacción deben suministrarse rápidamente grandes cantidades de energía, para lograr variaciones de la temperatura rápidas (de hasta 15 °C/s).

En el caso de consumibles o recipientes estándar esto presupone que se emplean elementos de calentamiento muy robustos (elementos Peltier, láminas de calentamiento, etc.) y, con ello, debido a su consumo de potencia, son
 20 contrarios a una utilización móvil debido a las baterías o acumuladores limitantes requeridos.

Para eludir ese problema, por ejemplo, en el caso de soluciones de chip existentes, se reduce en alto grado el volumen que debe calentarse (<1 µl hasta nl volumen), para tener que calentar aquí solo un volumen reducido. En este caso, sin embargo, no se toma en cuenta en absoluto la manejabilidad de un volumen de esa clase. Además, se presentan
 25 aquí problemas de evaporación considerables, en el caso de un volumen de esa clase.

De manera llamativa, ya en los primeros ensayos, en la utilización del cartucho según la invención, pudo observarse que también con la utilización de elementos Peltier estándar usuales en el comercio, pudo alcanzarse una tasa de calentamiento extremadamente elevada en un gran volumen (25 µl). Esto se ha logrado mediante la utilización de las
 30 láminas de cierre sobre el cuerpo base. Esas láminas - sin causar una pérdida de estabilidad de la totalidad del cartucho - pueden seleccionarse en grosores mínimos (<100 µm).

Las láminas de cierre forman con el cuerpo base un espacio de reacción que puede llenarse con la carga de reacción. Para realizar la entrada de calor necesaria hacia el volumen de reacción, 2 bloques de muestras (de cada lado de una
 35 figura 2) son presionados con una fuerza elevada (por ejemplo, de respectivamente >60N) en el espacio de reacción. Los bloques de muestras presentan de este modo una forma levemente curvada en el bloque de muestras, y se cierran herméticamente a través de la forma y la fuerza elevada. La fuerza ejercida de los bloques de muestras puede seleccionarse muy elevada, ya que la lámina de cierre solo se curva levemente y no se destruye, tampoco en el caso de un grosor mínimo de la lámina.

40 A través de la curvatura de los bloques de muestras, en el centro de la cámara de reacción se forma un punto levemente estrechado. A través de la disposición vertical del cartucho se soluciona el problema con burbujas de aire que se producen en el líquido de las muestras, ya que las burbujas de aire se conforman en la parte superior de la cámara de reacción, formando un espacio llenado con aire. Ese problema se encuentra en muchos sistemas
 45 correspondientes al estado del arte, y se evita parcialmente de forma muy costosa (burbujas de aire en el líquido de las muestras). En la disposición del cartucho, según la invención, ese espacio que se conforma, llenado de aire, incluso tiene un efecto positivo. De manera llamativa, en la determinación de las tasas de calentamiento se demostró que cuando se ha formado un espacio de aire, la presión en el recipiente aumenta (expansión del aire). La presión en aumento, en el caso de temperaturas elevadas (por ejemplo, 90 °C), hace posible que la lámina sea presionada contra
 50 los bloques de muestras para una transferencia térmica aún mejor, mejorando con ello nuevamente la transmisión de calor. Este efecto puede aprovecharse en el caso de ese consumible, pero no es determinante para la utilización según la invención.

En la configuración de los aparatos según la invención, ampliando los sistemas de aparatos descritos de los
 55 documentos antes mencionados, se encuentra ahora una unidad de detección óptica.

La detección óptica posibilita la medición descrita de la fluorescencia para la primera reacción de detección en la primera cámara de reacción del cartucho de reacción;

60 La distancia de la lámina de cierre, una con respecto a otra, después del presionado de los bloques de muestra, se determina a través del grosor del cuerpo base y la geometría de los bloques de muestra. Esa distancia reproducible entre los bloques de muestras, en mediciones de prueba, resultó como una muy buena base para una detección óptica

dentro de una cámara de reacción. Una longitud del recorrido óptica se define por tanto solo a través del grosor del consumible (en el caso de una disposición constante de los bloques de muestras). Ese efecto permite realizar una medición de absorción reproducible desde un bloque de muestras hacia otro, por ejemplo, para poder guiar una detección mediante una concentración de ADN (véanse la figura 3 y la figura 4, cámara de reacción con detección
5 óptica, así como disposiciones para la detección de fluorescencia y medición de absorción a través de la cámara de reacción). Para ello, en un bloque de muestras se introduce luz hacia el cartucho (a través de la lámina de cierre) (por ejemplo, mediante fibra óptica), y en el otro bloque de muestras, a través de la lámina de cierre (por ejemplo, igualmente mediante una fibra óptica) se suministra a un detector. Las láminas de cierre se seleccionan aquí naturalmente de manera que las mismas correspondan a las exigencias ópticas del método de detección (por ejemplo,
10 poca absorción de la luz a través de las láminas de cierre / las láminas de cierre deben ser continuas para longitudes de onda del principio de detección).

Los bloques de muestras, al no estar introducido el cartucho, se sitúan con su curvatura directamente unos sobre otros, donde la fuerza de contacto puede ser realizada, por ejemplo, a través de un mecanismo de resorte o bien de
15 una estructura mecánica simple. Si ahora se utiliza un cartucho con un grosor diferente del cuerpo base, se influncia la longitud del recorrido óptica, pero no la amplificación de la muestra a través de la rapid PCR. La transmisión de calor a través de las láminas de cierre vuelve innecesaria una regulación complicada de la conducción de temperatura, ya que la temperatura en los bloques de muestras casi en un 100 % corresponde a aquella en el cartucho. A través de la variación del grosor del soporte base, de este modo, pueden influenciarse positivamente el volumen de la cámara de
20 reacción y la longitud del recorrido óptica.

Del mismo modo, en un bloque de muestras (por ejemplo, mediante al menos una fibra óptica), es posible guiar hacia el cartucho una longitud de onda de excitación, y mediante la fibra idéntica (o una segunda fibra que se encuentra igualmente en el mismo bloque de muestras o en el segundo bloque de muestras), suministrar a un detector la
25 respuesta de fluorescencia de la muestra (véase la figura 3: cámara de reacción con detección óptica, así como disposiciones para la detección de fluorescencia).

La disposición permite igualmente reunir ambas detecciones en una disposición, diseñando los dos bloques de muestras para absorción y detección de fluorescencia (véase también cámara de reacción con detección óptica, así
30 como disposiciones para la detección de fluorescencia y medición de absorción a través de las cámaras de reacción).

En la combinación del procedimiento según la invención para la detección dual de un ácido nucleico diana, con el dispositivo según la invención se dispone con ello por primera vez de un sistema de prueba que, también bajo condiciones de campo, permite confirmar un primer resultado diagnóstico a través de un segundo resultado de prueba
35 diagnóstico. Con ello puede mejorarse marcadamente la seguridad de una afirmación diagnóstica.

El cartucho según la invención se compone de al menos un cuerpo base, al menos una lámina que lo cierra, que presenta al menos una superficie no conectada al cuerpo base, que conforma al menos un volumen con el cuerpo base para la transferencia de medios y/o al menos una cámara de reacción.
40

Al menos una cámara de reacción conformada presenta las siguientes ventajas:

- ◆ es posible la detección de uno o varios objetivos
- ◆ puede realizarse una detección óptica de una amplificación de uno o de varios objetivos
- 45 ◆ puede realizarse una detección mediante una tira de prueba de uno o de varios objetivos
- ◆ puede realizarse respectivamente un procedimiento de detección distintivo de uno o de varios objetivos.
- ◆ son posibles 2 métodos de detección diferentes

Explicaciones sobre las figuras

50 La figura 1 muestra un sector de la cámara de reacción con láminas.
La figura 2 muestra un sector de la cámara de reacción con bloques de muestras y bloques de muestras sin cámara de reacción.
En la figura 3 pueden apreciarse las cámaras de reacción con detección óptica, así como disposiciones para la
55 detección de fluorescencia.
Las cámaras de reacción con detección óptica, así como disposiciones para la detección de fluorescencia y medición de absorción a través de las cámaras de reacción están ilustradas en la figura 4.
La figura 5 muestra la disposición base del cartucho de reacción.
La figura 6 muestra la conformación de superficies no conectadas de la lámina con el cuerpo base, para la
60 transferencia de volumen (representación sin transferencia de volumen).
La figura 7 muestra la conformación de superficies no conectadas de la lámina con el cuerpo base, para la transferencia de volumen (representación con transferencia de volumen). El símbolo de referencia 16 muestra la

transferencia de volumen a través de la superficie no conectada, de la superficie, con respecto al soporte base (líquido es empujado bajo presión hacia la superficie no conectada; la lámina se curva y se posibilita una transferencia de volumen.

5 Lista de símbolos de referencia

Los símbolos de referencia significan:

- | | | |
|----|---------------------------------------------------------------|------------------------------------------|
| 10 | 1 cuerpo base | 2 volumen de reacción |
| | 3 lámina de cierre 1 | 4 lámina de cierre 2 |
| | 5 componentes ópticos / fuente de luz y/o detector | |
| 15 | 6 fibra óptica | 7 tira de prueba (tira de flujo lateral) |
| | 8 cámara para tiras de prueba | 10 cámara de reacción |
| 20 | 9 canal de flujo hacia la cámara con tiras de prueba | |
| | 11 canal de flujo hacia la cámara de reacción | |
| | 12 abertura de entrada para ingreso de medios | |
| 25 | 13 superficie no conectada de la lámina, con el cuerpo base | |
| | 14 superficies no conectadas de la lámina, con el cuerpo base | |
| | 15 cuerpo base | 16 volumen de transferencia |

REIVINDICACIONES

1. Dispositivo para la detección de ácidos nucleicos, que comprende al menos dos bloques de muestra que pueden calentarse y un cartucho de reacción que contiene un cuerpo base (1, 15) y al menos una lámina (3, 4) que cierra el cuerpo base (1, 15), **caracterizado porque** la lámina (3, 4) presenta además superficies (13) no conectadas al cuerpo base, y esas superficies (13) conforman al menos dos cámaras de reacción (8, 10), donde una cámara de reacción (10) presenta una unidad de detección óptica para la detección de ácidos nucleicos y en la segunda cámara de reacción (8) se encuentra una tira de prueba (7) para la detección de ácidos nucleicos.
- 10 2. Dispositivo según la reivindicación 1, **caracterizado porque** los bloques de muestra tienen una curvatura y, debido a ello, se forma un estrechamiento en al menos una cámara de reacción.
3. Dispositivo según la reivindicación 1, **caracterizado porque** el grosor de la lámina es inferior a 100 µm.
- 15 4. Dispositivo según la reivindicación 1, **caracterizado porque** el cartucho de reacción está dispuesto perpendicularmente con respecto a los bloques de muestra.
5. Dispositivo según la reivindicación 1, **caracterizado porque** la distancia de la lámina de cierre, una con respecto a otra, después del presionado de los bloques de muestra, se determina a través del grosor del cuerpo base y la geometría de los bloques de muestra.
- 20 6. Dispositivo según la reivindicación 1, **caracterizado porque** los bloques de muestra, al no estar introducido el cartucho, se apoyan directamente unos sobre otros con su curvatura, donde la fuerza de contacto se realiza a través de un mecanismo de resorte.
- 25 7. Dispositivo según la reivindicación 1, **caracterizado porque** en la segunda cámara de reacción se encuentra una tira de flujo lateral para la detección inmunológica de una reacción de amplificación/de hibridación en ácidos nucleicos.
- 30 8. Dispositivo según la reivindicación 1, **caracterizado porque** en un bloque de muestra se encuentra un aparato para la introducción de luz en el cartucho a través de la lámina de cierre, preferentemente mediante una fibra óptica, y en el otro bloque de muestras se encuentra un pasaje para esa luz, hacia un detector.
9. Dispositivo según la reivindicación 1, **caracterizado porque** en un bloque de muestras se encuentra un aparato para la introducción de una longitud de onda de excitación, mediante una fibra óptica, en el cartucho, y mediante la fibra idéntica o una segunda fibra, en el mismo o en el otro bloque de muestras, se encuentra un pasaje hacia un detector, que registra una respuesta de reacción de la muestra.
- 35 10. Dispositivo según la reivindicación 1, **caracterizado porque** los dos bloques de muestras pueden presionarse sobre el espacio de reacción con una fuerza de al menos 5N, preferentemente de al menos 30 N.
- 40 11. Procedimiento para la detección de ácidos nucleicos, **caracterizado por** las siguientes etapas:
- 45 a) Puesta a disposición de una carga de reacción, compuesta por:
- Una muestra que contiene un ácido nucleico, en la cual debe detectarse el ácido nucleico objetivo
 - Al menos un oligonucleótido provisto de un marcador 1, que es completamente o parcialmente complementario con respecto a la secuencia objetivo, y que actúa como un iniciador en una nueva síntesis, dependiente de la matriz, del ácido nucleico objetivo (oligo tipo 1)
 - Al menos un oligonucleótido marcado por un marcador 2, que, debido a la temperatura de fusión más reducida, como oligonucleótido 1, no participa en el proceso de nueva síntesis de ADN, pero puede hibridar, de forma parcial o completa, con el producto de la nueva síntesis de ADN de oligo tipo 1, (oligo tipo 2)
 - Una mezcla de productos químicos / enzima, eventualmente también con otros oligonucleótidos no marcados, que posibilita una nueva síntesis, dependiente de la matriz, del ácido nucleico objetivo.
- 50 55 b) Realización de una nueva síntesis de ADN, dependiente de la matriz, con hibridación de sondas integrada
- c) Detección dual del suceso de hibridación, donde en una cámara de reacción del dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 tiene lugar una detección óptica, y en una segunda cámara de reacción del dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 tiene lugar una detección sobre una tira de flujo lateral.
- 60 12. Procedimiento según la reivindicación 11, **caracterizado porque** la tira de flujo lateral contiene un punto de unión para uno de los marcadores de los oligos tipo 1 o tipo 2 y/o anticuerpos u otras moléculas de unión contra

las moléculas del marcador de los oligos tipo 1 o tipo 2, que pueden unir las moléculas del marcador tipo 1 o tipo 2.

Figura 1

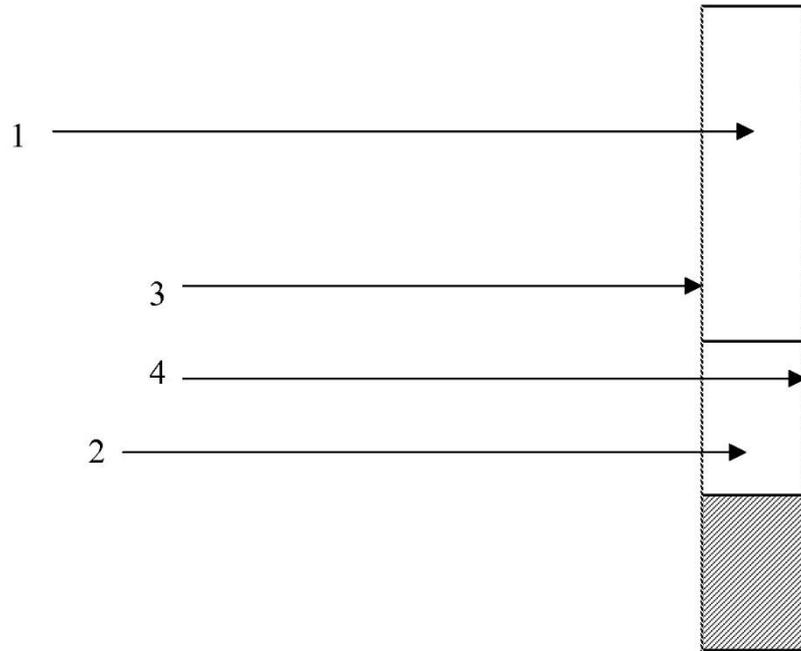


Figura 2

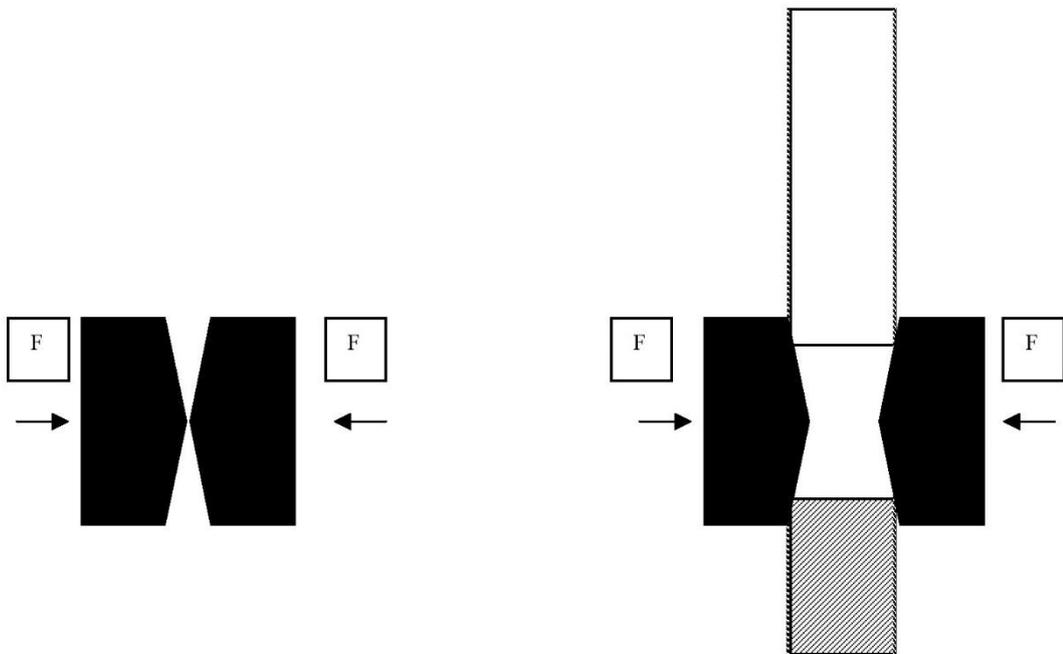


Figura 3

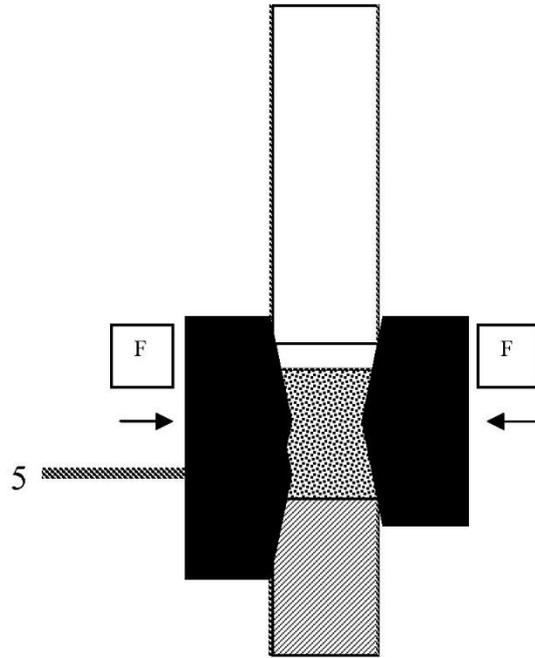


Figura 4

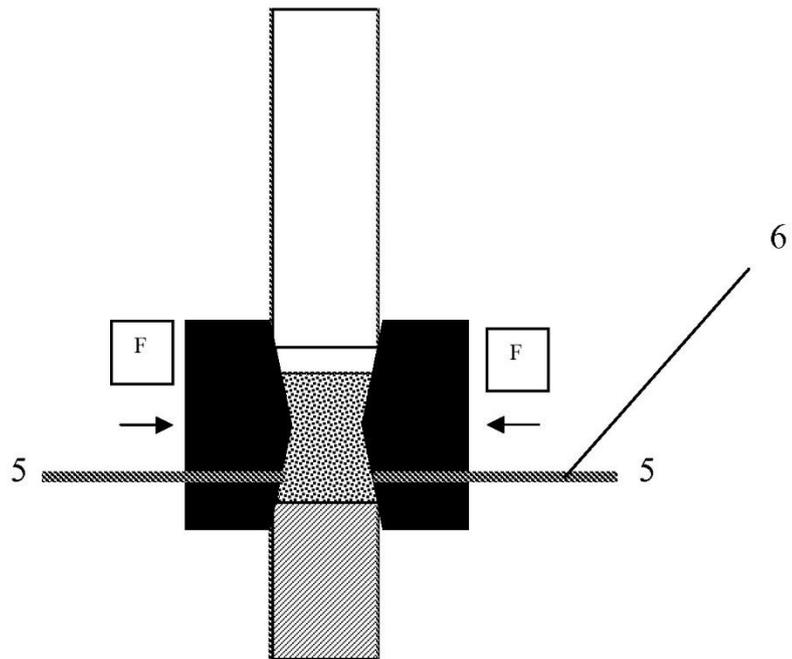


Figura 5

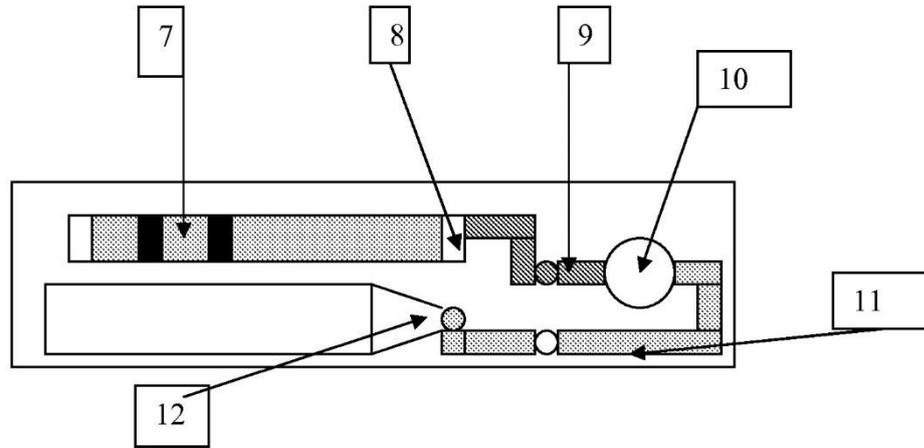


Figura 6

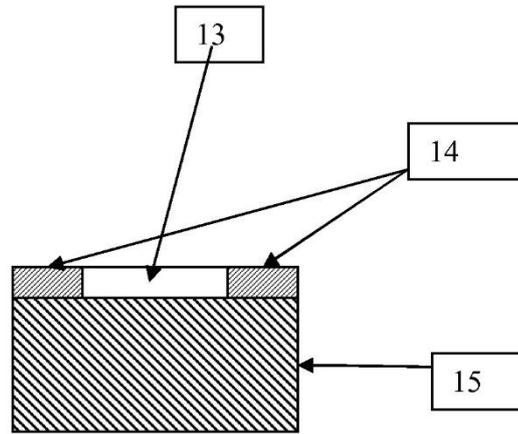


Figura 7

